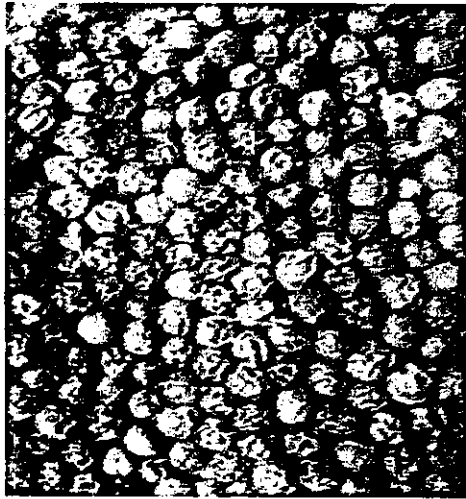
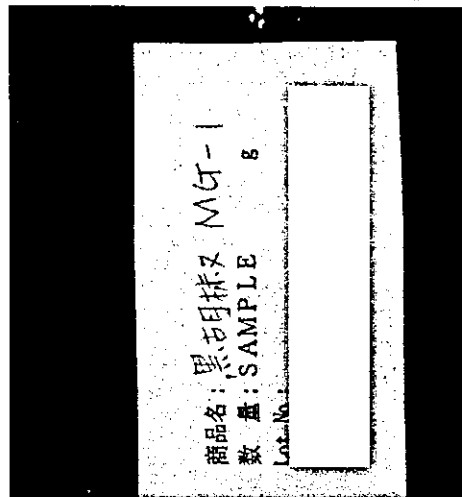
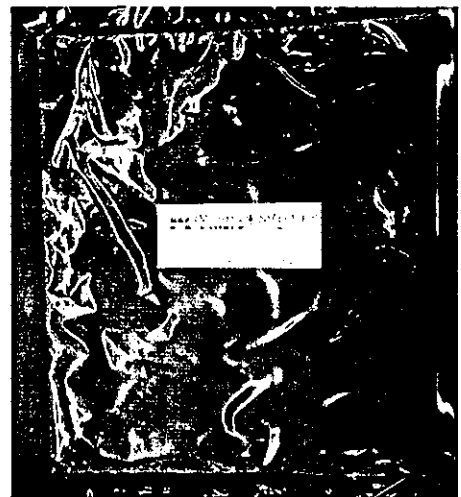
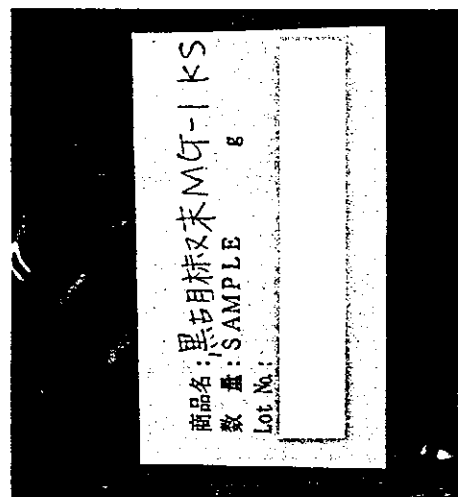


写真1-1 黒胡椒 MG-1 (原形) : ポツリヌス菌陽性




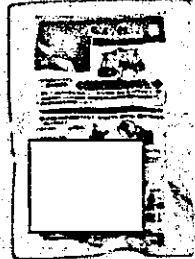

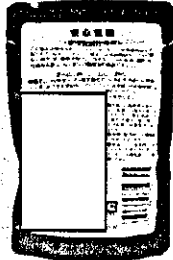

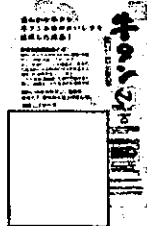


(拡大)

写真1-2 黒胡椒 MG-1 KS (粉末) : ポツリヌス菌陰性



(拡大)

写真2 ポツリヌス菌芽胞添加試験用の供試食品

品目記号 E サバの塩焼(2 切入り)			
容器	透明パウチ(平袋)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>表</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>裏</p>  </div> </div>	
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	220mm×150mm		
賞味期限	03.02.05		
総重量(g)	111.0~128.7		
pH	6.3		
Aw	0.97~0.98		
品目記号 F 甘栗(50g)			
容器	アルミパウチ(スタンディング)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>表</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>裏</p>  </div> </div>	
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	148mm×98mm		
賞味期限	表示なし		
総重量(g)	55.5~58.2		
pH	5.8		
Aw	0.98		
品目記号 G 牛タンくん製(40g, 加熱食肉製品(120℃, 4分))			
容器	不透明パウチ(平袋)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>表</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>裏</p>  </div> </div>	
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	240mm×168mm		
賞味期限	表示なし		
総重量(g)	60.4~63.2		
pH	6.3~6.4		
Aw	0.96		
品目記号 H 豚生姜煮(60g)			
容器	透明パウチ(平袋)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>表</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>裏</p>  </div> </div>	
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	210mm×138mm		
賞味期限	03.03.21		
総重量(g)	88.3~95.4		
pH	5.6~5.7		
Aw	0.96		

## 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

容器包装詰食品の製造実態調査と理化学的・微生物学的試験および接種培養試験

分担研究者 石村勝之 広島市衛生研究所 生物科学部  
研究協力者 萱島隆之 広島市衛生研究所 生物科学部

### 研究要旨

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌食中毒に対するリスクを評価するため、平成 14 年度から平成 16 年度までの 3 年間、容器包装詰食品の製造実態調査とその理化学的・微生物学試験を実施するとともに、容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞接種試験を行った。

平成 14 年度は、120℃、4 分間加熱より低い加熱条件で製造される加圧加熱殺菌食品 3 品目の芽胞接種試験を行った。1 品目あたり 5 検体に A 型および B 型ボツリヌス菌芽胞混合液を  $10^4$  cfu/g で接種し培養した結果、食品 L (pH6.0、水分活性 (Aw) 0.97)、食品 M (pH6.1、Aw0.98 以上)、食品 N (pH5.5、Aw0.96) のいずれも、ボツリヌス毒素が産生されるまで日数は異なるものの、芽胞を接種した 5 検体すべてあるいはいずれかの検体から毒素が検出された。加熱殺菌後、芽胞が残存し、増殖可能温度に保存された場合、ボツリヌス毒素の産生が可能な食品特性と考えられた。

平成 15 年度は、中国・四国地方における製造実態調査を行った結果、本地方での各種当該食品の製造が確認された。また、100℃以下の加熱条件の食品について検討するため、実態調査を基に取り寄せた 8 品目 40 検体、および広島市内で購入した本地方の当該（可能性）食品 18 品目 71 検体計 26 品目 111 検体を理化学的、微生物学的試験に供した。その結果、ボツリヌス菌が増殖可能な pH および Aw を示す食品が認められたが、ボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、生菌数、好気性芽胞、クロストリジアのいずれか、あるいは複数項目が陽性の食品が 5 品目(19%)、16 検体(14%)みられた。ボツリヌス菌芽胞が混入・残存した場合、常温保管中に発芽増殖が可能な食品が存在すると考えられた。一方、平成 14 年度の芽胞接種試験において、毒素産生陽性であるがクロストリジア菌数が接種芽胞数と同様の  $10^4$ cfu/g であった品目 N について、接種芽胞の挙動を経時的に観察した結果、この食品中では芽胞の一部のみが発芽増殖し、 $10^7$ ~ $10^8$ cfu/g に増殖した後、比較的短期間に接種芽胞数の  $10^4$ cfu/g レベル以下に減少した。従って、接種培養試験の評価においては、このような食品の存在に留意する必要があると考えられた。

