

表12 コーヒーゼリー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)	Cit(cfu/g)	毒素
-	無処理	3	46 47 48	理化学試験	0日	無 無 無	4.7 5.5 5.5	0.98以上 0.98以上 0.98以上	NT	NT	NT
A	無処理	3	40 41 42	細菌試験 (陰性確認)	0日	無 無 無	NT	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	陰性 陰性 陰性
B	無処理	3	43 44 45	保存試験 (未開封)	75日	無 無 無	NT	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	陰性 陰性 陰性
C	開封芽胞非接種	3	34 35 36	細菌試験 (開封操作確認)	0日	無 無 無	5.6 4.8 4.8	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	NT
D	開封芽胞非接種	3	37 38 39	保存試験 (開封)	75日	無 無 無	NT	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	NT
E	開封芽胞接種	3	31 32 33	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	無 無 無	5.4 4.8 4.8	NT	10未満 10未満 10未満	8.6×10^3 9.1×10^3 1.6×10^4	NT
F	開封芽胞接種	30	1	細菌試験	30日	無	NT	NT	10未満	1.7×10^2	陰性
			2			無	NT		10未満	8.1×10^3	陰性
			3			無	NT		10未満	8.6×10^3	陰性
			4			無	NT		10未満	7.2×10^3	陰性
			5			無	NT		10未満	9.1×10^3	陰性
			6		無	5.0	75日		10未満	1.2×10^4	陰性
			7		無	5.0			10未満	2.5×10^4	陰性
			8		無	5.0			10未満	3.1×10^4	陰性
			9		無	5.0			10未満	1.5×10^4	陰性
			10		無	5.0			10未満	8.0×10^1	陰性
			11		無	5.0			10未満	1.0×10^4	陰性
			12		無	5.0			10未満	9.0×10^1	陰性
			13		無	5.0			10未満	1.2×10^4	陰性
			14		無	5.0			10未満	2.3×10^4	陰性
			15		無	5.0			10未満	7.0×10^4	陰性
16	無	5.0	10未満	9.0×10^1	陰性						
17	無	5.0	10未満	1.4×10^4	陰性						
18	無	5.0	10未満	1.5×10^4	陰性						
19	無	5.0	10未満	1.3×10^4	陰性						
20	無	5.4	10未満	10未満	陰性						
21	無	5.0	10未満	9.0×10^1	陰性						
22	無	5.0	10未満	1.1×10^4	陰性						
23	無	5.4	10未満	10未満	陰性						
24	無	5.0	10未満	2.1×10^4	陰性						
25	無	5.4	10未満	10未満	陰性						
26	無	5.0	10未満	1.7×10^4	陰性						
27	無	5.0	10未満	1.3×10^4	陰性						
28	無	5.0	10未満	1.3×10^4	陰性						
29	無	5.0	10未満	1.2×10^4	陰性						
30	無	5.0	10未満	1.9×10^4	陰性						

SPC (一般生菌数), Cit (クロストリジウム菌数), NT(実施せず)

表13 漬物への栄養型ボツリヌス菌接種培養試験成績

検体	初発接種菌数/g	培養後菌数/g	ボツリヌス毒素
漬物A	5	10	(-)
漬物B	3	10未満	(-)

培養後菌数：30℃、20日間嫌気培養後のクロストリジア菌数

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

ボツリヌス菌の性状の検討

分担研究者： 小崎 俊司 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科教授

研究協力者： 幸田 知子 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科助手

研究要旨

不活性ガスを充填し常温流通している新含気食品におけるボツリヌス中毒に対するリスク評価を行うためには、対象となる食品に直接芽胞を接種し、食品内での芽胞の発芽、および菌の増殖と毒素産生を調べることが最も確実な方法である。一方、ボツリヌス菌の性状は菌種により芽胞耐熱性、菌の増殖性、および毒素産生性等の点で異なり、菌の接種実験には複数の菌を混合して用いることが推奨されている。わが国でも容器包装詰食品に対するボツリヌス中毒対策として同様の通知が厚生労働省から出されている。一般に同一株であっても保存状態により性状が幾分異なることは芽胞の耐熱性試験等で指摘されている。そのため、新たに接種実験を始める場合には、使用菌の性状を知ることはリスク評価を行うために必須の条件となる。本研究では供試菌の候補として選別した A、B 型菌の芽胞産生性、栄養型細胞の増殖および毒素産生性を種々の条件で検討し、これらの性状を明らかにすることを目的とした。選定した A 型菌は、62A、Renkon、33A、36A および CB21 株の 5 株、B 型菌は Okra、67B、407、Ginger および 326 株の 5 株である。これらの菌株から芽胞を調整し、毒素産生用培地における菌の増殖、毒素産生を酸性から中性域(pH 4.4~7.0)で調べた。いずれの菌株も 10^5 LD₅₀/ml 以上の毒素を産生するが、pH 4.6 以下では増殖しないことから、接種実験に適した性状を有していることが分かった。接種実験の代用菌として考えられている無毒の *Clostridium sporogenes* PA3679 株の増殖性を調べたが、ボツリヌス菌と較べて pH による影響を受けやすく pH 5.2 以下での増殖が認めることが出来なかった。

A. 研究目的

ボツリヌス菌芽胞の地理的分布状況と地域の中毒原因菌との間に関係があると考えられている。わが国では東北、北海道地方を中心にして魚介類の発酵食品である「いずし」による E 型中毒が多数発生しているが、この地方の沿岸部の泥は高濃度の E 型菌芽胞で汚染されていることがわかっている。一方、最近わが国ではこれまでほとんど分離例のない A 型、B 型菌による食中毒事件が発生している。これらのボツリヌス食中毒原因食品として疑われた製品は、密閉した容器包装をしており、いわゆる要冷蔵の「レ

トルト類似食品」として市販されていたが、実際は室温保存されていた。食品製造技術や容器包装材の進歩と多様化する消費者ニーズに呼応した形で、ボツリヌス菌に対する十分な配慮を欠いた真空包装食品あるいは不活化ガス充填食品が常温で流通している事例が散見されるが、その実態は十分に把握されていないのが現状である。このような状況において、容器包装詰食品のボツリヌス菌のリスク評価は食品衛生上極めて重要な課題と言える。本研究では、ボツリヌス中毒に対する安全性評価を行なうために必要な食品への接種実験に使用するボツリヌス菌

株の増殖および毒素産生能について調べた。

B. 研究方法

1. 菌株

研究室保存株を中心にボツリヌス A、B 型菌をそれぞれ 10 株程度選び、それらの毒素産生性および芽胞形成能を比較した。その結果、A 型菌では 62A、Renkon、33A、36A および CB21 株、B 型菌では Okra、67B、407、Ginger および 326 株のそれぞれ 5 株を選定した。なお CB21 株は東京都健康安全研究センター、Ginger 株は大阪府公衆衛生研究所より分与を受けた。ボツリヌス菌の代用菌として *C. sporogenes* PA3679 を用いた。

2. 芽胞の調製

各菌株をクックドミート培地で一晚培養後、卵黄加 GAM 寒天培地に塗布し、発育してきた 10 株以上のコロニーを再度クックドミート培地に接種し、30℃2 日間培養後、毒素量を測定し、毒素産生能が最も高い株を選別した。分離菌をクックドミート培地で一晚培養し、芽胞調製用培地 (5% Trypticase、0.5% Bacto peptone、0.1% Na-thioglycolate、pH 7.0) に接種し、30℃7 日間培養した。培養液を遠心して芽胞を集め滅菌蒸留水に懸濁後、バスタイプソニケーター中で 30 秒 2 回処理した。さらに懸濁した芽胞を遠心操作により 10 回滅菌蒸留水で洗浄後、芽胞の形状を顕微鏡で観察後、-30℃で保存した。芽胞数の測定は卵黄加 GAM 寒天培地を使用し、滅菌パウチを用いて行った。

