

表5 蒸かし黒豆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)	Clt (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	46	理化学試験	0	NT	6.6	0.97	NT	NT	NT	
			47				6.7	0.97				
			48				6.7	0.97				
A	無処理	3	40	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0	NT	NT	NT	10未満	10未満	ND	
			41						10未満	10未満	ND	
			42						10未満	10未満	ND	
B	無処理	3	43	保存試験 (未開封)	49	無 無 無	6.7	NT	10未満	10未満	ND	
			44				6.6		10未満	10未満	ND	
			45				6.6		10未満	10未満	ND	
C	芽胞非接種	3	34	細菌試験 (開封操作確認)	0	NT	6.9	NT	10未満	10未満	NT	
			35				6.8		10未満	10未満		
			36				6.8		10未満	10未満		
D	芽胞非接種	3	37	保存試験 (開封)	49	無 無 無	6.4	NT	10未満	10未満	ND	
			38				6.5		10未満	10未満	ND	
			39				6.5		10未満	10未満	ND	
E	芽胞接種	3	31	細菌試験 (接種菌数確認)	0	NT	6.8	NT	10未満	$9.6 \times 10^3$	NT	
			32				6.9		10未満	$1.1 \times 10^4$		
			33				6.9		10未満	$1.3 \times 10^4$		
F	芽胞接種	30*	8	細菌・毒素試験	26	有	6.9	NT	10未満	$9.6 \times 10^3$	A+B	$1.2 \times 10^5$
			9		34	無	7.0		10未満	$2.4 \times 10^3$	A+B	$6.0 \times 10^4$
			16		34	無	6.8		10未満	$5.2 \times 10^3$	A+B	$4.0 \times 10^4$
			28		26	有	6.9		10未満	$5.8 \times 10^3$	A+B	$8.8 \times 10^4$
			29		34	無	6.8		10未満	$1.1 \times 10^3$	B	$1.9 \times 10^4$

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

\*: 30検体中5件体を無作為に抽出して検査

表6 蒸かし黒豆中に産生されたボツリヌス毒素

検体 番号	保存 日数	容器の 膨張	毒素型	マウス法	ELISA (ng/ml)		
				ipLD <sub>50</sub> /ml	A型	B型	毒素比
8	26 (12)	有	A+B	$6.0 \times 10^4$	248	319	1:1.3
9	34	無	A+B	$3.0 \times 10^4$	55	394	1:7.2
16	34	無	A+B	$2.0 \times 10^5$	28	3,400	1:121
28	26 (12)	有	A+B	$4.4 \times 10^4$	196	327	1:1.7
29	34	無	B	$1.0 \times 10^4$	15	173	1:12

( ) 内は膨張が確認された日数

表7 切り餅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	46	理化学試験	0	NT	5.4	0.98	NT	NT	NT	
			47				5.4	0.98				
			48				5.4	0.98				
A	無処理	3	40	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0	NT	NT	NT	10未満	10未満	ND	
			41						10未満	10未満	ND	
			42						10未満	10未満	ND	
B	無処理	3	43	保存試験 (未開封)	135	無 無 無		NT	10未満	10未満	ND	
			44						10未満	10未満	ND	
			45						10未満	10未満	ND	
C	芽胞非接種	3	34	細菌試験 (開封操作確認)	0	NT	5.5	NT	10未満	10未満	NT	
			35				5.5		10未満	10未満		
			36				5.5		10未満	10未満		
D	芽胞非接種	3	37	保存試験 (開封)	135	無 無 無		NT	10未満	10未満	NT	
			38						10未満	10未満		
			39						10未満	10未満		
E	芽胞接種	3	31	細菌試験 (接種菌数確認)	0	NT	5.5	NT	10未満	$5.5 \times 10^3$	NT	
			32				5.5		10未満	$7.1 \times 10^3$		
			33				5.5		10未満	$6.4 \times 10^3$		
F	芽胞接種		1	細菌・毒素試験	28	無 無 無 無 無	5.4	NT	10未満	$1.8 \times 10^4$	ND	
			2				5.4		10未満	$2.8 \times 10^4$	ND	
			3				5.2		10未満	$1.9 \times 10^4$	ND	
			4				5.4		10未満	$1.6 \times 10^4$	ND	
			5				5.4		10未満	$2.1 \times 10^4$	ND	
	芽胞接種		6	細菌・毒素試験	68	無 無 無 無 無 無 無 無	5.1	NT	10未満	$2.3 \times 10^4$	ND	
			7				5.2		10未満	$2.7 \times 10^4$	ND	
			8				5.0		10未満	$1.7 \times 10^4$	ND	
			9				5.2		10未満	$1.3 \times 10^4$	ND	
			10				5.1		10未満	$3.4 \times 10^4$	ND	
			11				5.0		10未満	$1.9 \times 10^4$	ND	
			12				5.1		10未満	$2.3 \times 10^4$	ND	
			13				5.2		10未満	$2.1 \times 10^4$	ND	
	芽胞接種	30	14	細菌・毒素試験	100			NT				
			15									
			16									
			17									
			18									
			19									
			20									
	芽胞接種		21									
			22	細菌・毒素試験	135			NT				
			23									
			24									
			25									
			26									
			27									
			28									
			29									
			30									

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

100日および135日保存は続行中

表8-1 煮豆の検査結果

検体 番号	pH	Aw		ボツリヌス菌	SPC (CFU/g)	クロストリジア (CFU/g)	好気性芽胞菌 (CFU/g)
		固形部分	溶液				
1	6.4	0.95					
2	6.4	0.95					
金 3	6.4	0.95					
4	6.4	0.95					
時 5	6.4	0.95					
6				(-)	10未満	1未満	10未満
豆 7				(-)	10未満	1未満	10未満
8				(-)	10未満	1未満	10未満
9				(-)	10未満	1未満	10未満
10				(-)	10未満	1未満	10未満
1	6.4	0.95					
2	6.4	0.95					
金 3	6.4	0.95					
4	6.4	0.95					
時 5	6.4	0.95					
6				(-)	10未満	1未満	10未満
豆 7				(-)	10未満	1未満	10未満
8				(-)	10未満	1未満	10未満
9				(-)	10未満	1未満	10未満
10				(-)	10未満	1未満	10未満
1	6.4	0.95					
2	6.3	0.95					
金 3	6.3	0.95					
4	6.3	0.95					
時 5	6.4	0.95					
6				(-)	10未満	1未満	10未満
豆 7				(-)	10未満	1未満	10未満
8				(-)	10未満	1未満	10未満
9				(-)	10未満	1未満	10未満
10				(-)	10未満	1未満	10未満
1	6.5	0.95					
2	6.6	0.95					
3	6.5	0.95					
丹 4	6.4	0.95					
波 5	6.4	0.95					
黒 6				(-)	10未満	1未満	10未満
豆 7				(-)	10未満	1未満	10未満
8				(-)	10未満	1未満	10未満
9				(-)	10未満	1未満	10未満
10				(-)	10未満	1未満	10未満