平成 16 年度は、漬物(古漬)と生菓子(ゼリー)について、実態調査および理化学的・微生物学試験および接種試験を行った。試験に供した漬物(古漬)60 検体は、Aw0.94 以上かつ pH4.6 以上のボツリヌス菌増殖可能域の理化学的性状のものが 24 検体 (40%) 認められた。微生物学的試験の結果は、ボツリヌス菌(毒素)は、すべての検体から検出されなかったが、クロストリジアが 26 検体(43%)に認められ、その汚染菌数は 1cfu/g 未満~18cfu/g であった。生菌数は 10cfu/g 未満~ $10^4$ cfu/g、好気性芽胞数は 10cfu/g 未満~ $10^2$ cfu/g であった。一方、ゼリーについては、フルーツ系ゼリーが多くみられ、Aw は 0.97~0.98 以上の高い値であったが、pH は 3.6~4.1 の低 pH を示し、ボツリヌス菌増殖域外の値であった。接種試験では、しょうゆ漬 2 品目(Aw0.97、pH4.7 および Aw0.97、pH4.9)の芽胞接種各 30 検体とも、90 日間ガス膨張はみられず、菌増殖およびボツリヌス毒素の産生も認められなかった。一方、コーヒーゼリーは、pH が 4.7 ないし 5.5 付近の 2 種類を認めたが、いずれも培養 75 日目までガス膨張を認めず、菌増殖およびボツリヌス毒素産生も認められなかった。以上の結果から、今回供試した漬物(古漬)およびゼリーは、pH や塩分濃度等の理化学的的特性の制御により、芽胞の発芽・増殖が抑制され、リスクの低減が図られた食品と考えられた。

### A. 研究目的

わが国で流通・販売される容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌食中毒に対するリスクを評価す

ることを目的として、平成 14 年度から平成 16 年度までの 3 年間、各種の当該食品類の製造実態調査と、市販品の理化学的・微生物学的試験および

芽胞接種試験等を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 製造実態調査および試験品採取

容器包装詰低酸性食品の製造実態を調べ、その食品類についての理化学的・微生物学的特性の状況を明らかにするため、中国・四国地方自治体への実態調査依頼とその結果に基づく試験品の取り寄せを行うとともに、広島市内およびさいたま市内での店頭調査および試験品採取ならびに理化学的・微生物学的試験を行った。

平成 15 年度には中国・四国地方の当該食品の製造実態調査を、中国・四国地方衛生研究所長宛に依頼文および調査表を送付し、各自治体内の調査を依頼した。得られた回答の内容を整理・集計した。その中から 3 ヶ月以上の賞味期限が設定され、加熱殺菌条件が 100℃以上かつ室温保存、流通されているそう菜類を選定し、それらについて購入可能か否かを業者照会した。購入可能であった 8 品目各 5 検体計 40 検体を取り寄せ、理化学的・微生物学的試験に供した。また、広島市内のスーパーで室温販売されていた当該可能性食品 18 品目 71 検体を購入し試験に供した。

平成 16 年度は、広島市内およびさいたま市内の販売店（スーパーマーケットおよび百貨店）を訪問し、店頭において販売されている漬物類およびゼリーについてその販売形態などを調査した。そのなかで賞味期限が長く、保存方法が室温とされている品目（漬物 59 品目 60 検体、およびゼリー 25 検体）計 85 検体を購入し、理化学的・微生物学的試験に供した。

### 2. 理化学的・微生物学的試験方法

平成 15 年度に研究班で統一した試験方法（主任研究者総合報告書参照）により、pH、Aw、生菌数、好気性芽胞数、クロストリジア数、ボツリヌス菌（毒素）について試験した。

### 3. 芽胞接種培養試験

#### (1) 供試品目

平成 14 年度は、120℃、4 分間加熱より低い加熱条件で製造される加圧加熱食品 3 品目（食品 L：魚照焼（pH6.0、水分活性（Aw）0.97）、食品 M：汁の具（pH6.1、Aw0.98 以上）、食品 N：炒めの素（pH5.5、Aw0.96））を供した。

平成 16 年度には、漬物（しょうゆ漬）2 品目（漬物 A：pH4.7、Aw0.97 および漬物 B：pH4.9、Aw0.97）および生菓子（コーヒーゼリー）1 品目を供した。

#### (2) 供試菌株および接種芽胞液の調製

平成 14 年度は、*Clostridium botulinum* A 型 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 株を用いた。

平成 16 年度は、*Clostridium botulinum* A 型 3 株（62A（ATCC7948）、62A（NFPA）、36A）および B 型株 2 株（213B、Okra）の計 5 株を用いた。

供試試料への接種用芽胞液は各供試菌株の芽胞液を混合し用いた。供試菌株芽胞液の菌数が、約  $10^7$  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。なお、これらの調製は北海道立衛生研究所および日本缶詰協会研究所において行われた。

#### (3) 芽胞接種試料の作製

平成 14 年度は、1 品目あたり、芽胞混合液 20  $\mu$ l を開封した各 8 試料（培養用 5 試料、対照 3 試料）に接種し、密封した後、80℃で、20 分にカムアップタイムを加えた時間加熱して作製した。

平成 16 年度は、あらかじめ 80℃、20 分間加熱した芽胞混合液 20  $\mu$ l を、1 品目あたり各 33 試料にゴムシートを貼った上から注射し、針の刺し穴をゴムシールを貼ってふさぎ、個々の試料を滅菌袋に入れ、密封して作製した。なお、これらの作製は日本缶詰協会研究所において行われた。

#### (4) 芽胞接種培養試験方法

平成 14 年度の 3 品目および平成 16 年度の漬物 2 品目は 30℃のフラン器内で、ガス膨張を指標として 90 日間観察した。平成 16 年度のコーヒーゼリーは 75 日間観察した。

試験方法は、平成 14 年度に研究班で統一した試験方法により、pH、Aw、生菌数、クロストリジア数、ボツリヌス菌（毒素）について試験した。

### 4. 加圧加熱食品および漬物中のボツリヌス菌芽胞および栄養型菌の経時的挙動

平成 15 年度は、平成 14 年度の芽胞接種試験において、ガス膨張後、ボツリヌス毒素は認められたが、ボツリヌス菌数が接種芽胞数の  $10^4$  cfu/g を示した 1 品目、食品 N（pH5.5、Aw0.96）について、接種芽胞および栄養型菌の経時的挙動を評価するため、ボツリヌス菌芽胞および栄養型菌の接種試験を行った。また、平成 16 年度の芽胞接種試験に供した漬物 2 品目については、栄養型菌の発育が可能かを評価するため、ボツリヌス栄養型菌の接種試験を行った。

芽胞接種系の挙動試験方法は、以下のとおりとした。平成 15 年度は、無菌的に開封した同一ロット品 3 袋の内容物約 300g を滅菌ストマッカー

袋に移し、平成 14 年度の接種試験に使用した A 型・B 型ボツリヌス菌芽胞混合液(A 型菌 4 株(62A、90A、B1G4、62A(NFPA 株))、B 型菌 1 株(213B): $7.9 \times 10^5$ cfu/20 $\mu$ l) を 80℃、20 分間加熱し、食品 1g あたり  $10^4$ cfu/g になるように接種し、均一化した後、30℃で嫌気培養した。この芽胞接種検体から 25 日間経時的に検体の一部を採取し、クロストリジア数(ボツリヌス菌数)、マウス試験によるボツリヌス毒素産生性、嫌気性芽胞数を測定した。嫌気性芽胞数は、80℃、20 分間加熱後のクロストリジア数を計数した。

栄養型菌接種系の挙動試験方法は、以下のとおりとした。

栄養型菌の調製は、-30℃に保存してある上記の A 型・B 型ボツリヌス菌芽胞混合液(平成 14 年度研究班配布菌株)を解凍した後、80℃、20 分間加熱し、その 1 $\mu$ l を GAM 寒天培地に塗布した。30℃、24 時間嫌気培養し、発育した集落菌塊を滅菌蒸留水に懸濁した。平成 15 年度は、この菌液を加圧加熱食品(炒めの素)1g あたり約  $10^2$  cfu/g になるように接種した後、30℃で嫌気培養し、25 日間経時的に一部分を採取し、芽胞接種系と同様の項目を試験した。平成 16 年度は、漬物に約  $10^0$  cfu/g になるように接種し、20 日間培養後、クロストリジア数(ボツリヌス菌数)、毒素産生、嫌気性芽胞数を測定した。