3. 増殖および毒素産生能

各菌株の増殖、毒素産生性を調べるために PYG 培地 (2% Proteose peptone、0.5% 酵母エキス、0.5% ブドウ糖、0.025% Na-thioglycolate) を使用し pH 4.4~7 に調製した。滅菌蒸留水に懸濁した芽胞懸濁液 (0.1 ml) を最終濃度が 10^5 /ml あるいは 10^3 /ml になるように、PYG 培地 10 ml を含む試験管 5 本に接種後 30℃で培養し、菌の増殖および毒素産生量を調べた。増殖の程度は

培養液を 600 nm で測定した。毒素産生量はマウス尾静脈法によりマウスの致死時間から腹腔内(ip)LD₅₀/ml を算出した。B 型菌では培養液をトリプシン処理し活性化毒素量として表した。

C. 研究結果

1. 供試菌の芽胞形成能

使用した A 型菌 5 株、B 型菌 5 株は芽胞調製用培地 400 ml で 10^8 ~ 10^{10} 個の芽胞が得られた (表 1)。また 80℃10 分間処理前後で芽胞数に大きな変化がなかったことから、これらの菌株の芽胞は耐熱性を有することが確認された。同様の条件で *C. sporogenes* では 10^8 個の芽胞がえられた。

2. 各菌株の増殖および毒素産生性

A 型菌各株の芽胞懸濁液を培地 10 ml を分注した試験管 5 本に接種した。その結果、CB-21 株は他の 4 株と較べて酸性域における増殖能が若干劣っており、特に 10^3 /ml の芽胞接種では pH 5.2 以下での増殖が見られなかった。一方、Renkon 株、36A 株は pH 4.8 でも増殖、毒素産生が認められた。また、より酸性域で確認された毒素は高い pH 域よりも長期間毒素が検出される傾向があった (表 2)。B 型菌 5 株の毒素産生は、pH 4.8 でほとんど見られなかった。その中でも Ginger、407 および 326 株は 10^3 /ml の芽胞接種では、pH 5.2 でも影響が認められた。B 型菌は A 型菌と較べて若干 pH の影響を受けやすい傾向が認められた (表 3)。*C. sporogenes* PA3679 株では 10^5 /ml 芽胞の接種条件で pH 5.2 での菌の増殖が認められず、ボツリヌス菌より酸性域での増殖が劣ると考えられた (図 4)。

D. 考察

新含気調理食品は、食材および調味料などを一緒に袋に入れ密封後殺菌調理される。この方法では食品の熱による変性が少ないために、消費者ニーズに添った多様な製品を産み出すことができ、食品製造にとっては非常に魅力のある

方法と言える。一方、容器包装詰加圧加熱殺菌食品（いわゆるレトルト食品）では、pH が 4.6 以上、かつ Aw が 0.94 以上の食品は中心温度が 120℃4 分間の加熱または同等の殺菌を行うことが規定されている。従って、上述した新含気食品はレトルト食品の規格に合致せず、食品衛生法では「そうざい」として取り扱われている。これらの製品が要冷蔵の表示どおりの取り扱いをされれば問題はないが、外見上常温流通を是とするレトルト食品と同等の取り扱いをされる可能性があるためボツリヌス食中毒のリスク評価を必要とした理由である。

ボツリヌス食中毒のリスク評価を行うために様々な試みが行われているが、対象食品の成分は多様であり、直接対象とする食品に対して接種実験を行い評価することが最も確実であると考えられる。ボツリヌス菌芽胞は一般的に I 群菌が最も耐熱性が高いが、その性状は多様であり同一菌種であっても耐熱性が異なる。また、ボツリヌス菌 A 型毒素を最初に精製、結晶化するために使用された Hall 株は芽胞をほとんど形成しない変異株であることも知られている。そのため、接種実験には同型の複数の菌株を混合した芽胞液を使用することが推奨されている。今回、接種実験への候補菌株として挙げられている A 型、B 型菌芽胞の性状を再確認するために実験を行った。

通常接種実験では食品 1 g に対して芽胞数が 10^3 個程度が望ましいとされている。そのため菌の増殖および毒素産生用培地として使用した PYG 培地に 10^3 /ml の芽胞を接種し、各菌株の性状を検討した。いずれの菌株も pH 6.0 以上であれば、増殖し毒素を産生したが、pH 5.2 以下では 10^3 /ml の接種芽胞数では増殖が認められない、あるいは強く影響を受ける株もあることが分り、接種実験には複数の菌株を混合して使用方法の根拠を再確認することができた。また、選別した B 型菌 5 株は A 型菌と較べて、酸性域の増殖に影響を受けやすいと考えられた。

一方、*C. sporogenes* PA3679 株はボツリヌス菌よりも最も高い耐熱性を示し、殺菌におけるボツリヌス菌の代用菌として使用されている。この菌を今回のような密封食品に対するボツリヌス菌による危害分析をするための指標菌となりうるかについて、ボツリヌス菌と同様な方法で増殖に対する pH の影響を調べた。多くのボツリヌス菌が増殖可能な pH 5.2 で PA3679 株は増殖できず、酸性域で強く影響を受けることが分かった。ボツリヌス菌は他の属菌とは異なり菌の生物学的性状ではなく、産生する毒素の血清型を基準として種が決定されている極めて稀な菌である。I 群菌と同様の生化学的性状を示す非毒素産生株は *C. sporogenes* に同定される。従って、PA3679 株のみを接種実験に用いてボツリヌス菌に対する食品の危害分析を行なう際には、対象食品の pH を十分考慮した対応が必要と思われる。

ボツリヌス中毒を予防するために新含気食品を対象として、直接芽胞を接種する実験は対象食品の安全性を確保するためには確実な方法と言える。しかし、ボツリヌス菌は今日バイオテロのリスクが最も高い病原菌の一つであり、菌および毒素の取り扱いを含めた実験方法の確立と安全対策も併せて考慮する必要があると考える。

E. 結論

密封包装詰食品に対する接種実験に用いるために候補としてボツリヌス A、B 型菌をそれぞれ 5 株ずつ選定し、種々の酸性域 pH の増殖、毒素産生を調べた。各菌の毒素産生性は pH により幾分異なったが、接種実験に使用できると判断された。ボツリヌス菌の代用菌としての考えられる *C. sporogenes* PA3679 は増殖能についてはボツリヌス菌より pH の影響を受け易く、対象食品の性状によっては使用できないと考えられた。

表 1

Toxin and spore production of *C. botulinum* type A and B strains

Type A

strain	Toxicity($\times 10^5$ LD ₅₀ /ml)	spore production($\times 10^8$)
62A	13.0	17
Renkon	11.5	1.8
36A	10.1	2.6
33A	6.1	14.6
CB21	6.1	1.2

Type B

strain	Toxicity($\times 10^5$ LD ₅₀ /ml)	spore production($\times 10^8$)
Okra	28.8	23
407	13.8	107
Ginger	7.2	227
326	3.1	7
67B	2.4	40

