

上となった。

供試菌株はRCM培地(36A)中では30日後に、A型5株(62A, 33A, 36A, RenkonおよびCB21株)の発育最高温度は43~44.5℃で、発育最低温度は62Aおよび33A株は12.3℃、36A株は10.4℃、Renkon株は14.1℃およびCB21株は12.3℃であった。B型5株(Okra, 67B, 407, Gingerおよび326株)の発育最高温度は、41.4~44.5℃で、発育最低温度はOkra株は14.7℃、67B株は12.3℃、407株は13.5℃、Ginger株は13.0℃および326株は13.5℃であった。

これまで耐熱性AおよびB型ボツリヌス菌の最低発育温度は10℃とされており、供試菌株の中では36A株が10.4℃まで発育したことから36A株は耐低温性の性状を有する株であることがわかった。その他の菌株の最低発育温度は12.3~14.7℃であった。

### (3) 最低発育pHおよび水分活性域

最低発育pH域試験は供試A型7株およびB型2株(213BおよびOkra株)について実施した。接種芽胞数が $10^4$ ~ $10^7$ CFU/ml(表3)で、A型は62A, 36A, Renkonおよび213B株の4株はpH5.2まで、62AATCCおよび62ANFPA株の2株は5.3まで、また33AおよびCB21株の2株はpH5.4まで発育がみられ、B型は213B株が5.2およびOkra株が5.9まで発育がみられた。これまでボツリヌス菌の最低発育pHは4.8とされており、供試菌株はpH4.8までの発育はみられなかった。

最低発育Aw域試験は接種芽胞数が $10^5$ ~ $10^6$ CFU/ml(表3)で、A型は62AおよびRenkon株の2株がAw0.96まで、33A, 36AおよびCB21株の3株はAw0.97まで発育がみられた。また、B型は67BおよびGinger株の2株がAw0.96まで、Okra, 407および326株の3株は0.97まで発育がみられた。これまでボツリヌス菌の最低発育Awは0.94とされているが、供試菌株は低いところまで発育はみられなかった。

## D. 考察

開放状態またはガス透過性が異なる3種類のパウチを用いて4種類の食品中におけるボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育状況を調べた。その結果、開放状態でボツリヌス菌の毒素産生がみられた。また、パウチ中での発育状況はガス透過性が高いパウチでは食品の種類によってはボツリヌス菌お

よびスポロゲネス菌の発育がみられなかった。ボツリヌス菌およびスポロゲネス菌は嫌気性細菌であり、通常、酸素が存在する環境下では発育しない。よって、密封容器内においては容器包材のガス透過性がボツリヌス菌の発育に影響することがわかった。しかしながら、食品の種類によっては開放状態または容器のガス透過性に関係なく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ことからすれば、ボツリヌス菌およびスポロゲネス菌芽胞の発育は容器のガス透過性よりもむしろ容器に詰められる食品の種類により影響を受けるものと推察される。

また、スポロゲネス菌は供試試料中でボツリヌス菌と同様な発育を示した。よって、食品中におけるボツリヌス菌の発育を調べるための代替株として用いることができるものと思われる。

わが国の食品衛生法では、常温で流通する缶、びん詰およびレトルト食品などのいわゆる密封容器詰殺菌食品のうち、pHが4.6を超えかつ水分活性が0.94を超えるもので加圧加熱殺菌により製造するものには、最終的に容器に充填、密封後、その中心を120℃で4分の加熱殺菌を施すことが規格基準で義務付けられている。しかしながらこの規格基準では当該製品のpHまたは水分活性が範疇内であっても加圧加熱殺菌しない方法で製造するものには何ら法的な拘束力はない。一方、これら密封容器詰殺菌食品において細菌性食中毒として最も重要視しなければならない細菌としてボツリヌス菌が挙げられる。今回、食品へのボツリヌス菌接種試験に必要な菌株の選定を行なうため、国内で保存されているAおよびB型ボツリヌス菌について耐熱性、発育温度、発育最低pHおよび発育最低水分活性値を調べた。その結果、耐熱性は報告されている値に匹敵するほどであったがpHおよび水分活性値については多少隔たりがみられた。今後、供試培地の検討および食品中での発育能を調べる必要がある。

## E. 結論

常温で流通する容器包装詰低酸性食品の容器包材の気体透過性がボツリヌス菌の発育に及ぼす影響について検討した。完全遮光性完全密封性の不透明パウチ(アルミ蒸着)では供試した食品すべてにおいてボツリヌス菌の発育がみられた。また、若干の気体透過性がある透明パウチではボツリヌス菌の発育に違いがみられた。すなわち、気体透過性が高い透明パウチでは食品の種類によってはボツリヌス菌の

発育がみられず、気体透過性が低いパウチでは不透明パウチと同様にボツリヌス菌の発育がみられた。開放状態においてカレーライス中でボツリヌス菌の毒素産生がみられたことからすれば、ボツリヌス菌の発育はパウチの気体透過性よりも食品の種類により影響を受けるものと推察された。常温で流通するレトルトパウチには不透明パウチと透明パウチが用いられおり、透明パウチについては遮光性が不完全なため内容物の油脂の品質劣化が問題となる。資源のリサイクル環境の現状においては不透明パウチから透明パウチへの移行が業界の共通認識のひとつでもあり、加圧加熱殺菌処理可能な透明パウチも場市されている。よって、油脂の品質劣化が阻止可能であれば不透明パウチと同様に用いることが可能である。若干の気体透過性がある容器といえども嫌気性の食中毒細菌であるボツリヌス菌は食品の種類によっては発育するため、この種の食品では最も重要な微生物危害のひとつである。

また、ボツリヌス菌の代替株としてのスポロゲネス菌について食品中での発育能を検討したところ、

ボツリヌス菌と同じ発育状況を示したことから、食品中でのボツリヌス菌の安全性を調べる試験においてその代替株として可能であると推察された。

容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌接種試験に用いる菌株について、その代表的な菌株 A 型 62A 株および B 型 213B 株に替わるべく国内で保存されている菌株の選別のための各種性状試験を実施した。

A 型 7 株および B 型 6 株について、耐熱性、発育温度域、pH 発育域および水分活性発育域を調べた。供試菌株はこれまでのデータと比べると耐熱性は有していたが、pH および水分活性発育能はやや隔たりがみられた。

今後、試験に用いる培地の検討および食品中での発育および毒素産生能を調べる必要があろう。

#### F. 健康危害情報

該当なし

#### G. 研究発表

該当なし

表1 供試パウチの材質および酸素透過性

パウチの種類	組成	酸素透過性 (ml/m <sup>2</sup> ·day·atm(at 22°C, 60%RH))
A	PET12/ONy15/AL7/ CPP60	0
B	ベセーラ 13/ONy15/CCP60	0.5
C	PET12/ONy15/ CPP50	95
D	PET12/ONy15/AL7/ CPP50	0
E	蒸着 PET12/ONy12/CCP70	0.35
F	ONy15/ CPP70	54

PET: ポリエチレンテレフタレート, ONy: ナイロン, AL: アルミニウム

CPP: 無延伸ポリプロピレン

平成 15 年度使用が A, B, C パウチ, 平成 16 年度使用が D, E, F パウチ

表2 供試試料に接種したボツリヌス菌およびスプロゲネス菌の発育状況

供試食品	供試パウチ	接種菌種	初発菌数 (CFU/g)	容器の 膨脹	pH の 変化	<i>Clostridium</i> 属 生菌数の増加	毒素の 産生
カレーライス	開放	ボツリヌス	10 <sup>2</sup> ~10 <sup>3</sup>	-	上昇	+	+
玄米かゆ	A	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+ <sup>a)</sup>	低下	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
	B	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	低下	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
	C	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	-	なし	-	-
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	-	なし	-	NT
マグロ水煮	D	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	上昇	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
	E	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	上昇	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
	F	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	上昇	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
スイートコーン水煮	D	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	低下	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
	E	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	低下	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	低下	+	NT
	F	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	-	なし	-	-
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	-	なし	-	NT
カレー	D	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	上昇	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	なし	+	NT
	E	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	上昇	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	なし	+	NT
	F	ボツリヌス	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>5</sup>	+	上昇	+	+
		スプロゲネス	10 <sup>3</sup> ~10 <sup>4</sup>	+	上昇	+	NT