#### 5. クロストリジア培地黒色集落の菌種の推定

クロストリジア培地に発育した黒色集落は、GAM 寒天培地(日水製薬)により純培養し、平成 15 年度はアピケンキ(日本ビオメリュー)を用いて同定した。平成 16 年度は、PrepMan Ultra Reagent(Applied Biosystems)で DNA を抽出した後、MicroSeq@500 16S rDNA PCR Kit(Applied Biosystems)、MicroSeq@500 16S rDNA Sequencing

Kit(Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、その塩基配列を Genetic Analyzer 310 Prism (Applied Biosystems)により決定した。その配列を Genetyx- Mac/DB(ソフトウェア開発株式会社)を用いて Database 検索し、高い相同性を示す菌を選択し菌種を推定した。

#### 6. クロストリジア培地黒色集落のマウス毒性試験

純培養された黒色集落形成菌をクックドミート培地(Difco)10ml に接種し、30℃で 7 日間、ガスパック(BD)にて嫌気培養した後、その培養液の遠心上清 0.5ml を ddY 系雄マウス 2 匹の腹腔内に接種し、4 日間その斃死の有無を観察した。

### C. 研究結果

#### 1. 中国・四国地方で製造された容器包装詰食品の実態調査結果

調査は容器包装詰食品のうち 3 ヶ月以上常温可能で、かつ pH4.6 以上、Aw0.94 以上の食品で、規格基準が定められていない食品を対象とした。その結果、中国・四国 9 県のうち 6 県から 92 品目について回答があった(表 1)。その内訳はそう菜 52 品目、醤油、ソース、つゆ等の調味料 17 品目、菓子類 10 品目、そう菜半製品 5 品目、漬物 4 品目、その他 4 品目であった。いずれも合成樹脂袋、びん等の形態が主であったが、そう菜のうち 15 品目は新含気調理食品であった。約 8 割の食品は Aw については不明であった。これらの中から加熱殺菌条件が 100℃以下または加熱殺菌工程がない 27 品目(29%)について検討することとし、取り寄せが可能であったそう菜 8 品目(表 2)各 5 検体計 40 検体を試験品とした。

また、広島市内の販売店にて常温販売され、購入できた中国・四国地方製造の容器包装詰食品 18 品目(71 検体;購入時 pH、Aw 不明)の内訳は、そう菜 6 品目、調味料 5 品目、半製品 4 品目、漬物 2 品目、その他 1 品目であった。これらの店頭で常温販売されていた食品は、表示から中国・四国地方の製造と判断した。それらの包装資材、形態、表示の記載内容からは、殺菌方法、殺菌温度等を明確に把握することはできず、レトルト殺菌食品との区別は難しかった。

#### 2. 中国・四国地方で製造された容器包装詰食品の理化学的・微生物学的試験

取り寄せた食品 8 品目 40 検体の理化学的・微生物学的試験結果を表 2 に示した。理化学的特性が pH4.6 を超え、Aw0.94 以上であった食品は 8 品目中 2 品目であった。その他の 6 品目中 5 品目は、pH が 4.9~6.2、Aw は 0.93~0.94 を示し、I 群ボツリヌス菌の発育限界 Aw0.94 付近のものが多かった。これら 8 品目 40 検体の微生物学的試験の結果、ボツリヌス菌、生菌数、クロストリジア数、および好気性芽胞数は認められなかった。

一方、市内スーパーマーケット店頭にて室温販売されていた容器包装詰め食品 18 品目 71 検体について同様に試験した(表 3)。これらの食品 71 検体からもボツリヌス菌は検出されなかった。その他の試験項目に関しては、13 品目 55 検体からは検出されなかったが、5 品目(19%)16 検体(14%)から検出された。そのうち、クロストリジアは 1 品目 2 検体(表 3、品目 No.12)から検出された

が、Aw は 0.92~0.93 を示し、汚染菌量も 1 cfu/g であった。検出菌は、2 検体とも *Clostridium clostridioforme* と同定された。

### 3. 漬物・ゼリー店頭調査および試験品の採取

広島市内およびさいたま市内の販売店（スーパーマーケットおよび百貨店）において販売されていた漬物では、浅漬け類は、概ね冷蔵陳列棚の下棚で販売され、古漬類も、包装袋には高温多湿を防ぐために室温での保存を示唆する表示がなされているが、冷蔵陳列棚の上棚において冷蔵販売されているものが多くみられた。

販売されている漬物の種類は、しょうゆ漬が最も多くみられ、たくあん漬などの糠漬、らっきょうなどの酢漬、奈良漬などの粕漬等が容器包装詰形態で多量販売されていた。消費（賞味）期限は、浅漬類は冷蔵下で数日以内となっていたが、上記の古漬類は、2 ヶ月から 3 ヶ月のものが多くみられた。これらの中で 59 品目 60 検体を試験品とするため購買した。

一方、容器包装詰されたゼリー類は、室温販売されているものがほとんどであり、種類としてはオレンジ、りんご、ぶどう等、フルーツ系のものがほとんどであった。それらは、成分として酸味料などの pH 調整剤が加えられているものが多く、賞味期限は、室温冷暗所で 3~4 ヶ月と長期なものが多くみられた。これらの中で 25 品目 25 検体を試験品とするため購買した。

### 4. 漬物（古漬）の理化学的・微生物学的試験結果

市販漬物 59 品目 60 検体の試験結果を表 4 に示した。それらの理化学的試験の結果は、Aw が 0.89~0.98 以上の範囲にあり、88% は 0.94 以上の Aw を示した。pH は 3.4~5.2 で、48% は 4.6~5.2 を示した。Aw0.94 以上かつ pH4.6 以上のボツリヌス菌増殖可能域の理化学的性状を示す検体は 24 検体（40%）認められた。一方、それらの微生物学的試験の結果は、すべての検体からボツリヌス毒素は検出されなかったが、クロストリジアが 26 検体（43%）に認められた。その汚染菌数は 1 cfu/g 未満~18cfu/g で、 $10^2$ cfu/g 以上の菌数汚染のものはみられなかった。

生菌数は、10cfu/g 未満~ $10^4$ cfu/g、好気性芽胞数は、10cfu/g 未満~ $10^2$ cfu/g であった。

### 5. 漬物由来クロストリジアの相同性検索およびマウス毒性試験結果

漬物から分離されたクロストリジア培地上で黒色集落を形成する 20 菌株は、16S rDNA の部分

的塩基配列を決定し、それに基づく相同性検索の結果、類似する配列が複数選択される菌株が多いものの、ほぼ *Clostridium* 属菌の配列が選択されていることから、総合的に *Clostridium* spp. と判断した。なかには、*C. subterminale* や *C. argentinense*、*C. glycolinum* などと 99% 以上の相同性の菌株が認められ、それらはその菌種名を採用した。しかし、いずれの菌株も培養上清にマウスを致死させる毒性は認められなかった（表 5）。

### 6. ゼリーの理化学的試験結果

広島市内で店頭購入したゼリーは、Aw は 0.97~0.98 以上の高値であったが、pH は 3.6~4.1 と低 pH を示し、すべてボツリヌス菌の増殖範囲外の値を示した（表 6）。

### 7. ボツリヌス菌芽胞および栄養型菌の接種培養試験

平成 14 年度実施の加圧加熱殺菌食品 L（魚焼焼: pH6.0、Aw0.97）の芽胞接種試料は、培養 10 日および 11 日後に 5 試料すべてにガス発生による膨張が認められた。ボツリヌス菌数は  $10^7$ ~ $10^8$  cfu/g オーダーを示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 試料すべて A・B 型両毒素の産生が認められた。培養後の pH は 6.1~6.3 であった（表 7、区分 F）。対照として行った芽胞未接種試料（開封品および未開封品）は 90 日後まで膨張が認められなかった。その生菌数およびボツリヌス菌数は 10 cfu/g 未満で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった（表 7、区分 B、D）。