The spores were obtained from 400-ml culture

表2 Growth and toxin production of *C. botulinum* type A strains in different pH

62A

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity ($\times 10^5$ LD ₅₀ /ml)																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	5/5	13.6	5/5	15.0	5/5	16.1	5/5	18.7	5/5	20.2	5/5	20.2	5/5	16.1	0/5	S	0/5	S
	2	4/4	10.6	4/4	9.4	4/4	13.9	4/4	10.0	4/4	13.9	4/4	12.1	4/4	10.0	0/4	S	0/4	S
	3	3/3	1.9	3/3	10.0	3/3	9.4	3/3	7.8	3/3	5.6	3/3	7.4	3/3	15.0	0/3	S	0/3	S
	4	2/2	0.3	2/2	1.1	2/2	2.6	2/2	3.9	2/2	2.3	2/2	4.4	2/2	5.0	0/2	S	0/2	S
10 ⁵	1	5/5	10.6	5/5	18.7	5/5	16.1	5/5	10.6	5/5	25.8	5/5	23.7	5/5	18.7	5/5	6.9	0/5	S
	2	4/4	9.4	4/4	8.3	4/4	13.0	4/4	8.7	4/4	13.9	4/4	15.0	4/4	11.4	4/4	S	0/4	S
	3	3/3	3.5	3/3	8.3	3/3	7.4	3/3	10.0	3/3	11.4	3/3	11.4	3/3	9.4	3/3	S	0/3	S
	4	2/2	0.7	2/2	0.5	2/2	3.9	2/2	4.1	2/2	3.1	2/2	8.1	2/2	8.7	2/2	S	0/2	S

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	5/5	0.52	5/5	0.49	5/5	0.45	5/5	0.45	5/5	0.44	5/5	0.63	5/5	1.30	0/5	0.00	0/5	0.00
	2	4/4	0.70	4/4	0.49	4/4	0.40	4/4	0.36	4/4	0.35	4/4	0.45	4/4	0.48	0/4	0.00	0/4	0.00
	3	3/3	0.81	3/3	0.60	3/3	0.58	3/3	0.64	3/3	0.43	3/3	0.44	3/3	0.33	0/3	0.00	0/3	0.00
	4	2/2	0.93	2/2	0.78	2/2	0.70	2/2	0.70	2/2	0.63	2/2	0.59	2/2	0.61	0/2	0.00	0/2	0.01
10 ⁵	1	5/5	0.74	5/5	0.38	5/5	0.35	5/5	0.36	5/5	0.34	5/5	0.43	5/5	0.99	5/5	0.06	0/5	0.00
	2	4/4	0.65	4/4	0.39	4/4	0.38	4/4	0.37	4/4	0.35	4/4	0.35	4/4	0.36	4/4	0.00	0/4	0.00
	3	3/3	0.70	3/3	0.53	3/3	0.57	3/3	0.48	3/3	0.36	3/3	0.37	3/3	0.42	3/3	0.01	0/3	0.00
	4	2/2	0.89	2/2	0.77	2/2	0.68	2/2	0.54	2/2	0.55	2/2	0.52	2/2	0.48	2/2	0.01	0/2	0.01

Renkon

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	5/5	6.9	5/5	6.9	5/5	11.4	5/5	10.6	5/5	11.4	5/5	11.5	5/5	6.6	5/5	0.5	0/5	S
	2	4/4	10.6	4/4	9.4	4/4	11.4	4/4	13.0	4/4	16.1	4/4	15.0	4/4	13.9	0/4	S	0/4	S
	3	3/3	6.9	3/3	6.6	3/3	9.4	3/3	8.3	3/3	10.6	3/3	12.1	3/3	11.4	0/3	S	0/3	S
	4	2/2	4.4	2/2	11.0	2/2	5.7	2/2	4.7	2/2	2.3	2/2	2.4	2/2	9.4	0/2	S	0/2	S
10 ⁵	1	5/5	11.4	5/5	17.3	5/5	18.7	5/5	5.0	5/5	13.9	5/5	8.8	5/5	13.0	5/5	2.9	0/5	S
	2	4/4	10.6	4/4	12.1	4/4	16.1	4/4	11.4	4/4	18.7	4/4	13.0	4/4	17.3	4/4	16.1	0/4	S
	3	3/3	5.3	3/3	5.3	3/3	9.4	3/3	10.6	3/3	7.8	3/3	15.0	3/3	13.0	3/3	12.1	0/3	S
	4	2/2	3.3	2/2	6.5	2/2	10.1	2/2	5.3	2/2	7.5	2/2	3.9	2/2	7.0	2/2	S	0/2	S

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	5/5	0.53	5/5	0.50	5/5	0.60	5/5	0.46	5/5	0.62	5/5	0.95	5/5	0.98	5/5	0.95	0/5	0.00
	2	4/4	0.29	4/4	0.29	4/4	0.40	4/4	0.29	4/4	0.30	4/4	0.37	4/4	0.42	0/4	0.00	0/4	0.00
	3	3/3	0.28	3/3	0.24	3/3	0.19	3/3	0.23	3/3	0.30	3/3	0.37	3/3	0.20	0/3	0.00	0/3	0.00
	4	2/2	0.37	2/2	0.22	2/2	0.27	2/2	0.28	2/2	0.27	2/2	0.37	2/2	0.25	0/2	0.00	0/2	0.00
10 ⁵	1	5/5	0.53	5/5	0.61	5/5	0.59	5/5	0.52	5/5	0.68	5/5	0.76	5/5	1.04	5/5	1.57	0/5	0.00
	2	4/4	0.35	4/4	0.28	4/4	0.39	4/4	0.40	4/4	0.45	4/4	0.43	4/4	0.37	4/4	0.66	0/4	0.00
	3	3/3	0.35	3/3	0.22	3/3	0.19	3/3	0.24	3/3	0.29	3/3	0.40	3/3	0.34	3/3	0.27	0/3	0.02
	4	2/2	0.41	2/2	0.28	2/2	0.27	2/2	0.29	2/2	0.30	2/2	0.39	2/2	0.22	2/2	0.02	0/2	0.03

33A

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	3/5	4.4	3/5	1.3	3/5	4.1	3/5	3.7	5/5	2.0	5/5	4.1	3/5	2.8	0/5	NT	0/5	NT
	2	2/4	2.1	2/4	3.9	2/4	7.0	2/4	4.7	4/4	5.7	4/4	6.5	2/4	5.3	0/4	NT	0/4	NT
	3	1/3	1.9	1/3	0.6	1/3	0.3	1/3	0.6	3/3	4.4	3/3	3.5	1/3	3.3	0/3	NT	0/3	NT
	4	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	2/2	1.0	2/2	1.9	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT
10 ⁵	1	3/5	6.1	3/5	3.7	3/5	3.3	3/5	3.9	5/5	4.1	5/5	3.1	5/5	1.5	0/5	NT	0/5	NT
	2	2/4	2.9	2/4	9.3	2/4	4.1	2/4	10.1	4/4	10.9	4/4	5.7	4/4	5.3	0/4	NT	0/4	NT
	3	1/3	1.4	1/3	1.5	1/3	0.6	1/3	2.8	3/3	7.5	3/3	7.5	3/3	4.1	0/3	NT	0/3	NT
	4	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT	2/2	0.6	2/2	0.2	2/2	2.6	0/2	NT	0/2	NT