a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず

表3 各種試験に用いた供試ボツリヌス菌株の初発芽胞数測定結果

血清型	菌株番号	芽胞数 (CFU/ml)		
		発育温度域	最低発育 pH	最低発育 Aw
A	62AATCC7948 <sup>a)</sup>	NT <sup>a)</sup>	$3.8 \times 10^4$	NT
	62A NFPA <sup>a)</sup>	NT	$1.1 \times 10^4$	NT
	62A	$4.0 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$5.5 \times 10^5$
	33A	$3.8 \times 10^5$	$9.6 \times 10^5$	$3.6 \times 10^5$
	36A <sup>a)</sup>	NT	$1.1 \times 10^4$	NT
	36A	$4.2 \times 10^6$	$6.5 \times 10^6$	$1.9 \times 10^6$
	Renkon	$4.3 \times 10^5$	$5.8 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
	CB21	$4.3 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$
B	213B <sup>a)</sup>	NT	$2.5 \times 10^4$	NT
	Okra <sup>a)</sup>	NT	$5.1 \times 10^4$	NT
	Okra	$8.7 \times 10^5$	NT	$4.6 \times 10^5$
	67B	$8.8 \times 10^5$	NT	$9.5 \times 10^5$
	407	$1.1 \times 10^5$	NT	$9.4 \times 10^5$
	Ginger	$3.0 \times 10^6$	NT	$2.3 \times 10^5$
	326	$6.5 \times 10^5$	NT	$7.3 \times 10^5$

a) 平成 15 年度測定, b) NT: 試験せず

表4 供試ボツリヌス菌株の耐熱性, 発育温度域, 最低発育 pH および水分活性域試験結果

血清型	菌株番号	D <sub>105°C</sub> 値 (分)	z 値 (°C)	発育温度域 (°C)	最低発育域	
					pH	Aw
A	62AATCC7948 <sup>a)</sup>	5.5	NT <sup>b)</sup>	NT	5.3	NT
	62A NFPA <sup>a)</sup>	10.5	NT	NT	5.3	NT
	62A	8.7	10.8	12.3~43.0	5.2	0.96
	33A	4.1	8.1	12.3~44.5	5.4	0.97
	36A <sup>a)</sup>	6.9	NT	NT	5.2	NT
	36A	10.5	10.0	10.4~44.5	5.2	0.97
	Renkon	7.5	10.2	14.1~43.0	5.2	0.96
	CB21	4.1	10.2	12.3~43.0	5.4	0.97
B	213B <sup>a)</sup>	7.3	NT	NT	5.2	NT
	Okra <sup>a)</sup>	6.1	NT	NT	5.9	NT
	Okra	5.2	NT	14.7~41.4	NT	0.97
	67B	5.3	NT	12.3~43.0	NT	0.96
	407	7.4	NT	13.5~41.4	NT	0.97
	Ginger	12.4	NT	13.0~44.5	NT	0.96
	326	7.3	NT	13.5~43.0	NT	0.97

a), b) 表3に同じ

## 容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価

分担研究者	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
研究協力者	牧野 壮一	帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター長・教授
	木村 浩一	北海道立衛生研究所微生物部細菌科長
	長野 秀樹	北海道立衛生研究所微生物部ウイルス科長
	駒込 理佳	北海道立衛生研究所微生物部細菌科研究職員
	若森 吉広	北海道立衛生研究所微生物部細菌科医療技術専門員
	木村 稔	北海道立中央水産試験場加工利用部品質保全科長
	栗原 誠	関東化学(株)技術・開発本部伊勢原研究所所長
	高橋 建吾	関東化学(株)技術・開発本部伊勢原研究所研究員
	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

### 研究要旨

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒対策については、厚生労働省からの通知で商業的殺菌の実施、食品の理化学的性状の調製（pH 4.6 未満，Aw 0.94 未満），冷蔵保存等によりボツリヌス菌を制御すべきであり，また，必要に応じて当該食品への芽胞の接種試験を実施すべきであることが示されている．また，その容器包装については，気体透過性と油脂の酸化等について検討されるようになった．本研究では当該食品を調査し，芽胞接種試験を行ってボツリヌス食中毒に対するリスクを評価した．

平成 14 年度においては，不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（いわゆる新含気調理食品）を対象にボツリヌス菌芽胞の接種試験を行った．供試 9 製品のうち，馬刺くん製，帆立時雨煮，酢豚，白花豆，こんにやく白和え，サバ味噌煮，鶏肉とごぼうの 7 製品において芽胞の発芽・増殖及び毒素産生が確認され，飛魚のやき及びいそ煮においてはボツリヌス菌の発芽・増殖と毒素産生は確認されなかった．

平成 15 年度においては，北海道地場製品の製造，流通，販売実態を調査し，うち 30 製品について理化学試験及び細菌試験を行った．このうち 1 製品（商業的殺菌を満たさず，常温で流通・販売され，理化学的性状が pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上）を対象として芽胞の接種試験を行い，当該食品では芽胞は発芽・増殖せず，毒素は産生されいことを確認した．また，芽胞接種試験法の改善を目的として，当該地場製品 3 製品にボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の芽胞を各々接種し，その消長を観察した．その結果，当該食品中における両菌の発育あるいは毒素産生に差異は認められなかった．

平成 16 年度においては，マウスを用いたボツリヌス毒素試験法の欠点を補い，簡易・迅速で特異性の高い毒素検出法の開発を目指し，ボツリヌス毒素検出用イムノクロマトを試作した．ボツリヌス A, B, E 型毒素とその特異抗体を用いて試作したイムノクロマトシステムは特異性と検出感度に優れていたため，今後，ボツリヌス食中毒発生時の検査，食品工場でのモニタリング試験，当該食品への芽胞の接種試験，その他バイオテロ対策等への応用が可能であると考えられた．サケフレークについては，理化学試験及び細菌試験を行ってボツリヌス食中毒に対する安全性を評価した．さらに無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスクを評価するため，ボツリヌス菌芽胞の接種試験を行う一方，同時にボツリヌス菌の代替株としてスポロゲネス菌が使用できるか否かについても検討した．

### A. 研究目的

平成 14 年度においては，容器包装詰低酸性食品のうち，不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品を対象とし，平成 15 年度においては，北海道の地場製品としての当該食品を対象として理化学試験及び細菌試験を行い，さらにボツリヌス菌芽胞の接種試験を行って当

該食品の危害発生の可能性を評価した．また，平成 15, 16 年度においては，芽胞接種試験を改善する目的で，スポロゲネス菌芽胞を用いた当該食品への接種試験を行い，代替株としてスポロゲネス菌が使用できるか否かについても検討した．平成 15, 16 年

度においては、マウスを用いた毒性試験を改善する目的でイムノクロマト法に着目し、簡易で迅速に結果が得られるボツリヌス毒素検出用キットを試作した。また、平成16年度においては、市販サケフレークの安全性の評価、さらに無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスクを評価するために、ボツリヌス菌芽胞の接種試験を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試検体

平成14年度は不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品の9製品(いわゆる新含気調理食品;馬刺くん製,帆立時雨煮,酢豚,白花豆,こんにやく白和え,サバ味噌煮,鶏肉とごぼう,飛魚のやき,いそ煮),平成15年度には北海道で生産・販売されている30製品を調査し,うち3製品について芽胞接種試験を行った。平成16年度はサケフレーク(3社15検体)の調査を行い,また,無菌包装米飯(1社1製品)を用いて芽胞接種試験を行った。

平成14年度においてはすべての製品を,平成15年度においては製品の製造条件と理化学的性状を考慮して1製品(そうざい)を選び,芽胞接種試験を行い,また,ボツリヌス菌とスポロゲネス菌の芽胞を用いた接種試験の結果を比較するため,さらに2製品(カレー,五目飯の素)を用いた。芽胞接種試験に用いる検体数については,平成14,15年度は各々5検体とし,平成16年度は試験精度の向上を目的として30検体とした。

### 2. 理化学試験及び細菌試験

平成14,15年度においては,芽胞を接種した3検体を初発芽胞数の測定に用い,残り5検体を保存試験(30℃で90日間)に用いた。検体の内容全量が無菌的にストマフィルターに秤量し,これに等量の滅菌蒸留水を加えて2倍乳剤としてpHの測定及び細菌試験に供した。これをさらに5倍希釈して10倍乳剤を調製し,その1mlずつを2枚の滅菌シャーレ及び2枚のアネロービック・パウチに接種後,各々標準寒天培地及びクロストリディア寒天培地を接種して培養した。標準寒天培地は37℃で48時間,クロストリディア培地については37℃で7日間培養した。保存後の試験においては一般生菌数,クロストリジウム属菌数,ボツリヌス菌の測定を行い,ボツリヌス毒素の検出については,マウスを用いた毒性試験とその中和試験により行った。なお,マウスを用いた毒性試験とその中和試験については,毒素試料を濾過滅菌して飼育施設におけるボツリヌス菌汚染防止に配慮し,また,毒素試料注射後,生残したマウスについては動物愛護の観点から,炭酸ガスで

速やかに安楽死させた。容器包装詰加圧加熱殺菌食品(以下,レトルト食品)の缶詰及びパック詰め煮豆製品については*B. stearothermophilus*及び*C. thermosaccharolyticum*を検出対象とした。

水分活性(Aw)の測定には水分活性測定装置(デカゴン,AQUA LAB)を,pHの測定にはpHメーター(ホリバ,pH METER M-15)を用い,液汁を含む製品は無処理の液汁を,また,液汁を含まない製品については,検体に滅菌蒸留水を加えて2倍乳剤とした後に測定した。