食品 M（汁の具: pH6.1、Aw0.98 以上）の芽胞接種試料では、培養 24 日後に 1 検体に膨張が認められた。この試料は生菌数 10 cfu/g 未満、ボツリヌス菌数  $5.8 \times 10^7$  cfu/g を示し、A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その後、61 日および 63 日後に 2 検体が膨張し、ボツリヌス菌数  $10^8$  cfu/g、A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。残りの接種試料 2 検体は 90 日後まで膨張が認められず、ボツリヌス菌数  $10^4$  cfu/g、ボツリヌス毒素不検出であった（表 8、区分 F）。対照品は 90 日後においても、生菌数、ボツリヌス菌数ともに 10 cfu/g 未満、ボツリヌス毒素不検出であった（表 8、区分 B、D）。

食品 N（炒めの素: pH5.5、Aw0.96）の芽胞接種試料では、培養 11 日後 1 検体に膨張が認められた。この試料は、ボツリヌス菌数  $10^8$  cfu/g を示し、A 型毒素の産生が認められた。一方、他の 4 検体は 18 日および 20 日後に膨張が認められ、A 型毒素（3 試料）または A・B 型毒素（1 試料）の産

生が認められたが、これらの検体のボツリヌス菌数は  $10^4$  cfu/g を示し、当初の接種芽胞数と差異が認められなかった（表 9、区分 F）。対照品については 90 日後まですべて膨張が認められず、生菌数、ボツリヌス菌数ともに  $10$  cfu/g 未満、ボツリヌス毒素不検出であった（表 9、区分 B、D）。

平成 16 年度実施の接種試験結果は、しょうゆ漬 2 品目(pH4.7 および pH4.9)各 30 検体とも、90 日後までガス膨張は認められず、菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生も認められなかった（表 10、表 11）。

一方、コーヒーゼリーは芽胞接種直後および培養開始当初の試験において pH4.7 の柔らかいゲルの検体と pH5.5 の硬い検体の 2 種類が混在していた。芽胞接種 30 検体は培養 30 日目まで、すべての検体ともガス膨張は認められず、そのうち無作為に開封試験した 5 検体は、ボツリヌス毒素非産生であった。また、残り 25 検体は培養 75 日後に開封したが、この時点においてもガス膨張は認められず、ボツリヌス毒素非産生であった（表 6）。これらの検体のクロストリジア数は、30 日後では、柔らかいゲルの 4 検体は当初接種芽胞数の  $10^3$  cfu/g であったが、硬いゲルの 1 検体は  $10^2$  cfu/g を示した。一方、75 日後では、全検体ともゲルの軟化・液状化が認められた。pH5.4 を示した 3 検体のクロストリジア菌数は  $10$  cfu/g 未満に減少した。一方、pH5.0 を示した 22 検体も  $10^1$  cfu/g ~  $10^2$  cfu/g に減少し、ボツリヌス菌の増殖は認められなかった。生菌数はすべて  $10$  cfu/g 未満であった（表 12）。

#### 8. 芽胞接種系および栄養型菌接種系の経時的挙動

加熱殺菌食品 L(炒めの素：pH5.5, Aw0.96) にボツリヌス菌芽胞および栄養型菌を添加し  $30^\circ\text{C}$  培養し、経時的にボツリヌス菌数およびボツリヌス毒素を測定した試験結果を、図 1、図 2 に示した。

芽胞接種系の試験（図 1）では、接種芽胞数  $10^4$  cfu/g レベルを超え、発芽・増殖が確認されるまでに要した日数は、培養開始 5 日以降であった。その後対数増殖を示し、11 日目に  $10^7$  cfu/g で増殖のピークを示した。その後、定常期で推移した後、19 日目には  $10^4$  cfu/g に減少し、接種芽胞数レベルとなった。ボツリヌス毒素は  $10^6$  cfu/g に達した時点で検出され、以後検出された。芽胞数は、培養期間を通じ接種芽胞数の  $10^4$  cfu/g レベルで推移した。ボツリヌス毒素は  $10^6$  cfu/g に達

した時点で検出され、それ以後も検出された。芽胞数は、培養 25 日間を通じて、接種芽胞数の  $10^4$  cfu/g レベルで推移した。

一方、栄養型菌接種系の試験（図 2）では、 $10^2$  cfu/g に接種された菌が一旦  $10^1$  cfu/g に減少した後、増殖し、培養 8 日目に  $10^7$  cfu/g レベルに達した。その後減少し、18 日以降に  $10^4$  cfu/g レベルに減少した。ボツリヌス毒素は  $8.0 \times 10^5$  cfu/g に増殖した時点から検出され、それ以後検出された。しかし、芽胞は試験期間中を通して検出されず、栄養型菌の芽胞への移行は認められなかった。

栄養型菌を接種した漬物 A、および B の系（表 13）では、20 日間培養後、栄養型菌の増殖およびボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

#### D. 考察

常温で長期間流通している容器包装詰食品は、理論的にボツリヌス食中毒発生の可能性が懸念される食品群である。従って、その製造・流通実態を調査し、それら当該食品の理化学的性状とボツリヌス菌やその他の微生物学的汚染状況を把握することは、科学的根拠に基づいた適切なリスクアセスメントを行い、わが国における当該食品の安全性を確保する上で必須である。このことから、当所では研究目的に資するデータ生成のための試験を分担し、14 年度は  $100^\circ\text{C}$  以上の温度域で加熱殺菌する加圧加熱食品、15 年度は、 $100^\circ\text{C}$  以下の加熱温度で殺菌し、常温流通している食品の評価を行うことを主目的として、地方の地場産品を対象として調査を行った。平成 16 年度は、当所は、漬物ならびにゼリーについての評価を分担検討した。

中国・四国地方でのアンケートによる製造実態調査では、本市を加えた中国四国地方 6 県 1 市から 92 品目の調査回答が得られた。この調査の結果、惣菜、調味料、惣菜半製品など、各種のレトルト食品以外の当該食品が当地域において製造されていることが示された。しかし、今回の調査は 3 ケ月以上の常温流通品を対象とした調査であったことから、それより短期間で常温流通する食品についてはさらに多種類の食品が製造されていると推測された。

この調査回答では、pH の回答は比較的多いものの、Aw については未回答のものが多くみられた。これは、測定に特殊な機器・技術が必要なことから、商品開発・製造段階での測定の難易度が関係していると考えられるが、ボツリヌス菌に関

する安全性を評価する上で、自社製品の重要な指標として把握しておくことが肝要と考えられた。

一方、取り寄せ品ならびに広島市内の販売店で購入した容器包装詰食品の表示は、そのほとんどに、殺菌の有無、殺菌内容等を判断できる記載はみられず、みられるものでも、容器包装資材・形態等からレトルト食品との区別について、消費者が判断しづらい食品が多くあった。これらのことから、表示方法・表示内容に関する課題があると考えられた。

取り寄せ食品 8 品目 40 検体を試験した結果、pH4.6 を超え、かつ Aw0.94 を超えた品目は 8 品目中 2 品目 (25%) であった。その他の 6 品目は 0.94 以下ではあったが、5 品目は I 群ボツリヌス菌の発育限界とされる Aw0.94 付近の製品であった。これら 8 品目 40 検体の微生物学的試験を行ったが、ボツリヌス菌、生菌数、クロストリジア数、好気性芽胞数のいずれも検出されなかった。一方、市内スーパー店頭にて室温販売されていた容器包装詰め食品 18 品目 71 検体についてもボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、その他の微生物学的試験項目に関しては、5 品目 16 検体からいずれかの項目あるいは複数項目が検出された。その内訳をみると、クロストリジアに関しては、調理みそ 1 品目 2 検体から検出され、この食品は 80℃以上で 10 分間保持する殺菌方法が行われており、食品中の芽胞が死滅していなかったと考えられるが、菌数は 1 cfu/g と少量であり、マウス毒性のないことが Bergey's manual に記載されている *Clostridium clostridioforme* であった。この殺菌温度では、ボツリヌス菌芽胞が混入した場合、加熱後も生残する可能性もあるが、Aw が 0.92~0.93 であることから、ボツリヌス I 群菌芽胞の発芽・増殖はできない食品と考えられた。