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	3/5	0.60	3/5	1.03	3/5	1.08	3/5	0.84	5/5	1.21	5/5	0.81	3/5	1.39	0/5	NT	0/5	NT
	2	2/4	0.59	2/4	0.58	2/4	0.75	2/4	0.71	4/4	1.01	4/4	0.39	2/4	0.88	0/4	NT	0/4	NT
	3	1/3	0.64	1/3	0.62	1/3	0.95	1/3	0.97	3/3	0.60	3/3	0.84	1/3	0.94	0/3	NT	0/3	NT
	4	0/2	0.72	0/2	0.72	0/2	0.87	0/2	0.95	2/2	0.58	2/2	0.58	0/2	NT	0/2	NT	0/2	NT
10 ⁵	1	3/5	0.63	3/5	0.88	3/5	0.89	3/5	0.89	5/5	1.08	5/5	1.05	5/5	1.22	0/5	NT	0/5	NT
	2	2/4	0.59	2/4	0.57	2/4	0.62	2/4	0.42	4/4	0.55	4/4	0.50	4/4	0.92	0/4	NT	0/4	NT
	3	1/3	0.67	1/3	0.90	1/3	1.01	1/3	0.97	3/3	0.35	3/3	0.32	3/3	0.67	0/3	NT	0/3	NT
	4	0/2	0.56	0/2	0.70	0/2	0.91	0/2	0.88	2/2	0.95	2/2	0.50	2/2	0.87	0/2	NT	0/2	NT

Inoculation of		Toxicity ($\times 10^5$ LD ₅₀ /ml)											
spore(/ml)	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4		
10 ³	1	5/5 2.6	5/5 8.7	5/5 6.5	5/5 4.4	5/5 5.3	5/5 9.4	5/5 10.1	5/5 +	0/5 S	0/5 S		
	2	4/4 3.5	4/4 4.1	4/4 5.0	4/4 4.4	4/4 6.1	4/4 5.3	4/4 5.3	4/4 1.4	0/4 S	0/4 S		
	3	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 2.5	3/3 3.3	0/3 S	0/3 S		
	4	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 0.1	2/2 0.2	0/2 S	0/2 S		
10 ⁵	1	5/5 4.1	5/5 3.5	5/5 4.4	5/5 3.5	5/5 7.0	5/5 3.5	5/5 5.3	5/5 2.5	0/5 S	0/5 S		
	2	4/4 2.5	4/4 2.4	4/4 3.5	4/4 2.6	4/4 3.9	4/4 1.7	4/4 5.7	4/4 5.7	0/4 S	0/4 S		
	3	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 +	3/3 0.2	3/3 7.5	0/3 S	0/3 S		
	4	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 +	2/2 0.1	0/2 S	0/2 S		

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of		Growth at 600 nm											
spore(/ml)	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4		
10 ³	1	5/5 2.10	5/5 2.20	5/5 2.28	5/5 2.24	5/5 2.20	5/5 1.66	5/5 1.92	5/5 2.17	0/5 0.00	0/5 0.00		
	2	4/4 1.81	4/4 1.81	4/4 1.74	4/4 1.87	4/4 1.95	4/4 2.02	4/4 0.91	4/4 1.03	0/4 0.00	0/4 0.00		
	3	3/3 1.02	3/3 0.73	3/3 0.73	3/3 0.75	3/3 0.86	3/3 0.85	3/3 0.74	3/3 0.58	0/3 0.00	0/3 0.00		
	4	2/2 0.94	2/2 0.85	2/2 0.87	2/2 0.90	2/2 0.90	2/2 0.91	2/2 0.84	2/2 0.84	0/2 0.03	0/2 0.02		
10 ⁵	1	5/5 2.17	5/5 2.03	5/5 2.13	5/5 2.17	5/5 2.24	5/5 2.28	5/5 2.28	5/5 2.03	0/5 0.00	0/5 0.00		
	2	4/4 1.55	4/4 1.81	4/4 1.74	4/4 1.79	4/4 1.79	4/4 1.91	4/4 1.98	4/4 2.14	0/4 0.03	0/4 0.03		
	3	3/3 1.04	3/3 1.06	3/3 1.07	3/3 1.11	3/3 1.16	3/3 1.24	3/3 1.51	3/3 0.96	0/3 0.01	0/3 0.02		
	4	2/2 0.85	2/2 0.86	2/2 0.86	2/2 0.86	2/2 0.91	2/2 0.90	2/2 0.92	2/2 0.80	0/2 0.05	0/2 0.03		

CB21

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)													
10 ³	10 ⁵	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4			
1	1	5/5	7.0	5/5	6.5	5/5	8.1	5/5	6.5	5/5	7.0	0/5	S	0/5	S
2	2	4/4	6.5	4/4	11.0	4/4	11.9	4/4	11.9	4/4	9.4	0/4	S	0/4	S
3	3	3/3	2.8	3/3	7.5	3/3	8.1	3/3	9.4	3/3	11.0	0/3	S	0/3	S
4	4	2/2 +		2/2	0.2	2/2	0.6	2/2	0.3	2/2	2.5	0/2	S	0/2	S
1	1	5/5	8.7	5/5	7.0	5/5	15.3	5/5	11.0	5/5	12.9	5/5	9.4	0/5	NT
2	2	4/4	3.7	4/4	6.5	4/4	8.7	4/4	10.1	4/4	11.0	4/4	11.0	0/4	NT
3	3	3/3	1.2	3/3	4.4	3/3	7.5	3/3	9.4	3/3	14.1	3/3	9.4	0/3	NT
4	4	2/2 +		2/2	1.1	2/2	1.3	2/2	3.3	2/2	3.5	2/2	9.4	0/2	NT

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm											
10 ³	10 ⁵	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4	
1	1	5/5	0.50	5/5	0.69	5/5	0.51	5/5	0.14	0/5	0.00	0/5	0.00
2	2	4/4	0.45	4/4	0.35	4/4	0.34	4/4	0.36	0/4	0.02	0/4	0.01
3	3	3/3	0.46	3/3	0.52	3/3	0.33	3/3	0.19	0/3	0.01	0/3	0.00
4	4	2/2	0.56	2/2	0.65	2/2	0.69	2/2	0.79	0/2	0.01	0/2	0.01
1	1	5/5	0.59	5/5	0.61	5/5	0.74	5/5	0.98	5/5	1.05	5/5	1.21
2	2	4/4	0.48	4/4	0.37	4/4	0.33	4/4	0.41	4/4	0.54	4/4	0.63
3	3	3/3	0.56	3/3	0.57	3/3	0.57	3/3	0.46	3/3	0.51	3/3	0.51
4	4	2/2	0.65	2/2	0.64	2/2	0.62	2/2	0.79	2/2	0.49	2/2	0.65

表3 Growth and toxin production of *C. botulinum* type B strains in different pH

Inoculation of wk spore (/ml)		Toxicity ($\times 10^5$ LD ₅₀ /ml)										
		pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4	
10 ³	1	5/5 24.4	5/5 9.9	5/5 10.7	5/5 3.5	5/5 4.5	5/5 3.1	5/5 1.5	0/5 S	0/5 S	0/5 S	
	2	4/5 6.7	4/5 5.1	4/5 3.5	4/5 3.9	4/5 6.3	4/5 12.6	4/5 9.9	0/4 +	0/4 S	0/4 S	
	3	3/5 4.5	3/5 9.1	3/5 5.8	3/5 16.5	3/5 22.0	3/5 27.1	3/5 2.4	0/3 S	0/3 S	0/3 S	
	4	2/5 5.1	2/5 13.8	2/5 20.0	2/5 16.5	2/5 24.4	2/5 16.5	2/5 2.9	0/2 S	0/2 S	0/2 S	
10 ⁵	1	5/5 18.1	5/5 4.2	5/5 5.5	5/5 3.5	5/5 7.8	5/5 10.7	5/5 4.2	0/5 +	0/5 S	0/5 S	
	2	4/5 9.1	4/5 4.8	4/5 9.9	4/5 6.3	4/5 9.1	4/5 12.6	4/5 8.4	0/4 +	0/4 S	0/4 S	
	3	3/5 7.8	3/5 0.6	3/5 11.6	3/5 8.4	3/5 10.7	3/5 2.9	3/5 0.7	0/3 +	0/3 S	0/3 S	
	4	2/5 15.1	2/5 7.2	2/5 12.6	2/5 7.2	2/5 15.1	2/5 12.6	2/5 18.1	0/2 S	0/2 S	0/2 S	