### 3. 無菌包装米飯への芽胞の接種試験

#### (1) 供試試料

平成16年度において,無菌包装米飯を用いて芽胞接種試験を実施した。当該製品約160gをプラスチック成型容器(容器:PP/EVOH/PP,蓋材:BNy15/ONy-25/PP50,PP:ポリプロピレン,EVOH:エパール,BNy:バリアナイロン,ONy:延伸ナイロン,PP:無延伸ポリプロピレン)に詰め,脱酸素剤封入してシールし,121℃,15分間殺菌(F<sub>0</sub>値13.1分)して調製した。なお,当該無菌包装米飯の炊飯工程の概要は以下のとおりである。

<炊飯工程>:洗米→浸漬90分→浸漬米充填→連続式加圧蒸気殺菌(138.5℃,約4秒)→炊飯水充填→蒸気炊飯(100℃,30分)

#### (2) 当該食品への芽胞の接種

ボツリヌス菌芽胞混合液を約 $2.0 \times 10^8$  CFU/mlになるよう調製し,この芽胞液を等量ずつ混合して設定芽胞数を $10^8$  CFU/mlの混合液とした。さらに,この混合液を100倍希釈したものを設定芽胞数 $10^6$  CFU/mlの混合液とした。スポロゲネス菌芽胞液については,分離・調製した芽胞液を設定芽胞数 $10^8$  CFU/mlとし,その100倍希釈液を設定芽胞数 $10^6$  CFU/ml液とした。接種芽胞数を $10^2$ 及び $10^4$  CFU/gとし,接種芽胞数と当該食品中でのボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の発育との関係を調べた。なお,予め芽胞を加熱処理してから当該米飯に接種した。芽胞の接種方法は以下のとおりである。

- ① 当該米飯の容器包装表面をアルコール綿でよく拭き,ゴムシール(㈱サン科学製)を貼付した。
- ② 貼付したゴムシール表面をアルコール綿で拭き,各芽胞液(ボツリヌス菌及びスポロゲネス菌由来)を各々,20 $\mu$ lずつ33検体に接種した。対照として滅菌蒸留水20 $\mu$ lを6検体に接種した。
- ③ ゴムシールの接種面をアルコール綿で拭き,針穴付近に同一のゴムシールを貼付した。

#### (3) 接種直後の初発菌数測定

対照試料区,ボツリヌス菌芽胞液接種区及びスポロゲネス菌芽胞液接種区の各3検体について,pH,

一般生菌数, *Clostridium* 属菌数を測定した. なお, ブランクはヘッドスペースガスを分析した.

#### (4) 恒温放置後の細菌の発育の判定

対照試料区 3 検体, ボツリヌス菌およびスポロゲネス菌芽胞接種試料区の各 30 検体を 30°C で 90 日間恒温放置した. 発育の判定については, ボツリヌス菌接種区では恒温放置後 (30°C, 90 日間) に pH の測定, *Clostridium* 属菌の菌数測定及びマウス毒性試験により行った. また, スポロゲネス菌接種区では 30°C 恒温放置期間中の 14, 30, 60 日目に無作為に選択した 3 検体を, さらに 90 日目には残りの検体の pH 及び *Clostridium* 属菌数の測定により発育の有無を判定した.

### 4. イムノクロマトシステム

#### (1) A 型及び B 型毒素と抗体

A 型菌 62A 株及び 213B 株を培養して粗毒素を得た. 毒素試料をトリプシン処理し, これを緩衝液 I (10mM リン酸緩衝液, pH 6.0) で平衡化したラクトースゲルに吸着させ, ゲルを洗浄後, 緩衝液 II (リン酸緩衝液, 100mM, pH 8.0) で溶出した. 溶出された各神経毒素成分を 0.6% ホルマリン加リン酸緩衝液 (50mM, pH 7.0) に透析し, トキシド化した. トキシドとアジュバントとを混ぜ, 家兎の皮下に 2 週おきに 4 回注射して免疫血清を作製した. 得られた免疫血清を硫酸で塩析出し, 透析後, DEAE Toyopearl に吸着させ, 緩衝液 III (50-100mM NaCl 加リン酸緩衝液, 10mM, pH 7.5) で溶出した. 抗体濃度を測定し, 4°C で保存した. A 型あるいは B 型神経毒素成分を分離した後, 無毒成分及び血球凝集素が吸着・残留してるラクトースゲルに家兎抗体をマウントし, アフィニティーカラムクロマトを行った. その Pass-through 分画を特異抗体として集め, その濃度を測定した.

#### (2) リコンビナントタンパク質と抗体

A 型, B 型, E 型の重鎖タンパク質遺伝子を PCR によりクローニングし, 各重鎖遺伝子を発現ベクター (Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質発現用ベクター; pGEX-6P1) に組み込み, その塩基配列を確認した. ベクターを大腸菌に導入して培養し, 培養後, 菌体をリゾチーム及び超音波処理により破壊して発現タンパク質を抽出後, 発現タンパク質を Glutathione Sepharose 4B カラムを用いて精製した. これらリコンビナントタンパク質をアジュバントに混ぜ, これを抗原として家兎に注射して免疫血清を作製した.

#### (3) イムノクロマトシステムの試作

イムノクロマトシステムの試作にあたり, 先ず抗原と抗体の反応性を ELISA 法で確認した. 次に抗

体を用いてイムノクロマトシステムを試作し, その検出感度と特異性を検討した. 今回は特異抗体の調製が遅れたため, 米国製の抗毒素血清 (Metabionics 社製, Affinity purified, Rabbit, 40U/ml) を用いて試作した. 抗原との反応性については, プレートリーダーで 0.2 以上 (主波長 415nm/副波長 492nm の吸光度) を陽性とした. サンプルスポット窓には, 毒素試料液 150  $\mu$ l をマイクロピペットを用いて接種し, バンド形成の有無の最終判定は 30 分後に行った.

### C. 研究結果

#### 1. 当該食品の調査及び芽胞接種試験

平成 14 年度における不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品, 平成 15 年度における地場産品, 平成 16 年度における無菌包装米飯について行った調査及び芽胞接種試験の結果を表 1 に示す.

平成 14 年度において実施した馬刺くん製の理化学的性状は pH 6.0~6.2, Aw 0.96~0.97 で, 初発芽胞数は  $3.9\sim 4.2 \times 10^4$  cfu/g であった. 芽胞を接種して保存試験を行った 5 検体については, いずれの検体においてもボツリヌス菌の増殖ならびに A 型毒素と B 毒素の両方の産生が確認された. 帆立時雨煮の理化学的性状は pH 6.6~6.9, Aw 0.99 で, 初発芽胞数は  $3.0\sim 3.9 \times 10^4$  cfu/g であった. 芽胞を接種して保存試験を行った 5 検体において, いずれの検体からもボツリヌス菌と A 型毒素が検出された. 飛魚のやきの理化学的性状は pH 6.7~6.8, Aw 0.97~0.98 で, 初発芽胞数は  $2.5 \times 10^3\sim 3.5 \times 10^4$  cfu/g であった. 理化学的性状はボツリヌス菌の発芽・増殖が可能な範囲であるにもかかわらず, 芽胞を添加して保存試験を行った 4 検体においてボツリヌス菌の増殖と毒素産生は確認されなかった. このうち 3 検体については, クロストリジウム数は 10 未満/g であった. しかし, 保存 90 日後において残り 1 検体から, ボツリヌス菌の発芽・増殖と毒素産生が確認された. この 1 検体は容器包装の一部に小さな破損箇所が発見され, 容器包装内部が外側から細菌汚染を受けたと考えられたが, その一般生菌数は 10 未満/g であった. いそ煮の理化学的性状は pH 4.9, Aw 0.98 で, 初発芽胞数は  $2.5\sim 3.5 \times 10^4$  cfu/g であった. 本製品は pH がやや低いものの, ボツリヌス菌の増殖可能範囲にあったが, 芽胞を添加して保存試験を行った 5 検体においてボツリヌス菌の発芽・増殖と毒素産生は確認されなかった. 酢豚の理化学的性状は pH 4.7~4.8, Aw 0.98 で, 初発芽胞数は  $3.7\sim 4.8$  cfu/g であった. 本製品は pH がやや低い, 芽胞添加後の保存試験において, すべての検体でボツリヌス菌の増殖及び A 型, B 型毒素が確認された.