表8-2 煮豆の検査結果

検体 番号	pH	Aw		ボツリヌス菌	SPC (CFU/g)	クロストリジア (CFU/g)	好気性芽胞菌 (CFU/g)
		固形部分	溶液				
1	6.6	0.94					
2	6.6	0.95					
3	6.6	0.95					
丹	4	6.6	0.94				
波	5	6.6	0.94				
黒	6			(-)	10未満	1未満	10未満
豆	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満
1	6.5	0.95					
2	6.5	0.94					
3	6.5	0.95					
丹	4	6.6	0.95				
波	5	6.6	0.95				
黒	6			(-)	10未満	1未満	10未満
豆	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満
1	7.3	0.94	0.94				
2	7.3	0.94	0.95				
3	7.3	0.94					
丹	4	7.3	0.95				
波	5	7.3	0.94				
黒	6			(-)	10未満	1未満	10未満
豆	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満
1	6.8	0.94	0.94				
2	6.8	0.95	0.95				
3	6.8	0.95					
丹	4	6.8	0.95				
波	5	6.8	0.94				
黒	6			(-)	10未満	1未満	10未満
豆	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満

表8-3 煮豆の検査結果

検体 番号	pH	Aw		ポツリヌス菌	SPC (CFU/g)	クロストリジア (CFU/g)	好気性芽胞菌 (CFU/g)
		固形部分	溶液				
丹波黒豆	1	7.3	0.94	0.95			
	2	7.3	0.94	0.95			
	3	7.3	0.94				
	4	7.3	0.94				
	5	7.3	0.95				
	6			(-)	10未満	1未満	10未満
	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満
金時豆	1	6.4	0.96	0.96			
	2	6.5	0.96	0.96			
	3	6.5	0.96				
	4	6.5	0.96				
	5	6.5	0.96				
	6			(-)	10未満	1未満	10未満
	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満
金時豆	1	6.4	0.97	0.96			
	2	6.5	0.96	0.96			
	3	6.5	0.96				
	4	6.4	0.96				
	5	6.5	0.96				
	6			(-)	10未満	1未満	10未満
	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満
金時豆	1	6.5	0.96	0.96			
	2	6.5	0.97	0.96			
	3	6.5	0.96				
	4	6.4	0.96				
	5	6.5	0.97				
	6			(-)	10未満	1未満	10未満
	7			(-)	10未満	1未満	10未満
	8			(-)	10未満	1未満	10未満
	9			(-)	10未満	1未満	10未満
	10			(-)	10未満	1未満	10未満

表9 ざんなん水煮缶詰の検査結果

検体 番号	pH		Aw		ボツリヌス	SPC	クロストリジア	好気性芽胞菌	
	固形部分	溶液部分	固形部分	溶液部分	菌	(CFU/g)	(CFU/g)	(CFU/g)	
A	1	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
B	1	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
C	1	5.0	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	5.0	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	5.0	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	5.0	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	5.0	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
D	1	4.9	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.8	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.9	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.9	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
E	1	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.9	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
F	1	4.8	4.9	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.8	4.9	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.8	4.9	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.8	4.9	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.8	4.9	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
G	1	5.2	5.3	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	5.3	5.3	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	5.3	5.4	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	5.2	5.3	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	5.3	5.3	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
H	1	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.9	5.0	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
I	1	4.6	4.7	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	4.6	4.7	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	4.7	4.7	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	4.6	4.7	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	4.6	4.7	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
J	1	5.0	5.1	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	2	5.0	5.2	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	3	5.0	5.2	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	4	5.0	5.2	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満
	5	5.0	5.2	0.99	0.99	(－)	10未満	1未満	10未満

表10 容器包装詰常温保存の調査結果（大阪府）

商品名	保存方法	pH	Aw
ラーメン用メンマ	高温直射日光をさけて、涼しい場所	5.55	0.962
皮むき焼甘新含気食品	高温の所を避け、冷所に保存	5.82	0.956
さつまいも新含気食品	高温の所を避け、冷所に保存	5.70	0.951
あったかごはんHTST製法	高温直射日光を避け、常温で保存	6.84	0.988
麺好亭 コーン	冷暗所にて保存	6.61	0.977
かき鍋スープ	記載なし	4.85	0.919
燻しかつおうどんだし	冷所または冷蔵庫で保管	5.36	0.999
ふっくら炊きたてご飯	直射日光、高温多湿をさけ常温保存	6.51	0.991
タケノコ水煮	直射日光を避け湿気の少ない涼しい所	4.80	0.996
チンジャオロースー水煮	直射日光を避け湿気の少ない涼しい所	4.53	0.994
ぜんまい	直射日光を避け湿気の少ない涼しい所	4.46	0.994
にしん姿煮	冷所または冷蔵庫で保管	5.22	0.913
きんぴられんこん	高温の所を避け、冷暗所に保存	4.04	0.995

表11-1 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品 名	殺菌	形 状	クロストリジア/g	ポツリヌス菌 (毒素) /45g
Y1	ブラックペッパー マレーシア産	無	原型	4.8 x 10 <sup>3</sup>	(-)
Y2	ブラックペッパー インド産	無	原型	34	(-)
Y3	コリアンダー モロッコ産	無	原型	1.4 x 10 <sup>2</sup>	(-)
Y4	ジンジャー 中国産	無	スライス	2	(+) B型
Y5	ジンジャー インド産	無	原型	20	(+) C/D 型
Y6	ホワイトペッパー マレーシア産	無	原型	8	(-)
Y7	クミン インド産	無	原型	1	(-)
Y8	ナツメグ インドネシア産	無	原型	1未満	(-)
Y9	パプリカ チリ産	無	パウダー	1未満	(-)
Y10	レッドペルペッパー チリ産	無	フレーク	2	(-)

番号	品 名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y1	ブラックペッパー マレーシア産	無	100	90	
Y2	ブラックペッパー インド産	無	100	90	
Y3	コリアンダー モロッコ産	無	100	70	
Y4	ジンジャー 中国産	無	200	135	無し
Y5	ジンジャー インド産	無	100	75	有り
Y6	ホワイトペッパー マレーシア産	無	100	90	無し
Y7	クミン インド産	無	100	75	有り
Y8	ナツメグ インドネシア産	無	100	100	
Y9	パプリカ チリ産	無	200	140	
Y10	レッドペルペッパー チリ産	無	200	135	