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of wk spore (/ml)		Growth at 600 nm										
		pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4	
10 ³	1	5/5 0.23	5/5 0.39	5/5 0.91	5/5 1.20	5/5 1.25	5/5 0.29	5/5 0.10	0/5 0.00	0/5 0.00	0/5 0.00	
	2	4/5 0.25	4/5 0.46	4/5 0.44	4/5 0.65	4/5 0.77	4/5 0.99	4/5 0.27	0/4 0.00	0/4 0.00	0/4 0.00	
	3	3/5 0.34	3/5 0.52	3/5 0.55	3/5 0.49	3/5 0.50	3/5 0.49	3/5 0.40	0/3 0.00	0/3 0.01	0/3 0.00	
	4	2/5 0.29	2/5 0.60	2/5 0.52	2/5 0.59	2/5 0.18	2/5 0.40	2/5 0.41	0/2 0.00	0/2 0.00	0/2 0.00	
10 ⁵	1	5/5 0.19	5/5 0.79	5/5 1.38	5/5 1.31	5/5 0.76	5/5 0.34	5/5 0.44	0/5 0.00	0/5 0.00	0/5 0.00	
	2	4/5 0.27	4/5 0.43	4/5 0.73	4/5 0.59	4/5 0.73	4/5 0.96	4/5 0.98	0/4 0.02	0/4 0.02	0/4 0.02	
	3	3/5 0.25	3/5 0.56	3/5 0.47	3/5 0.60	3/5 0.53	3/5 0.38	3/5 0.47	0/3 0.01	0/3 0.01	0/3 0.02	
	4	2/5 0.20	2/5 0.28	2/5 0.70	2/5 0.67	2/5 0.21	2/5 0.49	2/5 0.35	0/2 0.03	0/2 0.03	0/2 0.05	

67B

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)											
	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4		
10 ³	1	5/5 2.3	5/5 8.4	5/5 1.1	5/5 0.2	5/5 3.7	5/5 0.5	4/5 0.4	0/5 S	0/5 S	0/5 S		
	2	4/4 0.4	4/4 0.2	4/4 0.4	4/4 +	4/4 1.5	4/4 1.8	3/4 2.7	0/4 S	0/4 S	0/4 S		
	3	3/3 3.7	3/3 2.7	3/3 12.6	3/3 2.9	3/3 11.6	3/3 10.7	2/3 18.1	0/3 S	0/3 S	0/3 S		
	4	2/2 1.0	2/2 0.6	2/2 3.3	2/2 0.2	2/2 3.5	2/2 0.1	1/2 5.1	0/2 S	0/2 S	0/2 S		
10 ⁵	1	5/5 2.2	5/5 1.5	5/5 2.6	4/5 2.7	4/5 0.8	4/5 4.5	4/5 1.2	1/5 0.10	0/5 S	0/5 S		
	2	4/4 0.2	4/4 2.4	4/4 5.1	3/4 0.1	3/4 0.1	3/4 0.7	3/4 2.9	0/4 S	0/4 S	0/4 S		
	3	3/3 3.7	3/3 8.4	3/3 11.6	2/3 1.7	2/3 5.1	2/3 13.8	2/3 11.6	0/3 S	0/3 S	0/3 S		
	4	2/2 0.4	2/2 3.7	2/2 0.4	1/2 1.9	1/2 0.3	1/2 0.7	1/2 0.4	0/2 S	0/2 S	0/2 S		

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm											
	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4		
10 ³	1	5/5 0.24	5/5 0.68	5/5 0.77	5/5 0.72	5/5 0.69	5/5 0.86	4/5 1.02	0/5 0.00	0/5 0.00	0/5 0.00		
	2	4/4 0.21	4/4 0.26	4/4 0.35	4/4 0.38	4/4 0.35	4/4 0.42	3/4 0.59	0/4 0.00	0/4 0.01	0/4 0.01		
	3	3/3 0.43	3/3 0.18	3/3 0.32	3/3 0.58	3/3 0.54	3/3 0.42	2/3 0.21	0/3 0.00	0/3 0.00	0/3 0.00		
	4	2/2 0.71	2/2 0.49	2/2 0.46	2/2 0.62	2/2 0.09	2/2 0.11	1/2 0.10	0/2 0.00	0/2 0.01	0/2 0.02		
10 ⁵	1	4/5 0.19	4/5 0.81	4/5 0.81	4/5 0.77	4/5 0.70	4/5 0.77	4/5 1.06	1/5 1.05	0/5 0.00	0/5 0.00		
	2	3/4 0.20	3/4 0.22	3/4 0.28	3/4 0.27	3/4 0.34	3/4 0.49	3/4 0.81	0/4 0.01	0/4 0.01	0/4 0.00		
	3	2/3 0.39	2/3 0.18	2/3 0.31	2/3 0.22	2/3 0.27	2/3 0.21	2/3 0.14	0/3 0.01	0/3 0.01	0/3 0.01		
	4	1/2 0.96	1/2 0.51	1/2 0.64	1/2 0.61	1/2 0.55	1/2 0.40	1/2 0.10	0/2 0.00	0/2 0.00	0/2 0.00		

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)											
10 ³	10 ⁵	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4	
1	1	5/5	8.4	5/5 12.6	5/5 10.7	5/5 15.1	5/5 22.0	2/5 2.7	5/5 2.4	2/5 S	0/5 S	0/5 S	
2	2	4/4	9.1	4/4 11.6	4/4 15.1	4/4 11.6	4/4 16.5	1/4 4.5	4/4 1.5	1/4 +	0/4 S	0/4 S	
3	3	3/3	5.1	3/3 6.3	3/3 10.7	3/3 9.1	3/3 13.8	0/3 S	3/3 7.2	0/3 S	0/3 S	0/3 S	
4	4	2/2	3.9	2/2 11.6	2/2 4.8	2/2 5.1	2/2 3.3	0/2 S	2/2 0.5	0/2 S	0/2 S	0/2 S	
1	1	5/5	10.7	5/5 5.5	5/5 18.1	5/5 5.8	5/5 9.9	5/5 5.1	5/5 2.1	5/5 1.1	0/5 S	0/5 S	
2	2	4/4	18.1	4/4 8.4	4/4 15.1	4/4 8.4	4/4 7.8	4/4 7.8	4/4 3.7	4/4 2.0	0/4 S	0/4 S	
3	3	3/3	9.1	3/3 18.1	3/3 9.1	3/3 5.5	3/3 11.6	3/3 10.7	3/3 0.2	3/3 0.2	0/3 S	0/3 S	
4	4	2/2	9.1	2/2 7.2	2/2 5.8	2/2 8.6	2/2 5.8	2/2 5.5	2/2 9.1	2/2 2.1	0/2 S	0/2 S	