生菌数が認められた 4 品目は、3 品目が Aw0.94 以下であり、ボツリヌス菌に関しては発芽・増殖限界内にある食品特性であった。しかし、煮豆(五目豆) 1 品目 2 検体は、Aw0.94 以上であり、生菌数が  $10^4/g$  ならびに  $10^5/g$  であり、菌の増殖が示唆される結果であった。この製品の製造元へ照会したところ、加熱殺菌温度は 118℃、20 分であったが、検出菌は芽胞形成菌ではなかった。同一ロットと考えられる 3 検体の生菌数が 10 cfu/g 未満であったことから、検出菌は加熱時の製品間の温度ムラ等による生残菌の可能性が高いことから、ボツリヌス芽胞が残存した場合、注意を要する状態にある食品と考えられた。この製造者には、本

情報を提供し、製造の改善を促した。

*Bacillus* は、調理みそ 1 品目からのみ検出されたが、Aw が 0.90 であることから、本菌が増殖できた場合も、ボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖はできない食品と考えられた。

以上、中国・四国地方で製造された容器包装詰食品 26 品目 111 検体 (100℃以上加熱殺菌の市販食品を含む) からはボツリヌス菌の汚染は確認できなかったが、中には、加熱工程に課題のある食品がみられ、加工・製造における加熱殺菌条件の確認等、製造段階の管理方法にも注意が必要である。

芽胞接種試験は、対象品目中ボツリヌス菌芽胞が発芽・増殖し、毒素を産生するか否かを実験的手法により確認するために行うものである。

平成 14 年度に実施した加圧加熱食品 3 品目では、芽胞接種した 5 試料すべてが比較的短い日数 (約 10 日) でボツリヌス菌の増殖と毒素産生が認められた食品 L (魚照焼) と、増殖までの期間に差がみられた食品 M (汁の具)、食品 N (炒めの素) がみられたが、いずれも毒素の産生が認められた。

食品 L (魚照焼) は魚肉 (切り身) を照り焼きした後、加熱調理処理したものである。この品目では検出された毒素型から、A 型および B 型両菌ともに速やかに増殖・毒素産生したと考えられた。一方、食品 M (汁の具) は、野菜を主にした汁の素であるが、ボツリヌス菌の増殖を認めるまでに 1 ヶ月および 2 ヶ月を要した試料と試験期間である 90 日後も増殖がみられない試料があり、増殖が認められた試料も A 型毒素のみが検出されるなど、接種試料間で芽胞の発芽・増殖、産生される毒素型の挙動に差異が認められた。この食品は pH6.1、Aw0.98 以上であり、これらのパラメーターではボツリヌス菌の増殖は可能な値を示していることから、食品中の成分あるいは他の物理的要因が発芽・増殖および毒素型ごとの発芽・増殖に影響しているものと考えられた。

食品 N (炒めの素) は、豚肉を主とした食品であり、5 試料とも毒素の産生が確認された。しかし、11 日後にガス膨張した 1 試料のボツリヌス菌数が  $10^8$  cfu/g を示したのに対し、18 日および 20 日後に膨張が認められた 4 試料は、 $10^4$  cfu/g であった。この菌数は、初期接種芽胞数と同等の値であり、この菌数での毒素産生は通常の場合考えにくい。しかし、この現象の解析は、芽胞接種試験系の評価において重要と考えられたことから、15 年度にこの点を検討した。その結果、今回の



芽胞接種の系では、発芽後、 $10^7$ cfu/g まで増殖したが、培養 19 日目には  $10^4$ cfu/g に減少する挙動が観察された。この間芽胞数は接種時の  $10^4$ cfu/g レベルを維持した。一方、栄養型菌を接種した系では、 $10^8$ cfu/g まで増殖後、これも 19 日目以降  $10^4$ cfu/g 以下に減少した。この間芽胞形成は認めなかったが、ボツリヌス毒素は両系とも  $10^6$ cfu/g 前後から検出された。このように、菌が増殖し、その後比較的短時間で減少することが観測され、芽胞数には大きな変化は見られないものであったことから、平成 14 年度に測定したガス膨張検体の  $10^4$ cfu/g の値は菌数減少後の初期接種芽胞の残数を測定したものと考えられる。

以上、今回検討した加圧加熱食品 3 品目は、接種芽胞の発芽・増殖にいたる期間および頻度、さらに産生毒素型が異なるものの、いずれもボツリヌス毒素の産生が可能であったことから、食品製造過程においてボツリヌス菌芽胞が残存した場合、保存流通条件によっては毒素産生が起こりうる食品と考えられた。一方、上記のとおり、増殖態度にばらつきがみられたこと、ガス膨張後の試験時に当初接種芽胞数と菌数変化がない状態の試料が認められたことなど、今後さまざまな食品類へのリスク評価法として実施する芽胞接種試験において留意すべき点、課題のあることも示唆された。

野菜を主原料とした漬物は、わが国においては、古くから伝統的な保存性のある発酵食品として発展し、今日では全国に 600 種類くらいがあるとされている。その中で古漬類は、近年では調味液の味が主体となる漬物として、しょうゆ漬け、酢漬け、味噌漬け、粕漬けなど、発酵性の低い漬物が多く生産されており、なかでも、しょうゆ漬けは年間約 52 万 6 千トンと最も多く生産され、野菜・果物類の漬物の約 44% 占めている。これらの多くは、広域販売、長期保存を可能とするため、食品工業システム的に生産され、容器包装詰めされた後、加熱殺菌するものにあっては、 $65^{\circ}\text{C}$  から  $80^{\circ}\text{C}$  の温度で加熱されている。今回の調査からも多種類の漬物が賞味期限は数カ月と長く、冷暗所とはいえ室温で長期間保存が可能ととれる表示がみられ、室温流通されている状況が伺えた。

漬物 59 品目 60 検体を試験した結果、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌が検出・分離された検体は認められなかったが、その他の *Clostridium* 属菌が、低菌数ながら、43% から分離された。これは *Clostridium* 属菌芽胞が、加熱殺菌工程後においても生残したためと考えられ、ボツリヌス菌

芽胞の汚染があった場合も最終製品での生残を示唆した。従って、芽胞の生残性の観点においては、 $100^{\circ}\text{C}$  以下で加熱殺菌される漬物は、他の非加熱あるいは低温加熱の食品と同様にボツリヌス菌発芽、増殖ならびに毒素産生のリスクが存在する。しかし、今回の漬物への芽胞接種試験においては、Aw および pH の理化学値がボツリヌス菌増殖限界に近いとはいえ増殖可能域にあるにもかかわらず、芽胞の発芽・増殖が 90 日間認められなかった。また、栄養型菌を接種した系でも増殖は認められなかった。小崎らは、本研究班の分担研究の中で *C.botulinum* 62A、36A、および Renkon 株などの A 型菌は、PYG 培地中で pH4.8 まで発育および毒素産生をすることを認めている。このことから、主に pH による発芽・増殖抑制に加え、その他の要因（食品成分、添加物、あるいはペクチンなど）の相乗的な阻害が接種ボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖に対する抑制ハードルをなしていると考えられる。従って、今回調査した市販品の 40% は Aw および pH の値からボツリヌス菌増殖可能域にあるものの、総じて pH が 5.0 付近の低い pH 域にあり、塩分濃度等を加味すると、ボツリヌス菌芽胞の潜在的汚染というハザードは存在するものの、ボツリヌス食中毒の発生リスクは低くなるものと推測された。

一方、容器包装詰めされた形態のゼリーは、長期保存が可能とされ、年間を通して店頭販売されている。広島市内における店頭調査では、フルーツ系ゼリーが多く認められた。それらの Aw は高値であったが、pH はすべて 4.6 未満であり、基本的には、ボツリヌス菌は発育できない食品特性と考えられた。一方、厚生労働省を通じ業界団体より提供されたコーヒーゼリー 1 品目の芽胞接種培養試験の結果は、培養開始から 75 日経過時においても、ガス膨張は全検体に認められず、ボツリヌス毒素の産生およびボツリヌス菌数の増加も認められなかった。むしろ、この品目では、クロストリジウム菌数の減少がみられた。本品は作製時の不備からゼリーの硬度に違いがみられ、その pH も柔らかい検体は pH4.7、硬い検体は pH5.5 との違いが認められ、Aw および pH の値からはボツリヌス菌が増殖する特性にある検体が混在する可能性が考えられたが、これも全検体とも増殖およびボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