平成 15 年度において、商業的殺菌処理を行っている製品 11 件、非加熱及び商業的殺菌条件を満たさない加熱処理を行っている製品 19 件を購入（1 製品 5 検体）して試験を行った。非加熱及び商業的殺菌条件を満たさない加熱処理製品 19 件については、そうざい（茸・梅干瓶詰）の 1 製品を除き、ボツリヌス菌芽胞の添加試験を必要としない製品であった。芽胞の接種試験が必要となった当該製品の水分活性は 0.98 以上、pH は 4.9 で、一般生菌数、クロストリジウム属菌は検出されなかった。長芋の桜吹雪、長芋の醤油漬、大根の紅花漬、にんにくなんぼん、五目飯の素、パウチ詰めカレーでは、 $7.7 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^8$  cfu/g の範囲で一般生菌数が検出された。商業的殺菌処理を行っている煮豆缶詰及びスープ等の 11 件からは、危害分析の対象である *B. stearothermophilus*, *C. thermosaccharolyticum* は検出されなかった。カムアップタイムは、パウチ詰めカレーが 60 分 45 秒、五目飯の素が 50 分、そうざいが 32 分 30 秒であった。パウチ詰めカレーについては、ボツリヌス菌の初発芽胞数は約  $10^3$  cfu/g、スポロゲネス菌は約  $10^2$  cfu/g、五目飯の素については、ボツリヌス菌の初発芽胞数は約  $10^3$  cfu/g、スポロゲネス菌は約  $10^2 \sim 10^3$  cfu/g であった。そうざいについては、ボツリヌス菌の初発芽胞数は約  $10^4$  cfu/g、スポロゲネス菌は約  $10^3$  cfu/g であった。芽胞接種後の恒温放置試験において、パウチ詰めカレーは、ボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の両接種区において、接種 3 日後に全検体がガス産生によりパウチが膨張し、他の 2 製品については両菌の増殖は認められなかった。

平成 16 年度に実施したサケフレークの調査において、いずれの製品からも一般生菌数、クロストリジウム属菌及びボツリヌス菌は検出されなかった。水分含量は A 社の製品が最も高く、水分含量に反比例して塩分濃度は C 社の製品が最も高かった。pH の平均は A 社及び B 社で 6.2、C 社では 5.2 で、水分活性の平均は A 社及び B 社で 0.95、C 社では 0.93 であった。

## 2. 無菌包装米飯への芽胞接種試験

### (1) 接種芽胞液の芽胞数

当該米飯に接種したボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の芽胞液  $20 \mu\text{l}$  中の芽胞数測定結果を表 5 に示す。ボツリヌス菌では、 $10^4$  に設定した接種芽胞液の測定結果は  $3.7 \sim 4.5 \times 10^4$  (平均  $4.0 \times 10^4$ ) cfu/ $20 \mu\text{l}$ 、 $10^6$  に設定した接種芽胞液の測定結果は  $1.7 \sim 1.8 \times 10^6$  (平均  $1.8 \times 10^6$ ) cfu/ $20 \mu\text{l}$  であった。また、同様にスポロゲネス菌は、 $10^4$  に設定した接種芽胞液では  $1.5 \sim 1.7 \times 10^4$  (平均  $1.6 \times 10^4$ ) cfu/ $20 \mu\text{l}$  で、 $10^6$  に設定した接種芽胞液においては  $8.4 \times 10^5 \sim 1.3$

$\times 10^6$  (平均  $1.1 \times 10^6$ ) cfu/ $20 \mu\text{l}$  であった。

### (2) 接種直後の当該米飯の細菌試験

芽胞液を接種した直後の当該米飯の細菌試験結果を表 6 に示す。ボツリヌス菌芽胞を接種した検体のうち、接種芽胞数が  $10^4$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  の検体では、pH 6.9、好気性生菌数 10 cfu/g 未満、*Clostridium* 属菌数は  $2.9 \sim 7.0 \times 10^2$  cfu/g で、接種芽胞数が  $10^6$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  の検体では、pH 6.9、好気性生菌数 10 cfu/g 未満、*Clostridium* 属菌数は  $1.8 \sim 4.4 \times 10^4$  cfu/g であった。また、スポロゲネス菌芽胞を接種区では、接種芽胞数が  $10^4$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  の検体では、pH 6.9、好気性生菌数が 10 cfu/g 未満、*Clostridium* 属菌数は  $1.5 \sim 3.1 \times 10^2$  cfu/g で、接種芽胞数が  $10^6$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  の検体は、pH 6.8、好気性生菌数 10 cfu/g 未満、*Clostridium* 属菌数は  $7.3 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^4$  cfu/g であった。

当該製品の内容量は約 160g であるので、接種芽胞液  $20 \mu\text{l}$  中の芽胞数の平均値から米飯 1g 当たりの接種芽胞数を算定すると、ボツリヌス菌芽胞を  $10^4$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  接種した検体では、 $2.5 \times 10^2$  cfu/g、 $10^6$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  を接種した検体では  $1.1 \times 10^4$  cfu/g となる。スポロゲネス菌芽胞を  $10^4$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  接種した検体では  $1.0 \times 10^2$  cfu/g、 $10^6$  cfu/ $20 \mu\text{l}$  を接種した検体では  $6.9 \times 10^3$  cfu/g となる。

対照区から *Clostridium* 属菌が検出されなかったため、芽胞接種区で検出された *Clostridium* 属菌は、すべて接種したボツリヌス菌又はスポロゲネス菌と考えられた。したがって当該米飯には、ほぼ予定どおりの芽胞数が接種されたと解釈された。

### (3) 当該米飯の恒温放置試験

芽胞液を接種した当該米飯の  $30^\circ\text{C}$ 、90 日後の恒温放置試験結果を表 7 に示す。芽胞液を接種しなかった対照区では、恒温放置期間中に膨脹する検体は認められなかった。ボツリヌス菌芽胞接種区のうち、接種芽胞数が  $10^2$  cfu/g の検体では、pH 6.7~6.9、*Clostridium* 属菌数は  $6.5 \sim 6.6 \times 10^2$  cfu/g で、マウス毒性試験は陰性で、ボツリヌス菌の発育及び毒素産生は認められなかった。しかし、接種芽胞数が  $10^4$  cfu/g の検体では pH 6.3~6.9、*Clostridium* 属菌数は  $4.7 \times 10^5 \sim 3.9 \times 10^6$  cfu/g で、*Clostridium* 属菌数が増加し、マウス毒性試験が陽性で、ボツリヌス菌の発育と毒素産生が認められた。

スポロゲネス菌芽胞接種区では  $30^\circ\text{C}$ 、14 日目の細菌試験において、接種芽胞数が  $10^2$  cfu/g の検体では pH 6.5~6.7、*Clostridium* 属菌数は  $90 \sim 2.9 \times 10^4$  cfu/g で、この時点ですでに *Clostridium* 属菌数が増加した検体が認められた。また、接種芽胞数が  $10^4$  cfu/g の検体では pH 6.7~6.8、*Clostridium* 属菌数は  $3.4 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$  cfu/g で、*Clostridium* 属菌数の増加が認められた。さらに  $30^\circ\text{C}$ 、30 及び 60 日



後では、接種芽胞数が  $10^2$  cfu/g の検体において pH 6.8~6.9, *Clostridium* 属菌数は  $4.3 \times 10^3 \sim 9.4 \times 10^4$  及び  $1.2 \times 10^5 \sim 10^6$  以上 cfu/g で、また、90 日後の検体では pH 6.8~6.9, *Clostridium* 属菌数は  $5.6 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^6$  cfu/g で、*Clostridium* 属菌数の増加が認められた。接種芽胞数が  $10^4$  cfu/g の検体では pH 6.9~7.0, *Clostridium* 属菌数は  $2.4 \sim 4.0 \times 10^5$  及び  $5.1 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^6$  cfu/g、また、90 日後では  $3.3 \sim 7.1 \times 10^5$  cfu/g で、いずれも *Clostridium* 属菌数の明らかな増加が認められた (表 2)。

#### (4) 当該米飯中における細菌の発育状況

当該米飯中におけるボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の発育状況を表 3 に示す。ボツリヌス菌芽胞を  $10^2$  cfu/g 接種した検体では、ボツリヌス菌の発育は認められなかった。 $10^4$  cfu/g 接種した検体では *Clostridium* 属菌数が増加し、マウス毒性試験が陽性であったことから、ボツリヌス菌の発育と毒素産生が認められた。一方、スポロゲネス菌芽胞を接種した検体では、芽胞数を  $10^2$  および  $10^4$  cfu/g 接種したいずれの検体においても *Clostridium* 属菌数が増加したので、スポロゲネス菌の発育が認められた。

#### (5) ヘッドスペースガスの分析

芽胞接種直後及び 90 日間の恒温放置後の当該容器のヘッドスペースガスの分析結果を表 9 に示す。総ガス量は、恒温放置 0 日及び 90 日後において各々、180.0ml 及び 174.7ml で、酸素量についてはいずれの恒温放置期間においても 0 であった。当該食品の容器包材は気体透過性がないため、ヘッドスペースガスについては変化が認められなかった。