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm											
10 ³	10 ⁵	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4	
1	1	5/5	0.13	5/5 0.32	5/5 0.10	5/5 0.16	5/5 0.06	2/5 0.02	5/5 0.21	2/5 0.03	0/5 0.00	0/5 0.00	
2	2	4/4	0.12	4/4 0.09	4/4 0.11	4/4 0.60	4/4 0.61	1/4 0.86	4/4 0.14	1/4 0.03	0/4 0.00	0/4 0.00	
3	3	3/3	0.23	3/3 0.11	3/3 0.19	3/3 0.21	3/3 0.42	0/3 0.03	3/3 0.20	0/3 0.00	0/3 0.00	0/3 0.02	
4	4	2/2	0.36	2/2 0.12	2/2 0.15	2/2 0.24	2/2 0.33	0/2 0.01	2/2 0.11	0/2 0.02	0/2 0.01	0/2 0.01	
1	1	5/5	0.17	5/5 0.21	5/5 0.07	5/5 0.08	5/5 0.17	5/5 0.06	5/5 0.13	5/5 0.14	0/5 0.00	0/5 0.00	
2	2	4/4	0.11	4/4 0.09	4/4 0.47	4/4 0.70	4/4 0.63	4/4 0.65	4/4 0.92	4/4 0.26	0/4 0.00	0/4 0.00	
3	3	3/3	0.22	3/3 0.08	3/3 0.25	3/3 0.29	3/3 0.21	3/3 0.30	3/3 0.14	3/3 0.16	0/3 0.00	0/3 0.01	
4	4	2/2	0.35	2/2 0.14	2/2 0.21	2/2 0.33	2/2 0.22	2/2 0.33	2/2 0.41	2/2 0.79	0/2 0.01	0/2 0.02	

Ginger

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	5/5	3.9	5/5	6.7	4/5	6.7	4/5	6.7	5/5	0.6	2/5	3.3	2/5	6.7	0/5	S	0/5	S
	2	4/4	0.5	4/4	0.7	3/4	2.6	3/4	3.9	4/4	1.2	1/4	1.2	1/4	3.1	0/4	S	0/4	S
	3	3/3	3.5	3/3	5.8	2/3	1.2	2/3	9.1	3/3	5.1	0/3	S	0/3	S	0/3	S	0/3	S
	4	2/2	1.2	2/2	0.9	1/2	3.5	1/2	1.3	2/2	4.5	0/2	S	0/2	S	0/2	S	0/2	S
10 ⁵	1	5/5	27.1	5/5	7.2	5/5	6.7	4/5	2.0	5/5	0.5	5/5	2.9	5/5	5.1	1/5	0.3	0/5	S
	2	4/4	0.8	4/4	0.6	4/4	0.9	3/4	0.1	4/4	0.4	4/4	2.1	4/4	1.1	0/4	S	0/4	S
	3	3/3	4.5	3/3	1.8	3/3	1.7	2/3	2.1	3/3	4.5	3/3	2.4	3/3	2.4	0/3	S	0/3	S
	4	2/2	0.5	2/2	2.9	2/2	4.2	1/2	1.3	2/2	3.7	2/2	3.9	2/2	2.0	0/2	S	0/2	S

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm																	
		wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4							
10 ³	1	5/5	0.37	5/5	0.44	4/5	0.42	4/5	0.51	5/5	0.66	2/5	0.75	2/5	0.99	0/5	0.00	0/5	0.00
	2	4/4	0.44	4/4	0.32	3/4	0.27	3/4	0.26	4/4	0.24	1/4	0.28	1/4	0.25	0/4	0.00	0/4	0.02
	3	3/3	0.58	3/3	0.50	2/3	0.44	2/3	0.50	3/3	0.40	0/3	0.00	0/3	0.00	0/3	0.00	0/3	0.00
	4	2/2	0.60	2/2	0.70	1/2	0.61	1/2	0.56	2/2	0.60	0/2	0.00	0/2	0.01	0/2	0.02	0/2	0.02
10 ⁵	1	4/5	0.35	4/5	0.37	5/5	0.42	4/5	0.51	5/5	0.63	5/5	0.83	5/5	1.07	1/5	1.55	0/5	0.00
	2	3/4	0.51	3/4	0.34	4/4	0.27	3/4	0.25	4/4	0.23	4/4	0.24	4/4	0.25	0/4	0.00	0/4	0.00
	3	2/3	0.63	2/3	0.48	3/3	0.52	2/3	0.44	3/3	0.42	3/3	0.41	3/3	0.39	0/3	0.00	0/3	0.01
	4	1/2	0.70	1/2	0.72	2/2	0.59	1/2	0.63	2/2	0.56	2/2	0.65	2/2	0.51	0/2	0.00	0/2	0.01

Inoculation of spore (/ml)		Toxicity (x 10 ⁵ LD ₅₀ /ml)											
	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4		
10 ³	1	5/5 1.2	3/5 5.8	4/5 1.2	3/5 1.1	4/5 5.8	2/5 4.2	3/5 6.7	0/5 S	0/5 S	0/5 S		
	2	4/4 1.7	2/4 2.4	3/4 4.8	2/4 4.5	3/4 0.4	1/4 9.9	2/4 0.3	0/4 S	0/4 S	0/4 S		
	3	3/3 1.3	1/3 3.5	2/3 2.9	1/3 2.2	2/3 2.1	0/3 S	1/3 2.9	0/3 S	0/3 S	0/3 S		
	4	2/2 6.3	0/2 S	1/2 6.3	0/2 S	1/2 4.2	0/2 S	0/2 S	0/2 S	0/2 S	0/2 S		
10 ⁵	1	5/5 1.2	5/5 7.2	4/5 1.0	4/5 7.8	3/5 4.2	2/5 2.9	3/5 0.2	2/5 0.1	0/5 S	0/5 S		
	2	4/4 2.9	4/4 1.4	3/4 8.4	3/4 3.1	2/4 1.9	1/4 0.7	2/4 2.4	1/4 1.6	0/4 S	0/4 S		
	3	3/3 1.4	3/3 0.6	2/3 0.6	2/3 0.2	1/3 13.8	0/3 S	1/3 1.0	0/3 S	0/3 S	0/3 S		
	4	2/2 1.7	2/2 0.9	1/2 0.9	1/2 1.2	0/2 S	0/2 S	0/2 S	0/2 S	0/2 S	0/2 S		

S; survive, +; low toxicity, NT; not tested

Inoculation of spore (/ml)		Growth at 600 nm											
	wk	pH7.0	pH6.0	pH5.8	pH5.6	pH5.4	pH5.2	pH5.0	pH4.8	pH4.6	pH4.4		
10 ³	1	5/5 0.29	3/5 0.46	4/5 0.43	3/5 0.21	4/5 0.23	2/5 0.19	3/5 0.22	0/5 0.01	0/5 0.00	0/5 0.00		
	2	4/4 0.19	2/4 0.15	3/4 0.26	2/4 0.25	3/4 0.52	1/4 0.76	2/4 0.79	0/4 0.00	0/4 0.00	0/4 0.00		
	3	3/3 0.47	1/3 0.22	2/3 0.17	1/3 0.27	2/3 0.49	0/3 0.00	1/3 0.60	0/3 0.01	0/3 0.00	0/3 0.00		
	4	2/2 0.70	0/2 0.00	1/2 0.44	0/2 0.00	1/2 0.42	0/2 0.00	0/2 0.00	0/2 0.00	0/2 0.00	0/2 0.00		
10 ⁵	1	5/5 0.33	5/5 0.42	4/5 0.58	4/5 0.55	3/5 0.59	2/5 0.35	3/5 0.23	2/5 0.63	0/5 0.00	0/5 0.01		
	2	4/4 0.32	4/4 0.24	3/4 0.28	3/4 0.27	2/4 0.42	1/4 0.56	2/4 0.82	1/4 1.08	0/4 0.01	0/4 0.01		
	3	3/3 0.52	3/3 0.22	2/3 0.27	2/3 0.21	1/3 0.26	0/3 0.02	1/3 0.83	0/3 0.01	0/3 0.02	0/3 0.02		
	4	2/2 0.60	2/2 0.52	1/2 0.48	1/2 0.52	0/2 0.01	0/2 0.01	0/2 0.01	0/2 0.01	0/2 0.02	0/2 0.02		