これらの漬物およびゼリーの結果は、平成 14 年度に研究班において検討した各種品目の加圧加熱殺菌食品で認められた高い発芽・増殖、毒素産

生性とは異なるものであり、これらの食品類の微生物学的制御は、高温加熱殺菌によるものではなく、主として 100℃以下のマイルドな殺菌による物理学的ハードルと、pH、塩分濃度等の各種の理化学的ハードルの両者により行われていると考えられる。

このように、食品の種類、品目は多種多様であり、理化学的な増殖境界域付近においても種々の状態の食品が存在することが考えられる。複雑な食品マトリクス内での理化学的境界域における I 群ボツリヌス菌の挙動を、高い精度で予測可能とするパラメーターが確立されていない現在、芽胞接種試験という試験検査に基づく判定方法が、当該食品中での本菌のリスクを判断する上で重要である。特に、理化学的発育境界域付近の食品に対しては、採用する菌株の差やその実施方法の違いが結果に影響する度合いが高いことが予想される。従って、このことも勘案された芽胞接種試験のコンセプト、実施方法ならびに評価基準を確立することは、大変重要と考えられた。

#### E. 結論

容器包装詰され、室温販売されている食品の中で、ボツリヌス食中毒リスクがある食品を評価していくために、汚染実態調査および芽胞接種試験等を実施した。その結果、ボツリヌス菌の汚染した製品は認められなかったが、微生物学的に問題のある食品がみられた。理化学的特性では、Aw および pH がボツリヌス菌の増殖境界値付近あるいは境界値以上の検体も認められ、その評価が必要と考えられた。加圧加熱食品 3 品目、漬物 2 品目およびコーヒーゼリー 1 品目の芽胞接種試験では、加圧加熱食品は、I 群ボツリヌス菌の発芽・増殖および毒素産生を認めたが、漬物、コーヒーゼリーでは認められなかった。接種試験法を始めとした評価方法、評価基準の構築・設定が重要と考えられた。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- (1) 石村勝之 他：容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒リスク評価におけるボツリヌス菌芽胞接種培養試験、広島市衛生研究所年報、22、44-50(2003)
- (2) 石村勝之 他：中国・四国地方における容器包装詰低酸性食品製造実態調査とボツリヌス食中毒に対するリスク評価、広島市衛生研究所

年報、23、49-54(2004)

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

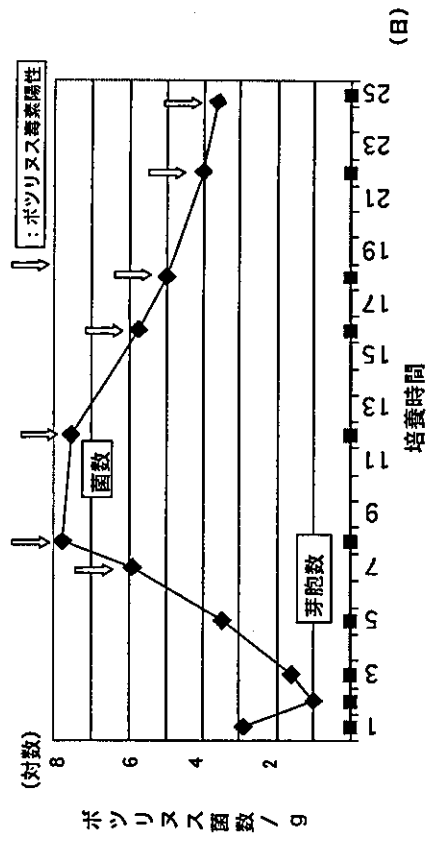


図1 芽胞接種系の増殖態度

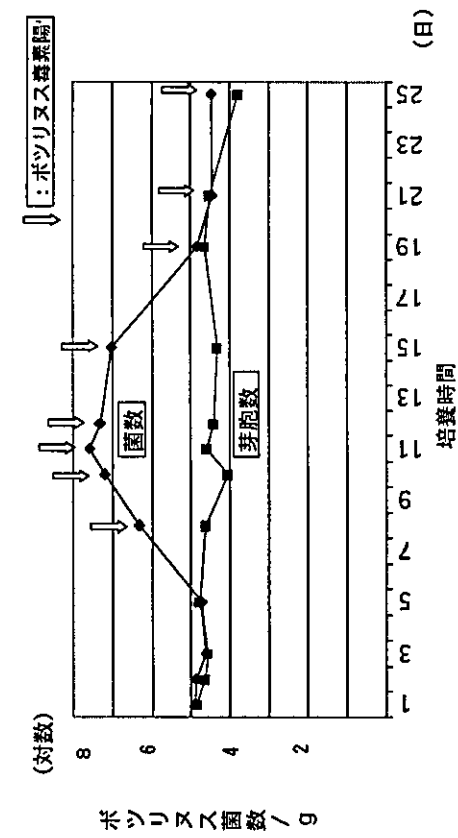


図2 栄養型菌接種系の増殖態度

表1 中国・四国地方製造品の実態調査結果

自治体	食品分類	品目数
岡山県	そう菜	17
	調味料	5
	そう菜半製品	3
	菓子	2
	その他	6
広島県	生菓子	7
	そう菜	5
	調味料	3
	そう菜半製品	1
徳島県	調味料	6
	そう菜	2
香川県	そう菜	5
	そう菜 (要冷蔵)	3
	調味料	1
	その他	1
愛媛県	そう菜	3
	そう菜半製品	1
	調味料	1
高知県	調味料	5
	そう菜	4
	生菓子	1
	そう菜半製品	1
広島市	そう菜 (レトルト)	4
	漬物	4
	調味料	1
計		92

表2 中国・四国地方製造取り寄せ食品の試験結果

品目No.	食品名	検体数	pH	Aw	生菌数/g	Clst数/g	好芽数/g	BoNT
1	川魚寒露煮	5	5.4-5.5	0.93-0.95	10未満	1未満	10未満	陰性
2	しめじ煮物	5	5.1	0.95-0.96	10未満	1未満	10未満	陰性
3	しめじ煮物	5	5.1	0.96	10未満	1未満	10未満	陰性
4	しいたけ煮物	5	4.9	0.94-0.95	10未満	1未満	10未満	陰性
5	川魚寒露煮	5	5.5-5.6	0.93	10未満	1未満	10未満	陰性
6	栗寒露煮	5	5.7	0.93	10未満	1未満	10未満	陰性
7	栗寒露煮	5	6.2	0.93-0.94	10未満	1未満	10未満	陰性
8	きくらげ佃煮	5	4.5	0.80-0.81	10未満	1未満	10未満	陰性