### 3. イムノクロマトシステム

#### (1) 抗体価の測定

各株のクックドミート培地培養上清を抗原とし、米国製の血清 (抗 A 型及び抗 B 型抗毒素血清) 及び自家調製の抗 E 型毒素重鎖リコンビナントタンパク質抗体を用いて抗原との反応性を測定した。A 型毒素では約 80 pg/ml 以上、B 型毒素では 25ng/ml 以上、E 型リコンビナントタンパク質では 30 ng/ml 以上で各抗体との反応が有意に確認された。

#### (2) 検出感度と特異性

これらの血清を用いてイムノクロマトシステムを試作し、検出感度、特異性、反応時間を検討した。その結果、検出対象とした毒素型以外の毒素ではバンドが確認されず、検出感度については、A 型毒素検出用システムでは 0.2ng/ml (10 MLD/ml)、B 型毒素検出用システムでは 2.5ng/ml (25 MLD/ml)、E 型毒素検出用システムでは 20ng/ml (200 MLD/ml) で、いずれも微量毒素の検出が可能であった (表 4)。判定時間は 30 分以内であった。

### D. 考察

平成 14 年度において試験に供した不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品の理化学的性状は、いずれもボツリヌス菌の増殖可能な範囲であった。しかし、飛魚のやき及びいそ煮においては、芽胞添加後の保存試験においてボツリヌス菌の増殖と毒素産生は確認されなかった。馬刺くん製については元来包装後加熱食肉製品であり、これを常温で流通・保存するためには  $120^\circ\text{C}$  で 4 分間の加熱殺菌が必要であるが、実際には  $75^\circ\text{C}$ 、10 分間及び  $80^\circ\text{C}$ 、10 分間の二段階加熱処理であった。このため、バチルス属菌やクロストリジウム属菌などの芽胞形成細菌が生残する結果となった。食肉中ではボツリヌス菌は容易に増殖しやすいが、容器包装内には多量の空気が含まれているので、ボツリヌス菌芽胞が発芽できる酸化還元電位に到達するまでにやや日数を要するものと推察された。帆立時雨煮については、同様にボツリヌス菌が容易に発育する食品であり、容器包装内は多量の空気を含まず、また、液汁も存在することから、芽胞の発芽が短時間内に起こり、毒素が産生されたと考えられた。酢豚については、その pH がやや低い状態であったが、豚肉からの滲出液が食品全体に緩衝作用を示すことによって芽胞が発芽しやすくなったと考えられた。いそ煮の原材料は昆布と竹の子でタンパク質成分に乏しく、容器包装内には多量の空気を含み、しかも pH が低かったので芽胞は発芽しなかったと考える。飛魚のやきについてはタンパク質成分に富み、保存料等の食品添加物を含まないにもかかわらず、90 日間の保存試験において容器包装の一部が破損していた 1 検体を除き、ボツリヌス菌の発芽・増殖と毒素産生は確認されなかった。容器包装の一部が破損し、毒素産生が確認された 1 検体については、容器包装外側からの細菌による汚染は認められなかった。食品中でのボツリヌス菌については、共存する好気性芽胞形成細菌が発育してその酸化還元電位を低減させた後に、増殖を開始するといわれている。しかし、この検体からはバチルス属等の好気性芽胞形成細菌は検出されなかった。容器包装内容の外気への暴露がどのような機序で毒素産生につながったかについては、依然不明である。一般に魚肉ねり製品の一つであるちくわにはソルビン酸が添加されているが、飛魚のやきについてはソルビン酸の使用の有無についての表示は示されていない。本製品には容器包装内に多量の空気が含まれており、またソルビン酸が添加されているならば、ボツリヌス菌は常温においても発芽・増殖することはないと考えられる。サバの味噌煮については、タンパク質成分が豊富であり、かつ容器包装内は多量

の空気を含まず、また、液汁も存在することから、芽胞の発芽が比較的短時間内に起こり、毒素が産生されたと考えられた。鶏肉とごぼうについては、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生が確認されるまでに75日を要した。本製品は容器包装内に多量の空気が含まれ、かつ液汁はほとんど含まない状態であったため、芽胞の発芽・増殖と毒素産生が容易には起こりにくい食品と考えられるが、鶏肉からの滲出液が食品全体に水分を与え、また、緩衝作用を示すことによって芽胞が発芽し易くなったと考えられた。白花豆はpH 6.1, Awは0.96, こんにやく白和えはpH 5.9, Aw 0.98で、いずれもボツリヌス菌が十分に増殖できる範囲であった。特に豆類の成分は、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生に適している。こんにやく自体は強アルカリ食品で、ボツリヌス菌に対するリスクはないが、他の食品との混合によりpHが低下し、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生が可能となる。

平成15年度において試験に供した当該製品のうち、好気性細菌が検出された五目飯の素については、好気性細菌が食品の酸化還元電位を低下させるとボツリヌス菌が容易に発育するので、I群菌の増殖を抑制するためには冷蔵あるいは冷凍保存を義務付ける必要があり、また、10℃以下でも増殖が可能なII群菌に対しては、加熱殺菌あるいは賞味期限の設定が必要である。ニンジンピクルス、長芋の桜吹雪、長芋の醤油漬、大根の赤ピーツ、大根の紅花漬において、ガス産生によるパウチの膨張が認められた。ニンジンピクルスについては常温保管3日後に、また、他の4製品(漬け物)は入手した時点でガス産生によりパウチが膨張しており、しかもパウチの膨張圧力により製品を梱包していた発泡スチロール箱が破損を受けていた。ニンジンピクルスのpHは3.65であったので、ボツリヌス菌以外の細菌によるものと考えられた。細菌試験を行ったところ、多数の*Lactobacillus brevis*が検出され、ガス産生の原因が本菌の増殖によるものと断定された。ニンジンピクルスは常温保存品であり、製品中の本菌を制御するためには、60℃で10分以上の加熱処理による殺菌が必要である。他の4製品(漬け物)については、発酵によるガス産生であるので、これと同等以上の加熱処理を行うか、あるいは冷凍保存が必要である。パウチ詰めカレーは冷凍保存品であるが、多数の一般生菌数が検出されているので、これを調理後、消費者が誤って常温で放置した場合には平成11年に千葉県で発生したボツリヌス食中毒と類似の事例発生につながる可能性もある。ボツリヌス食中毒は、発生頻度は低いものの極めて致死率が高いので、当該製品の製造・流通・販売には細心の注意が必要である。

平成16年度において調査したサケフレークは要冷蔵品で、培養群Iのボツリヌス菌のリスクはないと考えられた。また、冷蔵保存中の培養群IIのリスクについては、培養群IIの最低発育水分活性が0.97であることから、当該製品はボツリヌス菌によるリスクのない食品といえる。無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスク評価のために行った芽胞接種試験において、接種芽胞数によってボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の発育の度合いに差が認められた。今回の接種試験では、接種芽胞数を1g当たり $10^2$  CFU及び $10^4$  CFUの2段階の濃度で実施し、芽胞を $10^2$  CFU接種した米飯ではボツリヌス菌の発育の兆候は認められなかったが、芽胞を $10^4$  CFU接種した米飯では、ボツリヌス菌の発育が認められた。スポロゲネス菌の米飯中における発育能については、接種芽胞数の濃度の違いに関係なく発育が認められた。一般にボツリヌスの接種試験において、当該食品には1g当たり $10^3$ ~ $10^4$  CFUの芽胞が接種され、今回の接種試験では、接種芽胞数を1g当たり $10^2$  CFU及び $10^4$  CFUの2段階の濃度で実施した。ボツリヌス菌の代替株としてのスポロゲネス菌の米飯中における発育能については、接種芽胞数の濃度の違いに関係なく発育が認められ、代替株として用いることが可能であると考えられた。ボツリヌス菌芽胞の接種濃度の違いによる発育能は今後の検討課題と考える。

わが国では平成11年以降、ボツリヌス食中度は発生していないが、その疑い例は依然として後を絶たず、常に迅速な対応が求められる。今回、われわれは本厚生科学研究の一環として、ボツリヌス毒素の簡易・迅速検出を目的としてイムノクロマト法に着目し、A型、B型、E型毒素検出用イムノクロマトシステムを試作した。クックドミート培養上清(A~F型)を用いて本システムを検定したところ、本キットの特異性が確認され、検出感度はA型毒素検出用システムで2ng/ml(10MLD/ml)、B型毒素検出用システムで2.5ng/ml(25MLD/ml)、E型毒素検出用システムでは20ng/ml(200MLD/ml)で、いずれも微量のボツリヌス毒素の検出が可能であった。今回の結果から、本イムノクロマトシステムを用いたボツリヌスA型、B型、E型毒素の検出法は特異性と検出感度に優れ、今後ボツリヌス症発生時の検査、食品工場でのスクリーニング試験、容器包装詰低酸性食品への芽胞接種試験、バイオテロリズム対策に応用が可能である。ボツリヌス毒素診断用免疫血清の入手が困難となった現在、簡易濃縮装置の併用による検出感度の向上及びキット自体の性能をさらに改善し、その普及を図りたいと考える。