サンプル使用量50 g



表11-2 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ボツリヌス菌 (毒素) /45g
Y11	ブラックペッパー ブラジル産	無	原形	1	(-)
Y12	ブラックペッパー インドマラバル産	有	原形	1未満	(-)
Y13	ホワイトペッパー インドネシア産	無	原形	24	(-)
Y14	ターメリックパウダー	無	パウダー	1	(-)
Y15	パセリフレーク アメリカ産	無	フレーク	1未満	(-)
Y16	タイム モロッコ産	無	原形	4	(-)
Y17	バジル エジプト産	無	カット	3.4 × 10 <sup>2</sup>	(-)
Y18	クローブ タンザニア産	無	原形	2	(-)
Y19	カルダモン インド産	無	原形	6	(-)
Y20	ガーリックミックス アメリカ産	無	ミックス	1	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y11	ブラックペッパー ブラジル産	無	100	85	
Y12	ブラックペッパー インドマラバル産	有	100	90	
Y13	ホワイトペッパー インドネシア産	無	100	90	
Y14	ターメリックパウダー	無	200	100	有り
Y15	パセリフレーク アメリカ産	無	400	200	有り
Y16	タイム モロッコ産	無	200	120	有り
Y17	バジル エジプト産	無	300	150	有り
Y18	クローブ タンザニア産	無	100	80	
Y19	カルダモン インド産	無	100	50	
Y20	ガーリックミックス アメリカ産	無	150	75	

サンプル使用量50 g

表11-3 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ポツリスス菌 (毒素) /45g
Y21	オールスパイス ジャマイカ産	無	原形	46	(-)
Y22	フェンネル 中国産	無	原形	3	(-)
Y23	唐辛子 中国産	無	原形	1未満	(-)
Y24	ブラックペッパー マレーシア産 殺菌品	有	原形	1未満	(-)
Y25	ジンジャー 中国産	無	スライス	2	(-)
Y26	ジンジャー荒挽き 中国産	無	荒挽き	3	(-)
Y27	ジンジャー荒挽き殺菌品 中国産	有	荒挽き	1未満	(-)
Y28	バジル	無	カット	19	(-)
Y29	メース インドネシア産	無	荒挽き	4	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y21	オールスパイス ジャマイカ産	無	100	90	
Y22	フェンネル 中国産	無	100	60	
Y23	唐辛子 中国産	無	150	100	
Y24	ブラックペッパー マレーシア産 殺菌品	有	100	90	
Y25	ジンジャー 中国産	無	150	100	有り
Y26	ジンジャー荒挽き 中国産	無	200	70	有り
Y27	ジンジャー荒挽き殺菌品 中国産	有	200	75	有り
Y28	バジル	無	300	170	有り
Y29	メース インドネシア産	無	200	120	

サンプル使用量50 g

表11-4 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ポツリヌス菌（毒素）/45g
Y30	バジル アメリカ産	無	カット	2	(-)
Y31	ガーリックフレーク 中国産	無	フレーク	5	(-)
Y32	ガーリック アメリカ産	無	グラインド	1	(-)
Y33	オニオンミックス アメリカ産	無	ミンス	1	(-)
Y34	オニオンチップ アメリカ産	無	チップ	2	(-)
Y35	マスタード カナダ産	無	原形	4	(-)
Y36	シナモン ベトナム産	無	フレーク	5	(-)
Y37	ブラックペッパー マレーシア産	無	原形	9	(-)
Y38	オレガノ トルコ産	無	原形	8	(-)
Y39	コリアンダー モロッコ産	無	原形	64	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y30	バジル アメリカ産	無	350	200	有り
Y31	ガーリックフレーク 中国産	無	200	50	無し
Y32	ガーリック アメリカ産	無	100	50	無し
Y33	オニオンミックス アメリカ産	無	150	50	
Y34	オニオンチップ アメリカ産	無	200	100	
Y35	マスタード カナダ産	無	100	90	
Y36	シナモン ベトナム産	無	100	75	
Y37	ブラックペッパー マレーシア産	無	100	90	
Y38	オレガノ トルコ産	無	300	150	無し
Y39	コリアンダー モロッコ産	無	100	70	

サンプル使用量50 g

表11-5 香辛料の検体明細

番号	品名	殺菌の有無	形状	ボツリヌス菌/45g
1	ターメリック インド、マドラス	無	原形	(-)
2	ブラックペッパー マレーシア	無	原形	(-)
3	ブラックペッパー マレーシア	有	粉末	(-)
4	ブラックペッパー インド	無	原形	(-)
5	ブラックペッパー インド	有	粉末	(-)
6	クミン イラン	無	原形	(-)
7	コリアンダー モロッコ	無	原形	(-)
8	セロリ インド	有	粉末	(-)
9	フェヌグreek インド	無	原形	(+) D 型
10	フェヌグreek インド	無	粉末	(-)
11	フェヌグreek インド	有	粉末	(-)
12	ナツメグ インドネシア	無	原形	(-)
13	ナツメグ インドネシア	有	粉末	(-)
14	オールスパイス ジャマイカ	無	原形	(-)
15	シナモン 中国	無	原形	(-)
16	シナモン 中国	無	粉末	(-)
17	シナモン 中国	有	粉末	(-)
18	クローブ マダガスカル	無	原形	(-)
19	クローブ マダガスカル	無	粉末	(-)
20	ローレル トルコ	無	原形	(-)
21	ローレル トルコ	無	粉末	(-)
22	ローレル トルコ	有	粉末	(-)
23	タイム モロッコ	無	原形	(-)
24	タイム モロッコ	有	粉末	(-)
25	クミン アルバニア	無	原形	(-)
26	タイム モロッコ	無	原形	(-)
27	セージ トルコ	無	粉末	(-)
28	オレガノ トルコ	無	粉末	(-)
29	ローズマリー トルコ	無	原形	(-)
30	ローレル トルコ	無	原形	(-)
31	メース インドネシア	無	原形	(-)

表12 香辛料へのボツリヌス菌添加回収試験

香辛料	測定菌数 (CFU/ml)	回収菌量/4 ml	回収率 (%)
セロリ	$2.2 \times 10^3$	$8.8 \times 10^3$	44
タイム	$2.7 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	55
フェヌグreek	$2.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	50

添加菌量 ;  $2.0 \times 10^4$  CFU/25 g

## 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

容器包装詰低酸性食品および香辛料のボツリヌス汚染実態調査と

ボツリヌス菌芽胞接種試験

分担研究者 甲斐明美 東京都健康安全研究センター・微生物部  
研究協力者 門間千枝 東京都健康安全研究センター・微生物部  
柴田幹良 東京都健康安全研究センター・微生物部  
矢野一好 東京都健康安全研究センター・微生物部