Clst数：クロストリジア数； BoNT：ボツリヌス毒素

好芽数：好気性芽胞数

表3 広島市内購入品の試験結果

品目No.	食品名	製造所	賞味期限	検体数	pH	Aw	生菌数/g	Clst数/g	好芽数/g	BoNT
9	調理みそ	広島県	2004.3.29	5	5.0	0.88	10未満	1未満	10未満	陰性
10	濃厚ソース	広島市	2004.9.28	5	4.1	0.94	10未満	1未満	10未満	陰性
11	濃厚ソース	広島市	2004.7.06	5	3.7-3.8	0.93	10未満	1未満	10未満	陰性
12	調理みそ	広島県	2003.12.01	5	5.1-5.2	0.92-0.93	10未満	1未満 ~1	10未満	陰性
13	調理みそ	広島県	2004.3.28	5	5.2	0.90	$1.2 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^2$	1未満	$1.0 \times 10^2 \sim 2.9 \times 10^2$	陰性
14	漬物	広島市	2004.1.05	5	4.1	0.95-0.97	10未満	1未満	10未満	陰性
15	漬物	広島市	2004.1.15	5	4.7	0.96-0.97	10未満	1未満	10未満	陰性
16	煮豆	香川県	2003.12.23	5	6.5-6.6	0.93-0.95	10未満	1未満	10未満	陰性
17	生うどん	香川県	2004.10.27	5	5.3-5.7	0.78-0.81	$8.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^5$	1未満	10未満	陰性
18	煮豆	広島県	2004.1.05	5	6.2	0.97-0.98	$10未満 \sim 8.6 \times 10^5$	1未満	10未満	陰性
19	釜飯の素	広島市	2003.12.25	5	5.2	0.98以上	10未満	1未満	10未満	陰性
20	釜飯の素	広島市	2003.12.25	3	5.1	0.98以上	10未満	1未満	10未満	陰性
21	せんじ肉	広島市	2003.12.12	5	6.5	0.71-0.82	$10未満 \sim 3.6 \times 10^3$	1未満	10未満	陰性
22	そう菜	広島市	2004.2.27	1	5.7	0.83	10未満	1未満	10未満	陰性
23	そう菜	広島市	2003.12.27	1	5.2	0.96	10未満	1未満	10未満	陰性
24	大豆水煮	広島市	2004.2.04	1	4.8	0.98以上	10未満	1未満	10未満	陰性
25	大豆水煮	広島市	2004.1.18	4	6.1	0.98以上	10未満	1未満	10未満	陰性
26	そう菜	広島市	2004.4.12	1	6.5	0.98以上	10未満	1未満	10未満	陰性

Clst数：クロストリジア数 加熱殺菌条件： 品目No： 12, 80℃以上, 10分  
 好芽数：好気性芽胞数 13, 95℃, 25分  
 BoNT：ボツリヌス毒素 18, 118℃, 20分

表4 市販漬物の理化学的・微生物学的試験結果

No. 名称	品名	賞味期限	製造所在地	pH	Aw	s p c/g	好気芽胞数/g	クロストリジウム数/g	ポツリヌス	備考
1	しょうゆ漬	04.9.22	群馬県	5.0	0.96	10	10未満	1未満	(-)	保存料なし
2	しょうゆ漬	04.9.17	東京都	4.8	0.96	30	10未満	1	(-)	保存料なし
3	酢漬	04.10.2	新潟県	3.7	0.97	10未満	10未満	1未満	(-)	保存料なし
4	しょうゆ漬	04.8.22	大分県	5.0	0.98以上	2.4x10 <sup>4</sup>	3.0x10 <sup>2</sup>	1	(-)	保存料なし
5	しょうゆ漬	04.8.16	愛知県	4.9	0.97	10	10未満	1未満	(-)	保存料なし
6	ふくじん漬	04.9.28	愛知県	4.5	0.93	10未満	10未満	1未満	(-)	保存料なし
7	福神漬	04.10.29	福岡県	4.5	0.97	10未満	10未満	1	(-)	soK
8	しょうゆ漬	04.10.15	福岡県	4.2	0.97	10未満	10未満	1未満	(-)	soK
9	しょうゆ漬	04.10.15	福岡県	4.8	0.98	10	10未満	1	(-)	soK
10	しょうゆ漬	04.10.10	長野県	4.9	0.97	2.2x10 <sup>2</sup>	10未満	1	(-)	soK
11	酢漬	04.12.01	鳥取県	3.6	0.97	50	10未満	1未満	(-)	保存料なし
12	なら漬	04.10.20	神戸市	5.0	0.91	3.4x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>2</sup>	18	(-)	保存料なし
13	しょうゆ漬	16.10.4	広島県	4.6	0.95	10未満	10未満	1未満	(-)	soK
14	たくあん漬	04.9.29	宮崎県	4.5	0.97	10	10未満	1	(-)	保存料なし
15	たくあん漬	16.9.29	福岡県	4.6	0.97	10未満	10	1	(-)	soK
16	しょうゆ漬	04.9.20	広島県	4.9	0.98以上	10未満	10未満	1未満	(-)	保存料なし
17	しょうゆ漬	04.9.30	福岡県	4.3	0.96	1.2x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>2</sup>	2	(-)	soK
18	たくあん漬	04.9.10	愛知県	4.1	0.98以上	10未満	10未満	1未満	(-)	soK
19	酢漬	04.9.15	栃木県	3.4	0.97	10未満	10未満	1未満	(-)	醸造酢
20	たくあん漬	04.10.5	宮崎県	5.0	0.97	10未満	10未満	1未満	(-)	
21	なら漬	04.9.03	徳島県	5.0	0.90	8.8x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>	5	(-)	
22	しょうが酢漬	04.10.12	栃木県	3.3	0.97	80	10未満	1未満	(-)	soK
23	ふくじん漬	04.9.5	大阪府	4.5	0.93	10未満	30	1未満	(-)	保存料なし
24	しょうゆ漬	04.8.28	愛知県	4.9	0.97	10	10未満	1未満	(-)	soK
25	しょうゆ漬	04.10.14	長野県	4.9	0.98以上	10未満	10未満	1未満	(-)	保存料なし
26	しょうゆ漬	04.9.20	福岡県	4.4	0.97	10未満	10未満	1	(-)	soK
27	しょうゆ漬	04.10.4	福岡県	4.4	0.96	150	10	4	(-)	soK
28	ふくじん漬	04.11.6	群馬県	4.5	0.93	10	40	1	(-)	保存料なし
29	たくあん漬	04.10.12	広島県	4.3	0.98以上	10	10未満	1未満	(-)	soK
30	ふくじん漬	04.10.14	鹿児島県	4.3	0.95	10未満	10未満	1	(-)	soK
31	しょうゆ漬	04.10.21	鹿児島県	4.2	0.96	80	30	1	(-)	soK
32	しょうゆ漬	04.9.19	埼玉県	4.5	0.98以上	10未満	10未満	2	(-)	soK
33	惣菜	04.10.9	長崎県	4.6	0.96	10	10未満	1未満	(-)	
34	しょうゆ漬	04.8.21	京都府	4.1	0.96	30	10未満	1未満	(-)	
35	たくあん漬	04.9.20	宮崎県	4.4	0.97	10	10未満	1未満	(-)	3.5%NaCl
36	しょうゆ漬	04.9.25	宮崎県	4.4	0.96	10	10未満	1未満	(-)	
37	しょうゆ漬	04.9.13	長崎県	4.3	0.97	10未満	10未満	1未満	(-)	soK
38	しょうゆ漬	04.10.23	東京都	4.2	0.95	10未満	10未満	1未満	(-)	
39	しょうゆ漬	04.10.7	埼玉県	4.5	0.96	10	20	1未満	(-)	soK
40	しょうゆ漬	04.10.8	愛知県	4.8	0.95	3.5x10 <sup>2</sup>	2.6x10 <sup>2</sup>	2	(-)	

表4 市販漬物の理化学的・微生物学的試験結果(つづき)