## E. 結論

平成 14 年度において、9 種類の不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品について理化学的性状を調べた後、ボツリヌス菌芽胞の添加試験を行った。いずれの製品も理化学的性状はボツリヌス菌の増殖可能範囲であったが、芽胞の発芽・増殖と毒素産生が 2 製品において認められなかった。今後製造基準や製品の冷蔵保存等、当該食品の取り扱いに関する指導を行う場合には、原材料の把握、容器包装内の空気の度合い、理化学的性状、加熱殺菌温度と暴露時間、保存料の使用の有無などを考慮し、最終的には製品への芽胞の添加試験の実施が必要である。

平成 15 年度において容器包装詰低酸性食品の調査を行い、北海道で製造・流通している 66 製品のうち、加熱殺菌条件、保存条件、理化学的性状等を考慮して 30 製品を選択して購入した。これらの食品のうち、芽胞の添加試験を必要とした食品は 1 製品(梅干加工品瓶詰)のみであった。芽胞の添加試験を改善する目的で、当該 3 製品についてボツリヌス菌及びスポロゲネス菌芽胞の添加試験を行った。当該製品においては、ボツリヌス菌接種区とスポロゲネス菌接種区に差異は認められなかったことから、芽胞添加試験にはスポロゲネス菌の代用が可能であると考えられた。

平成 16 年度に調査したサケフレークは要冷蔵、水分活性 0.93~0.95 で、本製品はボツリヌス食中毒のリスクのない食品であると考えられた。無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスク評価のために行った芽胞接種試験において、接種芽胞数によってボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の芽胞の発育状況に差が認められた。芽胞を  $10^2$  CFU 接種した当該米飯ではボツリヌス菌の発育は認められなかったが、芽胞を  $10^4$  CFU 接種した米飯ではボツリヌス菌の発育が認められた。一方、スポロゲネス菌芽胞を接種した当該米飯では、芽胞数を  $10^2$  および  $10^4$  CFU/g 接種したいずれの検体においてもスポロゲネス菌の発育が認められた。ボツリヌス毒素の簡易・迅速検出を目的としてイムノクロマト法に着目して実験を行った。精製 7S 神経毒素と特異抗体を用いて作製した本キットにより、ボツリヌス A, B, E 型毒素(培養上清)を簡易・迅速に検出することができ、しかもその特異性と検出感度に優れていることが確認さ

れたので、今後、ボツリヌス症発生時の検査、食品工場でのモニタリング試験、芽胞接種試験等への応用が可能であると考えられた。

## F. 健康危害情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1). 武士甲一：乳児ボツリヌス症，松浦三男編集，総合臨床（感染症診療・投薬ガイド），永井書店，大阪市，2003，pp.476-481
- 2). 小熊恵二，武士甲一：ボツリヌス菌，松本慶蔵編集，病原菌の今日的意味，医薬ジャーナル社，大阪市，2003，pp.289-305
- 3). 武士甲一，熊田洋行，小村哲生，木村 稔：ホタテ加工場における危害分析及び衛生管理に関する調査研究，北海道立衛生研究所報，52，pp.37-44，2002
- 4). 小熊恵二，武士甲一：ボツリヌス菌，日本小児感染症学会編集，小児感染症マニュアル，(株)東京医薬社，東京都，2003，pp.91-110
- 5). 武士甲一：ボツリヌス菌，厚生労働省監修，食品衛生検査指針微生物編，(社)日本食品衛生協会，東京都，2004，pp.283-296
- 6). Hasegawa,K., Watanabe,T., Takeshi,K., Ohyama,T., et al.:Characterization of toxin complex produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* serotype D 4947. Protein J., 23(6), 371-378, 2004
- 7). Nagano, H., Fujita, K., Takeshi, K., et al.:Phenotypic and genotypic characterization of  $\beta$ -D-glucuronidase positive shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. J. Med. Microbiol., 53(10), 1037-1043, 2004

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許登録番号第 3584251 号，発明の名称：ハロー撮影装置およびハロー撮影方法，  
発明者：笹川伸之，平田三穂子，武士甲一，平成 16 年 8 月 13 日

表 1. 平成 14~16 年度において実施した容器包装詰低酸性食品の調査結果

#	製品名	理化学試験		微生物学的試験			芽胞接種試験		増殖毒素
		pH	Aw	一般生菌数 (cfu/g)	<i>Clostridium</i> (cfu/g)	<i>C. botulinum</i> (g)	実施の必要性 必要 不要		
1	馬刺くん製	6.1	0.97	10 未満	10 未満	陽性	○		+
2	帆立時雨煮物	6.7	0.99	10 未満	10 未満	陰性	○		+
3	飛魚のやき	6.7	0.98	10 未満	10 未満	陰性	○		-
4	いそ煮	4.9	0.98	10 未満	10 未満	陰性	○		-
5	酢豚	4.8	0.98	10 未満	10 未満	陰性	○		+
6	白花豆	6.1	0.96	10 未満	10 未満	陰性	○		+
7	こんにゃく白和え	6.0	0.98	10 未満	10 未満	陰性	○		+
8	サバの味噌煮	6.1	0.96	10 未満	10 未満	陰性	○		+
9	鶏肉とごぼう	5.5	0.97	10 未満	10 未満	陰性	○		+
10	ピクルス	3.7	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
11	ふき水物	4.7	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
12	漬物 (胡瓜)	4.3	0.97	10 未満	10 未満	陰性		○	
13	漬物 (茄子)	4.6	0.96	10 未満	10 未満	陰性		○	
14	野菜加工品 (長芋)	4.3	0.98	1.3 x 10 <sup>8</sup>	10 未満	陰性		○	
15	野菜加工品 (長芋)	4.5	0.98	1.4 x 10 <sup>7</sup>	10 未満	陰性		○	
16	漬物 (大根)	4.4	0.98	3.6 x 10 <sup>3</sup>	10 未満	陰性		○	
17	そうざい (茸梅干瓶詰)	5.3	0.94	1.1 x 10 <sup>4</sup>	10 未満	陰性	○		-
18	佃煮 (ふき)	5.2	0.85	10 未満	10 未満	陰性		○	
19	佃煮 (ふき)	4.8	0.86	10 未満	10 未満	陰性		○	
20	佃煮 (ふき)	4.7	0.83	10 未満	10 未満	陰性		○	
21	ふき水煮	4.5	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
22	そうざい (茸瓶詰)	5.3	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
23	カレー	5.4	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
24	そうざい (茸瓶詰)	4.8	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	-
25	そうざい (茸瓶詰)	4.4	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
26	カレー	5.5	0.98	8.1 x 10 <sup>2</sup>	10 未満	陰性		○	+
27	シチュー	5.2	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
28	カレー	5.7	0.98	10 未満	10 未満	陰性		○	
29	サケフレーク	6.2	0.95	10 未満	10 未満	陰性		○	
30	サケフレーク	6.2	0.95	10 未満	10 未満	陰性		○	
31	サケフレーク	5.2	0.93	10 未満	10 未満	陰性		○	
32	無菌包装米飯	6.3	0.98	10 未満	10 未満	陰性	○		±*

±\*: ボツリヌス菌芽胞 102 cfu/g 接種区では陰性, ボツリヌス菌芽胞 104cfu/g 及びスポロゲネス菌芽胞 10<sup>2</sup>, 10<sup>4</sup>cfu/g 接種区では陽性

表 2. 無菌包装米飯の 30℃, 90 日の恒温放置後の細菌試験及び毒素試験結果

接種区	恒温放置 期 間	設定芽胞数 (CFU/g)	容器の 膨張	pH	<i>Clostridium</i> 属菌 (CFU/g)	毒素産生
ブランク	90	—	なし	6.9~7.0	< 10	NT <sup>1)</sup>
ボツリヌス菌	90	10 <sup>2</sup>	なし	6.7~6.9*	65~6.6×10 <sup>2</sup> *	—*
		10 <sup>4</sup>	なし	6.3~6.9	4.7×10 <sup>5</sup> ~3.9×10 <sup>6</sup>	+
スポロゲネス菌	14	10 <sup>2</sup>	なし	6.5~6.7	90~2.9×10 <sup>4</sup>	NT
		10 <sup>4</sup>	なし	6.7~6.8	4.7×10 <sup>5</sup> ~3.9×10 <sup>6</sup>	NT
	30	10 <sup>2</sup>	なし	6.8~6.9	4.3×10 <sup>3</sup> ~9.4×10 <sup>4</sup>	NT
		10 <sup>4</sup>	なし	6.9	4.7×10 <sup>5</sup> ~3.9×10 <sup>6</sup>	NT
	60	10 <sup>2</sup>	なし	6.9	1.2×10 <sup>5</sup> ~> 10 <sup>6</sup>	NT
		10 <sup>4</sup>	なし	6.9~7.0	5.1×10 <sup>5</sup> ~3.3×10 <sup>6</sup>	NT
	90	10 <sup>2</sup>	なし	6.8~6.9	4.3×10 <sup>3</sup> ~9.4×10 <sup>4</sup>	NT
		10 <sup>4</sup>	なし	6.8~6.9	4.7×10 <sup>5</sup> ~3.9×10 <sup>6</sup>	NT

1) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず, \*, 30 検体中 15 検体の試験結果 (残りは試験中)

表 3. 無菌包装米飯における芽胞の発育状況

接種芽胞液	設定芽胞数 (CFU/g)	
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
ボツリヌス菌	— <sup>1)</sup>	+
スポロゲネス菌	+	+

1) 30℃, 90 日間恒温放置後の発育状況

+: 発育陽性, -: 発育陰性

表 4. イムノクロマトシステムの検出感度及び特異性

毒素型	毒素量 (MLD/ml)	イムノクロマトシステム		
		A 型毒素用	B 型毒素用	E 型毒素用
A	1,000	+	—	—
B	10,000	—	+	—
C	200	—	—	—
D	200	—	—	—
E	800	—	—	+
F	200	—	—	—
検出感度		10 MLD/ml	25 MLD/ml	200 MLD/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 —植物抽出液によるボツリヌス菌の増殖抑制試験および麺類等 の接種培養試験—

分担研究者 中野宏幸（広島大学大学院生物圏科学研究科）

研究協力者 崔海英（広島大学大学院生物圏科学研究科）

## 研究要旨

容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス食中毒予防の観点から、植物抽出液のボツリヌス菌発芽および増殖阻止効果について検討した。その結果、セントジョーンズワート（SJW）およびカレープランツ（CP）のエタノール抽出液に高い抗菌活性が認められ、供試したすべての菌株に対する最小発育阻止濃度（MIC）は0.1-0.2%であった。また、本菌に対する抑制効果がすでに知られている香辛料のメース、ナツメグ、セージ、ベイリース、セージのエタノール抽出液は0.2%濃度で増殖阻止効果を示した。全般にエタノール抽出液は熱水抽出液より効果が高かったが、ユーカリおよび漢方薬の黄連（オウレン）熱水抽出液のMICは0.2-0.5%と効果がみられた。試験した50種類の植物のうち、約半数の26検体（52%）がボツリヌス菌に対する増殖抑制作用を示した。これらの抗菌性を弱酸性のpH6.0あるいは5.5の条件で試験するとMICは大きく低下し、SJWおよびCPのMICは0.02%（pH5.5）になった。これに対し、試験培地のNaCl濃度を2%まで上げて一部香辛料を除いて影響はみられなかった。亜硝酸ナトリウムと植物抽出液の併用効果についてCMM（クックトミート培地）（pH6.0 & 2%NaCl）で検討した結果、SJW、CP、ナツメグ等に相乗効果が認められた。例えば、0.01%の添加で亜硝酸塩のMICを60ppmから8-15ppmに低下させた。

次に、ボツリヌス菌芽胞の接種培養試験（30℃）において、「ゆで日本そば」（pH5.0, Aw1.00）は90日目まで増殖は認められなかったが、「カスタードプディング」（pH6.7, Aw0.99）は保存5日目から一部の検体で増殖の兆候が認められ、12日目には全検体が発芽・増殖して膨化・破裂し、高い毒性が認められた。

## A. 研究目的

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が本研究班によってすすめられている。食中毒予防の観点から、当該製品の製造・常温流通の可否、原材料の厳選、製造・処理法や容器包装の改良などの検討に加えて、ボツリヌス菌の発芽や増殖を阻害する抗菌物質の利用は重要な手段となる。近年、消費者の健康志向から一般的に食品添加物や塩分が敬遠され、食の低塩化がすすんでいる。例えば、食肉製品に発色剤として添加されている亜硝酸ナトリウムは同時にボツリヌス菌に対する抑制作用を有しているため、このような低塩化は本菌に

よる食中毒発生の危険性をむしろ高めている。

ところで、本菌の食品中での増殖を抑制する目的で、亜硝酸塩以外にソルビン酸、マレイン酸、各種有機酸などの化学物質、乳酸菌やその代謝産物のバクテリオシンや香辛料抽出液の効果が報告されている。食品の微生物制御における保存料として、従来の化学合成物質から天然物由来の抗菌成分の利用に関心が高まっている。本分担研究においては、ハーブ類など植物抽出液の抗菌性を応用して本食中毒予防を目指した。ボツリヌス菌に対して高い静菌作用を有するものを探索した後、pHや食塩の影響や亜硝酸塩との相乗効果についても検討した。

またこれとは別に、容器包装詰低酸性食品のリスク評価の中で、「カスタードプディング」と「ゆで日本そば」の2品目の接種保存試験を分担し、これらについて評価を行なった。

## B. 研究方法

### 1. 植物抽出液のボツリヌス菌増殖抑制試験

#### (1) 植物抽出液の調製

表1に示す合計50種類のハーブ、市販香辛料、漢方薬等の植物から2通りの抽出法で検体を自製した。生ハーブの場合は採取・水洗して数時間以内にハサミで細かく切り刻み、粉末の市販品の場合はそのまま、ネジ付ビンに入れて秤量した。重量で9倍量のエタノール(99.5%, ナカライ, 特級)を入れ、室温で2日間振盪抽出した。この液体部分を10,000rpm, 30分遠心分離して得た上清を10%濃度のエタノール抽出液とした。また、エタノールの代わりに精製水(DW)を入れ、100℃の湯浴上で2時間加熱抽出し、遠心上清をメンブレンフィルター(0.22 $\mu$ m)でろ過滅菌したものを10%濃度の熱水抽出液とした。

#### (2) 試験菌株

スクリーニング試験には *Clostridium botulinum* A型菌として62A株, Kyoto株(乳児ボツリヌス症由来), B型菌としてOkra株, F型菌としてLangeland株, さらに *Clostridium sporogenes* PA3679株を用いた。保存株をTPGY broth(tripticase peptone - glucose - yeast extract, pH 7.0)で35℃, 24時間培養し100倍希釈したものを栄養細胞とみなして接種に用いた。62AおよびOkra株については, Schmidt & Nunk (1960)の報告した芽胞作製培地で作製した芽胞懸濁液を約10<sup>6</sup>cfu/mlに希釈したのもも接種に用いた。

#### (3) 植物抽出液のMICの測定

上記の抽出液のボツリヌス菌に対する抗菌性を寒天平板希釈法で調べた。DWを所定量より10%減じて作製したTPGY寒天培地を滅菌後50℃に保持し、10%抽出液とDWを加え、EtOH抽出液の場合0.5%および0.2%濃度、熱水抽出液の場合1%および0.5%濃度の平板を作製した。平板を一夜嫌気ジャー(Oxoid, 水素ガス置換)で保存して乾燥した後、平板をいくつかに区分し、試験菌を一白金耳量画線接種した。35℃,

2-3日嫌気培養後、発育状況を観察した。増殖抑制作用のみられたものについてはさらに希釈段階を増やして、MIC(minimal inhibitory concentration, 最小発育阻止濃度)を算出した。なお、コントロールには同じ量のエタノールあるいはDWを加えたものを用いた。実験は3回繰り返して行ない、出現頻度の高かったデータを採用した。

#### (4) 植物抽出液の抗菌性に及ぼすpH, 食塩, 亜硝酸ナトリウムの影響

上記の試験でボツリヌス菌に有効であった抽出液については、基礎培地(TPGY寒天)のpH(7.0, 6.0, 5.5)とNaCl濃度(0%, 1%, 2%)を変えてMICを調べた。

また、CMM(cooked meat medium, Difco)の液体部分をpH6.0に修正し、NaClを2.0%添加した培地に所定量の亜硝酸塩ナトリウムを加えた後で滅菌した基礎培地を用いて、植物抽出液との併用試験を行なった。次に、亜硝酸塩と植物抽出液をそれぞれ単独、あるいは併用した場合の増殖抑制について経時的に菌数を測定して調べた。すなわち、A型62A株の芽胞液を初期菌数が10<sup>3</sup>cfu/mlになるよう接種し、25℃で嫌気培養し、1, 2, 4, 7, 14日目にそれぞれ変法GAM寒天培地を用いた混釈法で菌数測定を行った。

### 2. 「カスタードプディング」および「ゆで日本そば」のボツリヌス菌芽胞接種培養試験

#### (1) 保存検体の作製

「カスタードプディング」と「ゆで日本そば」の2品目を、厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課の依頼により、それぞれ日本菓子協会、全国製麺協同組合連合会より入手した。各33検体について、80℃, 20分間ヒートショックした芽胞液(A; 62AATCC株, 62ANFPA株, 36A株, B型; Okra株, 213B株, 以上5菌株の等量混合液)20 $\mu$ lをゴムシート添付部に注入接種した。対照として同量の滅菌DWを6検体に接種した。これらは、膨張破損した場合の安全を考慮して、さらにPP製の密閉袋にそれぞれ入れた。以上の接種操作、および初期芽胞数の測定は日本缶詰協会研究所に依頼して実施された。