### 研究要旨

容器包装詰低酸性食品（主に総菜類）10 品目 66 検体，香辛料 69 検体，輸入容器包装詰低酸性食品（主にエスニック食品）90 検体について，ボツリヌス菌を中心に汚染実態調査を行った結果，香辛料の黒胡椒 1 検体（未殺菌原形，原産国インド）から D 型ボツリヌス菌を検出した．その他の食品からは，ボツリヌス菌は検出されなかったが，好気性芽胞菌やクロストリジアが検出された検体もあり，必ずしも十分な加熱がなされていないことが示唆された．また，pH および水分活性(Aw)の値から，ボツリヌス I 群菌の毒素産生可能範囲内にある検体も多い成績であった．これらの食品にボツリヌス菌芽胞が生残する可能性があり，もし生残し増殖の機会があった場合，ボツリヌス毒素産生の可能性，あるいはボツリヌス食中毒の危険性のあることが示唆された．

次に，気密性を有する容器包装詰の低酸性食品，特に不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（pH が 4.6 を超え，かつ，水分活性が 0.94 を超える若干の気体透過性を有する容器包装で，密封後 120℃，4 分に満たない条件で加圧加熱殺菌する食品）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）を接種後，30℃で保存培養して，ボツリヌス菌の増殖および毒素産生性の評価を行った．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り，密封された状態においてボツリヌス毒素が産生された．以上の結果から，食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残し増殖の機会があった場合，ボツリヌス毒素が産生され，ボツリヌス食中毒につながる可能性が示唆された．これらの食品に関しては，容器包装詰加圧加熱殺菌食品に準ずる衛生管理，あるいは加熱殺菌条件の妥当性の評価や保存・流通条件（例えば冷蔵保存）を検討する必要がある．

### A. 研究目的

最近，ライフスタイルや食生活が多様化する一方，製造・流通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容器包装詰低酸性食品が増加し，多く利用されるようになっている．一方で，室温で流通する気密性を有する容器包装詰低酸性食品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．そこで，容器包装詰低酸性食品，中でも総菜類，香辛料，輸入容器包装詰低酸性食品，特にいわゆるエスニック食品

について，ボツリヌス菌を中心に汚染実態調査を行う．

また，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するために，「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」および切り餅（個別包装）を対象に，細菌汚染状況を調べると共に，ボツリヌス菌芽胞の接種試験を行い，増殖性および毒素産生性を評価する．

### B. 研究方法

## 1. 供試食品

### 1-1. ボツリヌス汚染実態調査

#### 1) 容器包装詰食品

国内産の容器包装詰低酸性食品に分類される総菜類（のり佃煮、たくあん、みそ汁、金時豆、昆布つくだ煮、いわし甘露煮）66検体を供試した（表1-1～2）。

#### 2) 香辛料

2業者から提供された香辛料69検体を供試した（表2-1～2）。

#### 3) 輸入容器包装詰低酸性食品

東京都内の小売店で常温で販売されていたエスニック食品等の輸入容器包装詰低酸性食品（120℃、4分間の加熱殺菌処理がなされていない製品）90検体を購入し、供試した。

### 1-2. ボツリヌス菌の芽胞接種試験

#### 1) 不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品

不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品、すなわち「pHが4.6を超え、かつ、水分活性が0.94を超える若干の気体透過性を有する容器包装で、密封後120℃、4分に満たない条件で加圧加熱殺菌する食品」として製造業者より購入した4品目、「さばの塩焼き（E）」、「甘栗（F）」、「牛タン・燻製（G）」、「豚生姜煮（H）」の各30検体計120検体を用いた（写真2）。各検体には食品品目ごとにNo. 1～No.30まで番号を付し、後述の試験に供した。

さらに、追加試験として、「牛タン・燻製」30検体（A：20検体、B：10検体）および前述した供試試料「牛タン・燻製（G）」30検体の内予備の4検体（No.26～No.30）計34検体を供試した。

#### 2) 容器包装詰低酸性食品

室温保存の容器包装詰低酸性食品である市販の「切り餅」1品目（個別包装の餅46個）を供試した。

## 2. 理化学試験

### 1) 水分活性

水分活性は、水分活性測定装置 デカゴン・アクアラブ CX-3、または ロトロニック製 HYGRO-LAB で測定した。

### 2) pH

pH は、試料に等量の蒸留水を加え十分に混和した後、pH メーター（東亜電波工業製・HM-50V）で測定した。

### 3) 熱伝達

熱伝達の測定には、記録式温度計（エラブ杜製、CMC-821 型）に、温度センサーとしてステンレス保護管付き熱電対（外径 1.2mm）を用い、缶詰協会研究所で測定した。

## 3. 培地および試薬

### 1) 標準寒天培地

市販の標準寒天培地（栄研化学）を用いた。

### 2) クロストリジア測定用培地

市販のクロストリジア測定用培地（日水製薬）を用いた。ただし、濃度は1000ml あたり 46.9g（常法の2/3 量）とした。

### 3) CW 寒天培地

市販の CW 寒天培地（カナマイシン不含、日水製薬）に、5%卵黄を加えて調製した。

### 4) MYP 寒天培地

市販の MYP 寒天培地（日水製薬）に、5%卵黄を加えて調製した。

### 5) デゾキシコレート培地

市販のデゾキシコレート培地（日水製薬）を用いた。

### 6) クックドミート培地

市販のクックドミート培地（Difco）に、0.2%ブドウ糖と 0.3%可溶性でんぷんを添加したものをを用いた。

### 7) ゼラチン緩衝液

リン酸1水素ナトリウム 4g を精製水 1,000ml に溶解し、pH6.2 に調整後、ゼラチン 2g を加え、121℃、15分滅菌したものをを用いた。

### 8) でんぷん培地、ルゴール液の調製

普通寒天（日水製薬製）に可溶性でんぷんを1%になるように添加した。ルゴール液は、蒸留水 300ml にヨード 1g、ヨウ化カリウム 2g を溶解したものを使用した。

### 9) 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から購入したものをを用いた。

### 10) マウス

ボツリヌス毒素検出には、ddy 系マウス（雌、体

重 約 20 g)を用いた。

#### 4. ボツリヌス汚染実態調査

各食品について、pH, Aw, 生菌数, クロストリジウム数, 好気性芽胞菌数, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), ウエルシュ菌数, ボツリヌス毒素, ボツリヌス菌の検査を行った。