表4 Growth of *C. sporogenes* PA 3679 in different pH

pH	Incubation period (h)				
	0	24	48	72	96
6.0	1.09x10 ⁵	1.52x10 ⁶	1.70x10 ⁷	6.00x10 ⁷	1.26x10 ⁷
5.2	1.22x10 ⁵	1.06x10 ⁵	9.10x10 ⁴	9.60x10 ⁴	1.29x10 ⁵
4.8	1.33x10 ⁵	9.80x10 ⁴	6.80x10 ⁴	1.00x10 ⁵	1.63x10 ⁵
4.4	1.28x10 ⁵	6.60x10 ⁴	1.04x10 ⁵	1.34x10 ⁵	1.84x10 ⁵

(Inoculum : 10⁵ count/ml)

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価

主任研究者	小熊 恵二	岡山大学大学院医歯学総合研究課教授
分担研究者	駒木 勝	(社)日本缶詰協会 研究所長
研究協力者	武田 淳	(社)日本缶詰協会 研究所 食品化学研究室室長
	大久保良子	(社)日本缶詰協会 研究所 食品微生物学研究室主任
	山口 敏季	(社)日本缶詰協会 研究所 食品微生物学研究室研究員
	田口真寿美	(社)日本缶詰協会 研究所 食品化学研究室研究員
	山崎 良行	(社)日本缶詰協会 研究所 食品化学研究室研究員
	五味雄一郎	(社)日本缶詰協会 研究所 食品工学研究室研究員
分担研究者	武士 甲一	帯広畜産大学畜産学部獣医学科応用獣医学講座教授
分担研究者	小崎 俊司	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻感染症制御学講座教授

研究要旨

わが国の食品衛生法では、10℃以下で保存しない食肉・鯨肉製品および魚肉練り製品、常温で流通するpH4.6を超える清涼飲料水およびpHが4.6を超えかつ水分活性が0.94を超える容器包装詰加圧加熱殺菌食品には120℃で4分の加熱処理を施すことが規定されている。ただし、清涼飲料水には当該製品中でボツリヌス菌が発育しない場合にはこの限りではないことが付記されている。わが国の食品衛生法では上記のように製品の種類によってその殺菌基準が規定されているが、今日、多様化する食品容器や種々様々な加工食品は、食品の分類さえ困難な状況にある。よって、食品の成分や容器形態または製造方法における最終的な加熱処理の状況および流通温度などから当該製品の法制化が望ましいものと考えられる。すなわち、食中毒防止の観点からすれば、当該食品における対象となる食中毒細菌の種類およびその発育挙動から規定されるべきものである。

上記のように常温で流通する容器詰殺菌食品の中で、とくに当該食品のpHが4.6を超えるいわゆる低酸性食品（ただし、水分活性が0.94を超えるもの）にはその製造において加圧加熱殺菌処理する場合に120℃で4分の加熱処理を施すことが規定されている。しかしながら、加圧加熱殺菌によらない場合にはこの規定を受けない。そこで、容器詰低酸性食品の食中毒細菌として最も重要なボツリヌス菌に対するリスクを評価するために、開放状態および密封容器内での食品に接種したボツリヌス菌の発育および毒素産生能と接種試験に用いる菌株の選定のための各種性状試験を実施した。

平成15年度には、カレーライスに接種したボツリヌス菌の室温および開放状態における発育および毒素産生と玄米かゆを用いて包材の気体透過性が異なる3種類のパウチ中でのボツリヌス菌の発育および毒素産生を調べた。同様に気体透過性が異なる3種類のパウチ中での試験は平成16年度にも実施した。平成16年度は食品をマグロ水煮、スイートコーン水煮およびカレーの3種類とした。

また、平成15および16年度には接種試験に用いる菌株について、A型の62A株とB型の213B株は必須の菌株であるがこの2菌株に変わるような菌株の選定のための各種性状試験、すなわち、耐熱性、発育温度域、発育最低pHおよび水分活性域試験を実施した。同時にボツリヌス菌の代替として国際的に用いられているスポロゲネス菌の可能性についても検討した。

A. 研究目的

平成15および16年度は嫌気性細菌であるボツリヌス菌の食品中における発育および毒素産生を調

べるため、開放状態および気体透過性が異なるパウチ中でのAおよびB型ボツリヌス菌の接種試験を実施した。また、接種試験に用いるAおよびB型

ボツリヌス菌の菌株選定のための耐熱性、発育温度、発育最低 pH および水分活性域など各種性状試験を実施した。同時に、ボツリヌス菌接種試験は試験自体が危険を伴うためその代替株として国際的に用いられているスポロゲネス菌についても検討した。

B. 研究方法

1. 開放状態または密封容器内における容器包材の気体透過性が異なるパウチ中における発育状況

(1) 供試食品

平成 15 年度はカレーパウチ詰（市販品、要冷凍、透明パウチ）および玄米かゆパウチ詰（試作品、3 種類のパウチ、レトルト殺菌済）を、平成 16 年度は市販品のマグロ水煮缶詰（フレーク）、スイートコーン水煮缶詰およびカレーパウチ詰（アルミパウチ）を用いた。

(2) 供試パウチ

完全密封性および完全遮光性の不透明パウチ、気体透過性が低い透明パウチおよび気体透過性が高い透明パウチの 3 種類のパウチを用いた。平成 15 および 16 年度に用いた 3 種類のパウチの材質と酸素透過性を表 1 に示す。

(3) 接種芽胞液の調製

既報の方法により調製したボツリヌス菌芽胞液（62AATCC, 62ANFPA, 36A, 213B および Okra 株）を約 2.0×10^7 CFU/ml になるよう希釈し、この希釈液を等量ずつ混合しボツリヌス菌 A および B 型混合芽胞液とした。スポロゲネス菌芽胞液は調製した芽胞液をそのまま用いた。

(4) 開放状態におけるボツリヌス菌の発育

ステンレス製のボールに炊飯直後の米飯 25g をとり、これに加温したカレー 25g を添加しカレーライス試料とした。この試料のカレーの内部に供試芽胞液 20 μ l を接種し、直ちにラップをかけ、室温で 7 日間放置した。この間の 1, 3 および 7 日目に 3 検体ずつ、試料の分析を行った。

(5) 供試試料への芽胞液接種および加熱処理

気体透過性が異なる 3 種類のパウチに詰められた供試試料にボツリヌス菌またはスポロゲネス菌の供試芽胞液を 20 μ l ずつ接種し、直ちに開口部を熱溶封した。この後、低温殺菌機（石田製作所製）で 80℃、20 分間加熱処理した。

(6) 恒温放置および発育の判定

加熱処理した接種試料は、30℃、90 日間恒温放置した。この間、膨脹した試料は取り出し、容器の

外観、pH の変化、*Clostridium* 属生菌数の増加および毒素の産生の有無を調べ、発育の判定を行なった。なお、無接種対照試料のみヘッドスペースガス分析を行なった。