No. 名称	賞味期限	品名	製造所在地	pH	Aw	s p c/g	好気芽胞数/g	クロストリジア数/g	ポツリヌス	備考
41	04.08.16	杉樽一本漬	福島県	4.5	0.98以上	10未満	10未満	1未満	(-)	塩度3%以下
42	04.9.22	炉ばた漬	東京都	4.6	0.98以上	20	10	1未満	(-)	
43	04.8.27	ひとくち茄子香酒	東京都	4.6	0.97	10未満	10未満	1未満	(-)	
44	04.10.12	胡瓜まるごと風醇	福島県	4.4	0.98以上	10	10未満	1未満	(-)	乳酸発酵漬け込み
45	04.10.22	相馬きゅうり	福島県	4.4	0.98以上	10	10未満	1未満	(-)	
46	04.8.22	かつおたくあん	神戸市	4.7	0.98以上	20	10	1未満	(-)	
47	04.10.10	麻漬菜三郎本漬大根	長野県	4.1	0.98以上	10未満	10未満	1未満	(-)	
48	04.09.15	はりはり漬	京都市	4.6	0.93	90	60	1	(-)	
49	04.10.06	京乃都漬	京都市	4.4	0.97	10未満	10未満	3	(-)	
50	04.09.01	袋詰めからし茄子	新潟県	4.7	0.94	40	20	1	(-)	10度以下で保件
51	04.7.26	しそ巻	福島県	5.2	0.96	80	70	1未満	(-)	soK
52	04.09.28	みちのくの漬物臈菊	山形県	4.2	0.94	2.8x10 <sup>2</sup>	1.1x10 <sup>2</sup>	2	(-)	soK
53	04.10.15	いぶりがっこ	秋田県	4.8	0.96	Bacillus	50	6	(-)	
54	04.08.09	ニンニクかす漬	兵庫県	4.9	0.94	10未満	10未満	1未満	(-)	
55	04.12.05	醤油にんにく	東京都	4.9	0.96	10	10	1未満	(-)	
56	04.11.21	野沢菜漬	長野県	4.9	0.91	Bacillus	Bacillus	1	(-)	
57	05.6.21	わさび茶漬	長野県	5.0	0.96	10	10	1	(-)	
58	04.09.12	麻漬大根・胡瓜・味噌漬	長野県	4.7	0.89	70	60	1	(-)	
59	04.08.05	しそ胡瓜(赤)	京都市	4.0	0.98以上	10	10未満	1未満	(-)	soK
60	04.08.15	しそ胡瓜(白)	京都市	4.6	0.98以上	10	10未満	1	(-)	soK

表5 漬物から分離されたクロストリジア培地黒色集落の16S rDNA塩基配列による相同性検索およびマウス毒性試験結果

No. 名称	品名	pH	Aw	クロストリジア数/g	相同性検索結果 <sup>a)</sup>	マウス毒性 <sup>b)</sup>
2	しょうゆ漬	4.8	0.96	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
4	しょうゆ漬	5.0	0.98以上	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
7	福神漬	4.5	0.97	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
9	しょうゆ漬	4.8	0.98	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
10	しょうゆ漬	4.9	0.97	1	N.D.	
12	なら漬	5.0	0.91	18	<i>C. sporogenes</i>	(-)
14	たくあん漬	4.5	0.97	1	<i>C. argentinense</i>	(-)
15	たくあん漬	4.6	0.97	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
17	しょうゆ漬	4.3	0.96	2	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
21	なら漬	5.0	0.90	5	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
26	しょうゆ漬	4.4	0.97	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
27	しょうゆ漬	4.4	0.96	4	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
28	ふくじん漬	4.5	0.93	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
30	ふくじん漬	4.3	0.95	1	N.D.	
31	しょうゆ漬	4.2	0.96	1	<i>C. glycolinum</i>	(-)
32	しょうゆ漬	4.5	0.98以上	2	<i>C. perfringens</i>	(-)
40	しょうゆ漬	4.8	0.95	2	N.D.	
48	しょうゆ漬	4.6	0.93	1	N.D.	
49	しょうゆ漬	4.4	0.97	3	<i>C. subterminale</i>	(-)
50	?	4.7	0.94	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
52	しょうゆ漬	4.2	0.94	2	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
53	たくあん漬	4.8	0.96	6	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
56	惣菜	4.9	0.91	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
57	しょうゆ漬	5.0	0.96	1	N.D.	
58	みそ漬	4.7	0.89	1	<i>Clostridium</i> sp.	(-)
60	酢漬	4.6	0.98以上	1	N.D.	

a) 菌種名記載は、相同性98%以上の菌株； *Clostridium* sp. は検索結果の上位リストから属を判断した。

b) ddV系雄マウス腹腔内に、クックドミート培地7日間培養上清0.5mlを接種し、4日間観察した。

N.D. : 試験せず



表6 ゼリーの理化学的試験結果

No.	試験品	製造所あるいは固有記号	pH	AW
1	ニコニコゼリー	福岡県	4.0	0.98以上
2	ぶどう味	群馬県	3.8	0.98以上
3	白桃味	群馬県	4.1	0.98以上
4	白桃ゼリー	山形県	3.7	0.98以上
5	ぶどうゼリー	山形県	3.8	0.98以上
6	さくらんぼゼリー	山形県	4.0	0.98以上
7	ブルーベリーゼリー	山形県	3.7	0.98以上
8	ストロベリーとナタデココ&ヨーグルト	山形県	4.1	0.98以上
9	アロエとナタデココ&ヨーグルト	山形県	4.2	0.98以上
10	くだものいっぱいゼリーミックス	新潟県	3.9	0.98以上
11	くだものいっぱいゼリー杏仁フルーツ	新潟県	4.0	0.98以上
12	くだものいっぱいゼリーぶどう	新潟県	4.0	0.98以上
13	いちごの粒入りゼリーとバナラムース	山形県	3.9	0.98以上
14	ブルーベリーの粒入りゼリーとチーズムース	山形県	3.9	0.98以上
15	青梅	岐阜県	3.9	0.98以上
16	あんず	岐阜県	3.8	0.98以上
17	果物合わせ	岐阜県	3.8	0.98以上
18	アロエベラとレアチーズ	山形県	4.0	0.97
19	カイケツゾロ	東京都	3.9	0.97
20	水辺の果実	東京都	3.7	0.98以上
21	ぶどうゼリー	長崎県	3.6	0.97
22	ももゼリー	長崎県	3.9	0.97
23	びわゼリー	長崎県	3.9	0.97
24	蒟蒻入りみかん・白桃・ぶどう・パインミックスゼリー	群馬県	3.8	0.97
25	杏仁豆腐	長野県	3.7	0.98以上

表7 食品L (魚照焼) のポツリヌス芽胞接種試験結果

区分	検体処理内訳			理化学・細菌試験結果							
	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
-	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	6.0	0.97	NT	NT	NT
			22								
			23								
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			16								
			17								
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			19								
			20								
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	10未満	NT
			10								
			11								
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日	無	NT	NT	10未満	10未満	NT
			13								
			14								
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	3.0×10 <sup>4</sup> *	NT
			7								
			8								
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	10日	有	6.2	NT	10未満	2.3×10 <sup>6</sup>	AB
			2								
			3								
			4								
			5								

SPC (一般生菌数), Clt (クロストリジア菌数), NT(実施せず)

表8 食品M (汁の具) のボツリヌス芽胞接種試験結果

区分	検体処理内容			物理化学・細菌試験結果								
	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	
-	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	6.1	0.98以上	NT	NT	NT	NT
			22				6.1					
			23				6.2					
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性	
			16									10未満
			17									10未満
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性	
			19									10未満
			20									10未満
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	10未満	NT	
			10									10未満
			11									10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	10未満	NI	
			13									無
			14									無
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	1.3×10 <sup>4</sup>	NT	
			7									10未満
			8									1.3×10 <sup>4</sup>
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	63日	有	5.8	NT	10未満	7.0×10 <sup>8</sup>	A	
			2									10未満
			3									6.2
			4									5.7
			5									6.4

SPC (一般生菌数), Clt (クロストリシア菌数), NT(実施せず)

表9 食品N (炒めの素) のボツリヌス芽胞接種試験結果

区分	検体処理内訳				理化学・細菌試験結果							毒素型
	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (cfu/g)	Cit (cfu/g)		
-	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	5.5	0.96	NT	NT	NT	NT
			22				5.5	0.96				
			23				5.4	0.96				
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			16				NT	NT				
			17				NT	NT				
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	NT	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			19				NT	NT				
			20				NT	NT				
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	NT	10未満	10未満	NT
			10				NT	NT				
			11				NT	NT				
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日	無	NT	NT	NT	10未満	10未満	NT
			13				無	NT				
			14				無	NT				
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	NT	10未満	1.1 × 10 <sup>4</sup>	NT
			7				NT	NT				
			8				NT	NT				
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	20日	有	5.7		NT	10未満	2.3 × 10 <sup>4</sup>	A
			2				5.8					
			3				5.7	NT				
			4				5.8					
			5				5.7					

SPC (一般生菌数), Cit (クロストリジア菌数), NT(実施せず)