##### 4-1. 試料の調製

試料の全量が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。

香辛料については, 検体 50g を供試し, 図 1 に従って検査を行った。

##### 4-2. 菌数の測定

###### 1) 生菌数

上記検液 2ml を滅菌リン酸緩衝ペプトン水 8ml に加え, 検体の 10 倍希釈液を作製した。これをさらに, 滅菌リン酸緩衝ペプトンで 10 倍段階希釈後, 各希釈列の 1ml ずつを 2 枚のシャーレにとり, 標準寒天培地 15~20ml を加えよく混和後, 固化した。さらに同培地で重層し, 固化, 乾燥後, 37℃, 48 時間培養して生菌数を算出した。

###### 2) 大腸菌群数

試料液 1ml ずつを 2 枚のシャーレにとり, デゾキシコレート培地 15~20ml 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, 37℃, 24 時間培養した。

###### 3) クロストリジア

生菌数の測定時に作製した試料液を使用した。滅菌パウチ袋(各希釈試料にそれぞれ 2 枚)に, 55℃に保温したクロストリジア寒天培地 10ml または 25ml をとり, 10 倍希釈液 1ml を加え, よく混和した後, 平板に固化した。これらは 37℃, 1~7 日間培養後, 出現した黒色集落を数えた。

増菌培養は, クックドミート培地(中試験管に 10mL 分注)で行った。クックドミート培地 4 本に試験原液各 1mL を入れ, 2 本は 65℃20 分加熱後冷却, 残り 2 本は加熱処理を行わずに 30℃で 1 週間嫌気培養した。培養後, 12,000rpm 10 分間冷却

遠心後, 沈渣を CW 寒天培地に分離し, 2~3 日培養した。培養後出現した集落の内, 嫌気的条件下での発育(+), 好気的条件下での発育(-)および芽胞形成の確認を行い, クロストリジアと判定した。

更に詳細な同定は, 「嫌気性菌の分離と同定法」(日本細菌学会教育委員会編, 菜根出版)に従い, 運動性, インドール産生, 硝酸塩還元, レシチナーゼ産生, リパーゼ産生, ゼラチン液化, 肉片の消化, 牛乳の凝固・消化, 糖発酵(果糖, ブドウ糖, 乳糖, マルトース, マンニット), エスクリン加水分解等を調べて行った。

###### 4) 好気性芽胞菌数

生菌数の測定時に調製した試料液を 65℃20 分加熱後冷却して供試した。これらの各 1ml を 2 枚のシャーレにとり, 標準寒天培地 15~20ml 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, 固化後, 37℃, 48 時間培養し, 出現した集落数を計数し好気性芽胞菌数を算出した。

###### 5) *B. cereus* 菌数

生菌数の測定時に調製した試料液を MYP 寒天培地に 0.1ml 塗抹し, 37℃, 24 時間培養後, 出現した *B. cereus* 菌数を測定した。セレウスの血清型別試験は, Talar&Gilbert の血清型, および寺山らの血清型診断用血清を用いて行った。でんぷん分解能試験は, でんぷん培地に被検菌株を画線培養し, 菌の発育後, ルゴール液を滴下して調べた。

###### 6) ウエルシュ菌数

生菌数の測定時に調製した試料液を CW 寒天培地に 0.1ml 塗抹し, 37℃, 24 時間嫌気培養後, 出現したウエルシュ菌数を測定した。

##### 4-3. ボツリヌス毒素の検出および増菌培養によるボツリヌス菌検査

###### 1) 食品中の毒素検出試験

試料原液を 12,000rpm, 10 分間冷却遠心分離後, 上清をゼラチン緩衝液で 2 倍希釈したものを試料とし, その 0.5mL をマウス(1 群 2 匹)に腹腔内接種した。マウスの生死は 7 日間観察した。

香辛料は, 検体の 2 倍希釈液を 3,000rpm, 20 分遠心分離し, 沈渣をクックドミート培地 2 本に接種した。その内 1 本は未処理のまま, もう 1 本は 70℃15 分の加熱処理を行った後, 30℃で 1 週間嫌気

培養した。培養後、上清を 12,000rpm, 4℃で 10 分間遠心分離し、上清を試料として、ボツリヌス毒素検査（上述）を行った（図 1）。

## 2) 増菌培養によるボツリヌス菌検査

試験原液各 0.5mL をクックドミート培地（中試験管に 10mL 分注）2 本に接種した。その内 1 本は未処理のまま、もう 1 本は 65℃20 分の加熱処理後、30℃で 1 週間嫌気培養した。培養後、上清を 12,000rpm 4℃で 10 分間遠心分離し、上清をゼラチン緩衝液で 2 倍希釈して、0.5ml ずつ 2 匹のマウス腹腔内に接種した。マウスの生死は 7 日間観察した。

## 3) ボツリヌス毒素の確認と型別試験

ボツリヌス毒素試験の結果、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、抗 A, B, C1, D, E, F, G 型の各抗毒素を用いて中和試験を行い毒素型の確認を行った。同時に、加熱処理（100℃10 分）によるボツリヌス毒素の失活を確認した。なお、試料はゼラチン緩衝液で、血清は滅菌生理食塩水で 2 単位になるように希釈して用いた。

ボツリヌス毒素定量試験は、LD<sub>50</sub> 法を用いて行った。LD<sub>50</sub> は、1 単位の抗毒素血清で中和できる試料の最高希釈倍数値とした。

## 5. ボツリヌス芽胞接種試験

### 5-1. 供試菌株および接種用芽胞液の調整

不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品 4 品目の芽胞接種試験では、*Clostridium botulinum* A 型株 4 株（62A ATCC 株, 62A NFPA 株, 90A 株, B1G4 株）および B 型 1 株（213B）の計 5 株の混合芽胞液を、切り餅 1 品目の接種試験には、ボツリヌス A 型菌 3 株（62A ATCC 株, 62A NFPA 株, 36A 株）、B 型菌 2 株（213B 株, Okra 株）の混合液を用いた。

これらの供試菌株の芽胞液は、本研究班の分担研究者である武士甲一博士によって調製後、凍結保存されていたものである。

### 5-2. 不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品へのボツリヌス芽胞の接種および対照試料の作製

1 品目あたり検体 14 袋（No.1-14）の外側をアルコールでよく拭き、その内 8 袋（No.1-8）に、芽胞液

20  $\mu$ 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。これらの操作は、缶詰協会研究所で行った。

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℃、20 分加熱処理した。加熱時間については、予め供試食品の熱伝達を測定し、食品の中心が 80℃に達するまでの時間（カムアップタイム）を加算した。これらの加熱処理は缶詰協会研究所で行い、直ちに東京都健康安全研究センターに搬送した。