2. A および B 型ボツリヌス菌株の耐熱性、発育温度、最低発育 pH および水分活性域試験

(1) 培地の調製

1) 酵母エキス寒天培地（以下 YEA と略す）

酵母エキス 10g, リン酸 2 カリウム 2g, 可溶性デンプン 1g, チオグリコール酸ナトリウム 1g および寒天末 20g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解した。これを pH7.2 に調整し、121℃、20 分間高压殺菌した。

2) クロストリディウム強化培地（以下 RCM と略す）

バクトペプトン 10g, ラムレムコパウダー (Oxoid) 10g, 酢酸ナトリウム 5g, 酵母エキス 1.5g, 可溶性デンプン 1g, ブドウ糖 1g, L-システイン塩酸塩 0.5g および寒天末 1g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解し、pH7.0 に調整した。これをマグネチック・スターリング・バー1 本を投入した培地びんに 100ml ずつ分注し、121℃、20 分間高压滅菌した。

3) pH 調整培地（以下 pH-RCM と略す）

上記 2-2. RCM と同様に加熱溶解まで調製後 2 つに分け、pH を 4.5 と 7.0 に調整した。この pH を調整した 2 種類の培地を適宜混合し pH が 4.7~5.9 になるよう調整し、マグネチック・スターリング・バー1 本を投入した培地びんに 30ml ずつ分注し、121℃、20 分間高压滅菌した。

4) 水分活性調整培地（以下 Aw-RCM と略す）

上記 2-2. RCM と同様に調製後、塩化ナトリウム 0~10%w/w を加え溶解後、マグネチック・スターリング・バー1 本を投入した培地びんに 30ml ずつ分注し、121℃、20 分間高压滅菌した。

(2) 耐熱性測定

調製した芽胞液の 10 倍希釈液 1ml を滅菌 M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 30ml に加え、よく混和後、滅菌硬質ガラス管（内径 7mm, 外径 9mm, 長さ 150mm, 以下チューブと略す）に 2ml ずつ分注し、開口部を酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽（オイルバス OH-16, タイテック製, オイル: ポリエチレングリコール#400, 日本油脂製）中で加熱処理した。加熱処理は 105℃で、所定時間行なった。な

お、加熱補正時間は 1.5 分とした。所定時間にチューブを取り出し、その生残菌数を測定し、生残曲線を描き、D 値を求めた。平成 15 年度は A 型 62AATCC, 62ANFPA および 36A 株の 3 株と B 型 213B および Okra 株の 2 株、平成 16 年度は A 型 62A, 33A, 36A, Renkon および CB21 株の 5 株と B 型 Okra, 67B, 407, Ginger および 326 株の 5 株について測定した。

(3) 発育温度域の測定

調製した RCM に約 10^5 CFU/ml になるよう各菌株の芽胞液を 0.5ml ずつ接種し、よく混和後、チューブに 1.8ml 宛分注し、酸素炎で溶封した。これらは恒温水槽中で 80°C 、20 分間加熱処理後、急冷し、温度勾配培養槽（温度範囲 $5\sim 52^{\circ}\text{C}$ ）で 30 日間恒温放置した。各温度にチューブ 1 本を供し、発育の判定は、肉眼により培地の混濁が認められたものを発育陽性とした。平成 16 年度に A 型 62A, 33A, 36A, Renkon および CB21 株の 5 株と B 型 Okra, 67B, 407, Ginger および 326 株の 5 株について測定した。

(4) 最低発育 pH および水分活性域の測定

調製した pH-RCM および Aw-RCM に 10^5 CFU/ml になるよう各菌株の芽胞液を 0.5ml ずつ接種し、よく混和後、チューブに 3ml 宛分注し、酸素炎で溶封した。これらは恒温水槽中で 80°C 、20 分間加熱処理後、急冷し、 30°C 、30 日間恒温放置した。1 試験区につきチューブ 5 本を供し、発育の判定は、肉眼により培地の混濁が認められたものを発育陽性とした。平成 15 年度は A 型 62AATCC, 62ANFPA および 36A 株の 3 株と B 型 213B および Okra 株の 2 株、平成 16 年度は A 型 62A, 33A, 36A, Renkon および CB21 株の 5 株と B 型 Okra, 67B, 407, Ginger および 326 株の 5 株について測定した。

C. 研究結果

1. 開放状態または密封容器内における容器包材の気体透過性が異なるパウチ中における発育状況

供試試料に接種したボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育状況を表 2 に示す。供試試料への芽胞液接種量は、開放状態のカレーライスへは $10^2\sim 10^3$ CFU/g、パウチ中における試験での接種量はいずれの供試試料でもボツリヌス菌が $10^4\sim 10^5$ CFU/g、スポロゲネス菌が $10^3\sim 10^4$ CFU/g であった。

開放状態のカレーライス中では室温放置 3 日目にボツリヌス菌毒素の産生が認められた。

パウチ中での 30°C 、90 日間恒温放置後のボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育状況は、マグロ水煮およびカレーではいずれの供試パウチ中でもボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育が認められたが、玄米かゆおよびスイートコーン水煮では供試パウチのうち気体透過性の高いパウチ（C および F）中ではボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育は認められなかった。

供試試料中のヘッドスペースガス分析の結果、恒温放置 90 日後には、パウチ D および E ではいずれの食品からも酸素ガスは検出されなかった。パウチ F ではいずれの食品においても恒温放置 90 日後に酸素ガスが検出されたがマグロ水煮においては減少がみられた。パウチ F のマグロ水煮中では酸素ガスが内容物の褐変に消費されたため、他の 2 種類の供試食品よりヘッドスペースガスの検出量が少なかったものと考えられる。

カレーにおいては二酸化炭素ガスが少量検出される特徴がみられたが、製造直後と 90 日後においてとくに顕著な差はなかった。

2. A および B 型ボツリヌス菌株の耐熱性、発育温度、最低発育 pH および水分活性域試験

各種試験に用いたボツリヌス菌の初発芽胞数の測定結果を表 3 に、またその試験結果を表 4 に示す。

(1) 耐熱性測定

供試菌株の $D_{105^{\circ}\text{C}}$ 値は 4.1~12.4 分で、A 型 62ANFPA および 36A 株と B 型 Ginger 株の 3 株が他の菌株に比べ強い値を示した。また、z 値は平成 16 年度に A 型 5 株について測定し、供試 5 株中 4 株は約 $10\sim 11^{\circ}\text{C}$ で、33A 株は 8°C であった。ボツリヌス菌の耐熱性については、Esty と Meyer (1922) が $D_{105^{\circ}\text{C}}$ 値は 9.3 分と報告している。供試菌株の $D_{105^{\circ}\text{C}}$ 値は 4.1~12.4 分で、前述のように A 型 62ANFPA および 36A 株と B 型 Ginger 株は Esty らの報告を上回るほど強い値を示し、A 型 62A および Renkon 株と B 型 213B, 407 および 326 株も Esty らの報告に匹敵するほどの耐熱性を有していた。また、耐熱性ボツリヌス菌の z 値は 10°C とされており、供試菌株 A 型 5 株のうち 3 株（36A, Renkon および CB21 株）は約 10°C であった。

(2) 発育温度域

供試菌株の接種芽胞数の濃度は、当初の設定した芽胞数よりも A 型 1 菌株（36A）および B 型 4 菌株（Okra, 67B, Ginger および 326 株）で 10 倍以