### 5-3. 「切り餅」へのボツリヌス芽胞の接種および対照試料の作製

「切り餅」1 品目（個別包装した 46 個）を用いて、ボツリヌス芽胞接種試験を行った。ボツリヌス毒素産生性の有無の最終確認は、賞味期限（10 ヶ月）の 1.5 倍の日数経過後とした。

1 個ずつ個別包装された切り餅について、あらかじめ調整し 80℃20 分加熱処理した芽胞混合液を 20  $\mu$ L/個（1 袋）接種した検体（33 個）、および滅菌蒸留水を接種した検体（1 個）を作成した。ボツリヌス菌芽胞の接種は缶詰協会で行った（図 1）。この他、開封・未接種群、および未開封・未接種群を用意した。用意した検体は以下のとおりである。

開封・接種群	: 33 個
(30 個は培養用, 3 個は接種確認用)	
開封・滅菌蒸留水接種群	: 1 個
開封・未接種群	: 2 個
未開封・未接種群	: 10 個
(5 個は対照として培養, 5 個は初期菌数確認用)	

### 5-4. ボツリヌス芽胞接種試験

ボツリヌス菌芽胞を添加した食品は、30℃で培養、経時的に容器の異常（膨張、液漏れ等）の有無、pH、Aw、生菌数、クロストリジウム数、好気性芽胞菌数、*Bacillus cereus* (*B. cereus*)、ウエルシュ菌数を前述のとおり調べた。ボツリヌス毒素検査は、ボツリヌス毒素の定性試験の結果、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抗 A 型抗毒素および抗 B 型抗毒素を用いて中和試験を行



い毒素型の確認を行った。

## 6. 倫理面への配慮・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、東京都健康安全研究センター安全管理規程に基づいて、専用の実験室で実施した。使用した実験器具は、実験後速やかにオートクレーブ(121℃, 20 分間)した後、廃棄した。

## C. 結果

### 1-1. ボツリヌス汚染実態調査

#### 1) 容器包装詰め食品

国内産の容器包装詰低酸性食品に分類される総菜類(のり佃煮, たくあん, みそ汁, 金時豆, 昆布つくだ煮, いわし甘露煮) 66 検体について調べた結果を表 1-1~2 に示した。

食品 66 検体のいずれからでも、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、検査した 66 検体の全てが pH4.6 以上であり、Aw 0.94 以上でボツリヌス I 群菌の毒素産生可能範囲内にある検体が 34 検体 (51.5%) 認められた。一般生菌数は 18 検体 (27.3%) が  $1.0 \times 10^1$  cfu/g 以上であった。また、好気性芽胞菌は 19 検体 (28.8%), クロストリジアは 2 検体 (3.0%) が陽性であった。*B. cereus* は、ほうれん草汁 3 検体中 3 件、しいたけ昆布 3 検体中 3 件の計 6 件が陽性で、菌数は、ほうれん草汁では  $1.4 \sim 2.1 \times 10^2$  cfu/g, しいたけ昆布では  $3.0 \sim 8.0 \times 10^1$  cfu/g であった。

これら陽性であった検体の多くが保存食品であったことから、必ずしも十分な加熱がなされていないことが示唆された。

#### 2) 香辛料

2 業者から提供された香辛料 69 検体の検査成績は、表 3-1~2, および図 2 に示した通りである。

香辛料では、黒胡椒 1 検体(黒胡椒 MG-1, 未殺菌原形, 原産国インド)から D 型ボツリヌス菌が検出された(写真 1-1~2)。しかし、その粉末製品(黒胡椒 MG-1 KS, 粉末殺菌, 原産国インド)はボツリヌス菌陰性であった。

一般生菌数と好気性芽胞菌数は、いずれも未殺

菌原形検体で平均  $10^6$  cfu/g, 未殺菌粉末検体で平均  $10^4$  cfu/g, 殺菌粉末検体で平均  $10^1$  cfu/g であった。殺菌製品は、未殺菌製品に比べ細菌汚染は低い成績であったが、殺菌された粉末からもクロストリジアをはじめ多くの菌が検出されたことから、殺菌不十分あるいはその後の二次汚染が疑われた。

### 3) 輸入容器包装詰低酸性食品

東京都内の小売店で常温で販売されていたエスニック食品等の輸入容器包装詰低酸性食品(120℃, 4 分間の加熱殺菌処理がなされていない製品) 90 検体について、ボツリヌス菌を中心に検査を行った成績を表 4-1~5 に示した。90 検体からボツリヌス毒素およびボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、pH および水分活性(Aw)の値から、ボツリヌス I 群菌が毒素を産生できる範囲内にある検体が 60 検体 (66.7%) 認められた。また、クロストリジア陽性 ( $1.0$  cfu/g 以上) は 10 検体

(11.1%), 好気性芽胞菌陽性 ( $1.0$  cfu/g 以上) は 31 検体 (34.4%) であった。芽胞菌汚染率は食品群により偏りが認められ、腐乳(豆腐の発酵食品)や多数の香辛料を使用した調味料等で高かった。

### 1-2. ボツリヌス菌の芽胞接種試験

#### 1) 不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品

不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品 4 品目、「さばの塩焼き (E)」, 「甘栗 (F)」, 「牛タン・燻製 (G)」, 「豚生姜煮 (H)」の概要を写真 2 に、ボツリヌス菌接種試験の成績を表 5-1~5 にまとめた。これらの食品に接種した芽胞菌数は  $4 \sim 6 \times 10^5$  cfu/袋であった。

##### (1) さばの塩焼き (E)

実験開始前は、水分活性は 0.97~0.98 以上、pH6.3, 生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10cfu 未満/g であった。培養 10 日~22 日後に芽胞接種群の 5 検体すべてにガス発生による膨張が認められた。膨張品の生菌数はすべて 10cfu 未満 cfu/g であったが、ボツリヌス菌数は  $3.5 \times 10^6 \sim 4.1 \times 10^7$  cfu/g で、菌の増殖が認められた。毒素試験では、5 検体すべて A 型毒素の産生が確認された。その毒素量(LD<sub>50</sub>)は、300, 370 の低値群と 1630, 1850, 1900 の高値群に分かれた。

培養後の pH は 6.4~6.5 であり、培養していない開封芽胞接種群や芽胞未接種群の 6.3~6.4 に比較

して若干高くなっていた。水分活性値は 5 検体とも 0.96 であり、保存培養前（芽胞未接種検体、開封品および未開封品）0.97～0.98 以上と比較して、若干低くなっていた。

対照の芽胞未接種検体は 86 日後まで膨張は認められず、生菌数およびボツリヌス菌数は 10cfu 未満/g、ボツリヌス毒素の産生も認められなかった。

## （2）甘栗（F）

実験開始前は、水分活性 0.98 以上、pH5.8、生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10cfu 未満/g であった。芽胞接種群では、培養 86 日経過後においても 5 検体すべてに袋の膨張は認められなかった。86 日後の検体では、生菌数 10cfu 未満/g、ボツリヌス菌数  $4.5 \times 10^3 \sim 2.6 \times 10^4$  cfu/g で、このボツリヌス菌数は、保存試験前の  $2.4 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^4$  cfu/g とほぼ同じであった。また、この 5 検体では、ボツリヌス毒素の産生も認められず、水分活性および pH 値の変化も認められなかった。

この実験では、ボツリヌス芽胞液を甘栗の表面に接種したが、その後、栗の中に接種して再検討した結果、ボツリヌス毒素の産生が認められた。

## （3）牛タン・燻製（G）

実験開始前は、水分活性 0.96、pH6.3～6.4、生菌数は、9 検体中 7 検体は 10cfu/g 未満、2 検体は  $1.1 \times 10^2$  cfu/g、および  $2.5 \times 10$  cfu/g、ボツリヌス菌数は 10cfu 未満/g であった。保存培養後 37 日で 5 検体中 2 検体に膨張が認められたが、他の 3 検体は 71 日まで膨張は認められなかった。この 3 検体は 71 日で検査に供した。ボツリヌス菌数は膨張があった 2 検体が 10cfu 未満～ $3.2 \times 10^2$  cfu/g、膨張が認められなかった 3 検体は  $4.7 \times 10^2 \sim 5.6 \times 10^3$  cfu/g であった。しかし、5 検体ともに A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は 80～700 LD<sub>50</sub> であった。

培養後の pH は 6.0～6.2 で若干高くなっていた。水分活性値は 28 日あるいは 30 日培養後においても変化はみられなかった。

なお、開封芽胞非接種群において、86 日の保存培養試験の検体でセレウス菌が  $1.1 \times 10^4$  cfu/g 検出された。分離されたセレウス菌は、血清型 Tailar & Gilbert 1 型、でんぷん分解能陰性であった。

## （4）豚生姜煮（H）

実験開始前は水分活性 0.96、pH5.6～5.7、生菌

数およびボツリヌス菌数ともに 10cfu 未満/g であった。培養 26 日～30 日後に芽胞接種群の 5 検体すべてにガス発生による膨張が認められた。膨張品の生菌数は 10cfu 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は  $1.2 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^3$  cfu/g であった。この値は、接種したボツリヌス菌数  $1.3 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^4$  cfu/g に比較して減少していた。5 検体すべて A 型毒素が確認され、毒素量は 2300～6400 LD<sub>50</sub> であった。この毒素量は他の食品と比較して高い値であった。

培養後の pH は 6.0～6.2 でやや高くなっていたが、水分活性値に変化は認められなかった。

対照群では、86 日後まで膨張が認められず、生菌数およびボツリヌス菌数は 10cfu 未満/g、ボツリヌス毒素の産生も認められなかった。

## （5）食品 G（牛タン・燻製）の保存試験

最初の実験で、保存試験 86 日目の検体でセレウス菌が  $1.1 \times 10^4$  cfu/g 検出されたので、さらに 30 検体（袋）について保存試験を行った。7 日～18 日間培養したが、袋の膨張はみられず、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌は検出されなかった。2 検体に外観上「粘り」が認められたが、これらの生菌数は 10 未満であった（表 6）。

## 2）容器包装詰低酸性食品

室温保存の容器包装詰低酸性食品である市販の「切り餅」1 品目試験成績を表 7-1～4 に示した。実験開始前の餅の生菌数は、10 未満 cfu/g、クロストリジア数は 1 未満であった。ボツリヌス芽胞接種試験初発時の菌数測定では、生菌数は 10 未満 cfu/g、未接種群のクロストリジア数は 10 未満 cfu/g、接種群では  $2.2 \sim 2.4 \times 10^4$  cfu/g であった。

接種後培養 42 日目で、対照群も含めて全ての検体で袋の膨張が認められたが、生菌数は 10 未満 cfu/g、クロストリジア数は  $1.0 \sim 2.2 \times 10^4$  cfu/g、ボツリヌス毒素の産生は確認されなかった。

## D. 考察

最近、室温で流通する気密性を有する容器包装詰低酸性食品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。本研究では、全国的に流通している容器包装詰低酸性食品の内、総菜類について、品目毎のロット差および同一ロ

ットの中での差異等に注目して、ボツリヌス菌汚染実態調査を行った。

食品 10 品目 66 検体について調べた結果、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌の検出された検体はなかった。しかし、検査した 66 検体のすべてが pH4.6 以上で、Aw0.94 以上のものが 34 検体 (51.5%) だった。容器包装詰低酸性食品で問題になるボツリヌス I 群菌の発育条件 (毒素産生条件) は、pH4.6 以上、Aw0.94 以上である。今回の調査において pH および Aw の条件で、ボツリヌス I 群菌が発育し毒素を産生できる食品が 34 検体 (51.5%) だった。これらの食品では、もしボツリヌス芽胞が存在した場合、毒素産生に至る可能性のあることが示唆された。また、同一品目で同一ロットの中で、Aw が「0.94 以上」と「0.94 未満」に分かれた食品があった。これらの検体においても、ボツリヌス芽胞が存在した場合、わずかな数値の差異および pH や塩分濃度、細菌叢等他の条件が互いに影響し、同一ロット中の一部の食品で毒素産生に至る可能性があり、同一品目で同一ロットにおいても複数の食品を検体として調べる必要性があることが再確認された。また、必ずしも加熱が十分になされていないことが示唆された。

次に、容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌汚染の原因となる可能性のある香辛料について、ボツリヌス芽胞汚染実態調査を行った。調査する香辛料は、当研究所で平成 10～11 年にかけて行った実態調査結果を基に検体を選んだ。すなわち、平成 10～11 年の実態調査で、クロストリジア陽性数が、輸入業者 A の製品では 61.5%、輸入業者 C では 41.8%、輸入業者 B では 0%と、香辛料輸入業者により大きな差が認められたことから、取り扱い業者により殺菌の有無およびその方法が異なる可能性を考え、取扱業者および殺菌の有無を区別して検体を選定した。

香辛料 69 検体について検査した結果、未殺菌の原形香辛料 (取り扱い業者 D) 14 検体中 1 件 (黒胡椒、原産国インド) から D 型ボツリヌス菌が検出された。さらに、クロストリジア、*B. cereus*、ウエルシュ菌等が高率に検出されたこと、検出されたクロストリジアの中には、ボツリヌス菌と類似している *C. sprogenes* が 7 検体から分離されたことから、香辛料がボツリヌス菌に汚染される可能性

のあることが示唆された。

殺菌された粉末検体においても、クロストリジアは、取り扱い業者 D の検体では 25.0%、取り扱い業者 E では 56.7%が陽性であった。また、ウエルシュ菌も業者 D では 25.0%、業者 E では 10.0%の検体から検出された。検体ごとにばらつきはあるものの、取扱業者により細菌汚染にある程度の差異が認められた。

以上の結果より、殺菌により菌数は減少しているが、芽胞菌等は生残していることが明らかとなった。また、*C. sprogenes* と推定されるクロストリジアが 2 検体から分離されたことから、殺菌された粉末香辛料においても、ボツリヌス菌に汚染される可能性のあることが示唆された。今回供試した検体の種類および原産国の差異は特にみられなかった。

殺菌方法については、取り扱い業者 E のラベルには「気流殺菌」と明記してあった。この殺菌法は、気流間を流れる加熱水蒸気に粉粒体食品を投入して移送中に瞬間殺菌するものである。「気流殺菌装置」は、種々の食品に適用されているが、香辛料は他の食品に比べ初発菌数が多いため、殺菌条件はやや強くなること、加熱による精油成分等の飛散を少なくするために原形または粗挽きの状態で殺菌した後、無菌的に粉碎処理することが推奨されている (寺山正典著、「熱殺菌のテクノロジー」高野光男、土戸哲明編、サイエンスフォーラム)。しかし、殺菌した粉末の香辛料から、好気性芽胞菌、クロストリジア、ウエルシュ菌が検出されたことから、殺菌後の二次汚染あるいは殺菌不完全の可能性が示唆された。

さらに、香辛料を多量に使用したエスニック料理、アジアンテーストの料理の製品や半製品が多数流通し利用されていることから、ボツリヌス菌を中心に汚染実態調査を行った。

小売店で購入した供試食品 90 検体からは今回の検査ではボツリヌス菌は検出されなかった、細菌学的検査結果については食品群によって大きな差が認められた。

特に細菌学的 (芽胞菌) 汚染が最も認められたのは「腐乳」であった。今回の検査では腐乳からボツリヌス菌は検出されなかったが、クロストリジア、好気性芽胞菌とも高率に検出された。しか

も、4 検体 (30.8%)は pH4.6 以上、Aw0.98 以上であり、ボツリヌス芽胞が存在した場合、菌が発育し毒素を産生する条件であった。腐乳は、一般的に中国で粥等に混せて喫食されている。中国では 1958 年～1983 年の 25 年間に 986 例のボツリヌス食中毒が発生し、その 90%は北部の新彊ウイグル自治区で、74%は臭豆腐（腐乳の一種）等の発酵豆製品が原因食品であると報告されている (Ying,S.,and Shuyan,C.;Botulism in China.Rev.Infect.Dis. 8.984, 1986)。今後、流通、保存状態の改善、取り扱い方法等を注意することを喚起することが必要である。

「調味料」においては、ペースト状調味料から、好気性芽胞菌数、クロストリジア、*B.cereus* が検出されたが、pH4.6 以下または Aw0.94 以下であり、ボツリヌス芽胞が存在したとしても菌の発育ができない条件であると考えられた。しかし、当研究所が 1998 年～2003 年に調味料 289 検体調べた成績では、瓶詰めのトムヤムペースト（タイ産）から F 型ボツリヌス菌、カレーペースト（インド産）から D 型ボツリヌス菌を検出している。今回の成績からもクロストリジア、好気性芽胞菌ともに検出されており、ボツリヌス菌芽胞の汚染の可能性のある食品と考えられた。

さらに、今回供試した検体は、全体的に芽胞菌に対する十分な加熱がされておらず、加熱に強いボツリヌス芽胞が生残している可能性があることが示唆された。これらの食品は、直接そのまま喫食する場合もあるが、素材として調理に用いられる食品が比較的多いと推定された。今回の検査で pH または Aw の値がボツリヌス芽胞の発育が抑えられる範囲であっても、それを使った食品の調理後の状態が pH4.6 以上かつ Aw0.94 以上でボツリヌス菌の発育条件が揃えば、ボツリヌス毒素を産生し、ボツリヌス食中毒が発生する可能性があると考えられる。

次に、容器包装詰低酸性食品を対象にボツリヌス菌芽胞の接種実験試験を行い、リスク評価を行った。最初に、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」を対象とした。これらの食品の水分活性、pH はいずれもボツリヌス菌が十分発育できる値であった。接種試

験方法は、製品にボツリヌス菌芽胞液を接種し、再密封した製品を供試した。また接種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 型菌と B 型菌の計 5 株)を用い、比較的多量の芽胞 ( $10^3 \sim 10^4$ cfu/g) を接種し、培養温度 30℃で評価した。

その結果、保存培養期間が異なるものの、いずれも密封された状態において、ボツリヌス毒素の産生が認められた。最も産生量の多かったのは、食品 H(豚の生姜煮)で 2300～6400 LD<sub>50</sub>、食品 E (サバの塩焼き) 300～1900LD<sub>50</sub>、食品 G (牛タン燻製) 80～700LD<sub>50</sub> (牛タン燻製) であった。このように産生毒素量は食品によりかなり異なっていた。また、包装袋の膨張の有無にかかわらずボツリヌス毒素の産生が認められた。

牛タンでは、121℃、4 分加熱済みと袋に明記してあるにも関わらず、培養試験を行っていない検体 6 検体中 2 検体、および保存培養試験を行った全ての検体の生菌数は  $10^2 \sim 10^4$ cfu/g であった。さらに、開封芽胞非接種群、86 日の保存試験検体でセレウス菌が  $1.1 \times 10^4$ cfu/g 検出された。これらの成績からこの食品は十分に加熱されていないことが示唆された。さらに、同じ製造会社の別の食品（他の分担研究者が検査をしたもの）から A 型ボツリヌス菌が検出された。

これらの成績から「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」においては、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、ボツリヌス毒素の産生、ボツリヌス食中毒が発生する可能性が十分にあることが示唆された。今後、加熱殺菌条件の妥当性の評価や、冷蔵保存・流通条件等を検討する必要がある。

切り餅のボツリヌス菌芽胞接種実験の結果については、まだ実験継続中であるが 42 日経過した時点ではボツリヌス毒素の産生は陰性であった。クロストリジア数の変化はなく、接種したボツリヌス菌がそのまま生残しているものと考えられた。

## E. 結論

1. 容器包装詰低酸性食品 10 品目 66 検体、香辛料 69 検体、エスニック食品を中心に輸入容器包装詰低酸性食品 90 検体について、ボツリヌス菌を中心に汚染実態調査を行った結果、以下の点が明