#### (2) pHおよびAwの測定

未接種の検体について、DWを加えて2倍乳剤を作製し、Awを水分活性測定装置(デカゴン,

AQUALAB), pH を pH メーター (東亜電波工業製, HM-50V) で測定した。なお, 芽胞接種培養検体については, 電極を介した汚染の危険を避けるため, pH 試験紙による概略値として測定した。

### (3) 保存条件および保存期間

30℃の専用恒温培養器でコンテナに入れて保存し, 毎日1回, 容器の外観変化の有無を観察した。「カスタードプディング」の場合, 容器の膨化が明らかでなかったため液体漏出がみられるまで培養を続け, その時点で4℃の保冷庫に移した。保存後, 最長3日以内に細菌数等の測定を行なった。

### (4) 生菌数およびクロストリジア数の測定

検体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, ストマフィルターS) に採取し, 秤量した。同重量の滅菌DWを加え, ストマッカーで約1分間ホモジナイズした (2倍希釈液)。なお, このストマフィルター濾液の一部を15mlのPP試験管に移して-20℃冷凍保存し, まとめて理化学試験およびマウス毒性試験に供試した。

次に2倍希釈液2mlを8mlの0.1%ペプトン加生理食塩水に加え10倍希釈液を作製した後, 順次10倍希釈段階系列を作製した。生菌数の測定のために, これらの希釈液を1mlずつ2枚のシャーレに接種し, 滅菌溶解後50℃に保持した標準寒天培地を15ml加え十分に混和し, 固化させた。さらに同培地10mlを重層, 固化, 乾燥後, 30℃で4日間培養して出現コロニーを計数した。クロストリジア数の測定のためには同じく各希釈液1mlを2枚の滅菌パウチ (酒見医科製) に接種した後, 滅菌溶解して52℃に保持したクロストリジア寒天培地 (ニッスイ, 所定濃度の2/3で作製) を15ml加えて十分に混和, 固化させた後, ヒートシールした。30℃で1日培養し, 黒色コロニーを計数した。なお, コロニー数の少ないものについては5日目まで培養を継続した。

### (5) マウス毒性試験

冷凍保存した検体を解凍後, 卓上遠心機で10,000rpm, 15分間遠心分離し, その上清液を別容器に移した。なお, カスタードプディングの場合, 上部に黄色の脂肪層がみられたため中央部の水層をマイクロピペットで取り出し, 再び遠心分離した上清 (中央の液体部分) を用いた。これら, 0.5mlを各2匹のマウス (♂, 3-4wk,

ddY) 腹腔(ip)に注射し, 4日目まで観察した。腹壁の振動と陥没, 呼吸困難などボツリヌス特有の神経麻痺症状の経過を示して斃死した場合, 本毒素陽性とした。これらについては, 100℃, 10分加熱処理検体を同じくip注射して毒素の不活化を確認した。ボツリヌス毒素が検出された場合, 2倍希釈液を0.05M酢酸緩衝液(pH6.0)で10倍希釈したものについて, 抗A型毒素血清, 抗B型毒素血清, およびこれら両者を混合したものをを用いて中和試験を行った。なお, 反応は試験管内で行ない, 抗血清 (千葉血清50IU/ml) はマウスあたり1IUになるように調製した。A型抗血清で生存した場合をA型毒素, B型抗血清で生存した場合B型毒素, 両方の血清でのみ中和された場合をA型+B型と判定した。一方, 10倍希釈液0.1mlをマウス尾静脈(iv)に正確に注射し, その死亡時間からKondoら(1984)の計算式により毒素の定量 (マウスipLD<sub>50</sub>)を試みた。

## C. 研究結果

### 1. 植物抽出液によるボツリヌス菌の増殖抑制

試験した50種類の植物のうち, 表1に示すように, 半数の25検体(50%)のEtOH抽出液がボツリヌス菌に対する増殖抑制作用を示した。これらのMICに基づき以下のように大別した。

1) 高い活性(MIC:0.2%以下): セントジョーンズワート, カレープランツ, ローゼマリー, セージ, メース, ナツメグ, ベイリーブス。

2) 中程度の活性(MIC:0.5-1.0%): ユーカリ, ミモザ, ラベンダーセージ, カラミンサ, カモマイル(花・葉混合), パプリカ, スペアミント, 食用ゼラニウム[ナツメグゼラニウム, アップルゼラニウム, レモンゼラニウム, パイナップルゼラニウム]。

3) 低い活性(高濃度でのみ部分的増殖抑制): チェリーセージ, クチナシ, サントリナ, タイム, シソ, 山椒, ペパーミント。

これらのうち, セントジョーンズワートとカレープランツのMICは0.1%で最も高い抗菌活性を示した。これに対して, 熱水抽出液の効果は全般的に低く, 黄連(MIC:0.2%)とユーカリ(MIC:0.5%)以外は全く効果がみられないか1%という高濃度でわずかに抑制がみられたのみであった。菌株ではA型(62A株), B型(Okra



株), *C. sporogenes* の3者はほぼ同様の挙動を示したが, 乳児ボツリヌス症由来のA型(Kyoto株), あるいはF型(Langeland株)の植物抽出液に対する感受性はやや高かった。また, 芽胞を接種に用いた場合と栄養細胞ではほとんど差がみられず, 液体培地における芽胞接種検体のMIC付近の遠心沈渣を顕微鏡下で観察すると芽胞と栄養細胞がおよそ同数みられた。

## 2. 各種条件下における植物抽出液の抗菌作用

試験培地のpHを下げると, pH5.0では, 植物抽出液を含まないコントロールでも完全に発育阻止された。表2に示すように, セントジョーンズワートの62A株に対するMIC(%)は0.1(pH7.0)から0.02(pH6.0)に低下し, 効果が高まった。カレープランツにも同様の傾向がみられたが, メースやベイリースのようにpH低下の影響を受けにくいものもみられた。また, B型菌Okra株では, 栄養細胞を接種した場合, pH6.0におけるMICは0.1%と変わらなかったが, 芽胞接種の場合, 0.02%と低下し, 発芽の抑制が認められた。NaCl濃度を1%あるいは2%に高めた場合, 表3に示すように植物抽出液の効果はほとんど変わらなかった。但し, pHの影響を受けにくかったベイリースのMICは2%のNaCl添加で0.1%まで低下した。

## 3. 亜硝酸塩と植物抽出液の併用効果

CMM broth (2% NaCl添加, pH 6.0)における亜硝酸ナトリウムのボツリヌス菌に対するMICは60ppmであった。ところが単独使用では効果の全くみられない0.02%濃度のセントジョーンズワート抽出液と併用すると15ppm, 0.05%濃度では8ppm以下にMICが低下した。ナツメグでは0.01%の併用で亜硝酸塩のMICが8ppm以下となった。このような植物抽出液と亜硝酸ナトリウムの相乗効果は, カレープランツ, メース, セージにおいても認められた。

25℃保存における経時的菌数変化でみた場合, 図2に示すように, 亜硝酸塩15ppmのみでは増殖開始時間の延長はみられたものの最終的に最高菌数まで増殖した。また, セントジョーンズワートEtOH抽出液は0.01%という微量では全く抑制効果はみられなかった。しかしながら, これら両者を併用すると2週間まで全く増殖の兆候は認められなかった。亜硝酸塩とナツメグ(図3), 亜硝酸塩とカレープランツ(図4)に

も同様の併用効果が観察された。

## 4. ボツリヌス菌の接種培養試験(表5&6)

カスタードプディング(pH6.7, Aw0.99)に芽胞液を接種し30℃で恒温保存試験を行なった。初期接種菌数は $9.5 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$ cfu/g, 標準寒天での生菌数は $< 10$ /gであった。4日目まで容器の外観に変化はなかったが, 5日目に30検体のうち半数の15検体で容器上面にわずかな膨らみが認められた。但し, この膨化状態は容器の特性から肉眼的にはほとんど特定できず, 上面を押してまったく余裕がない張りつめた状態であることから判断した。そのうち2検体(CP-13, CP-14)はシール部分から内容物(液体)が漏出していた。続いて6日目には6検体が, 7日目にはさらに6検体が, 8日目で全接種検体が膨化した。一方, 12日目には全検体で漏出がみられたので恒温保存試験を終了した。この時点でコントロール(DW接種群)は外観の変化はなく, 各細菌数も $< 10$ /gであった。30検体のうち, 最初に漏出陽性となった2検体を含めた10検体のボツリヌス菌数(クロストリジア)は $7.0 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^7$ cfu/g, 標準寒天生菌数は $< 10$ /g, pHは5.7~6.3であった。マウス毒性試験ではすべてボツリヌスに特異的な症状を示して1時間前後で死亡したのに対し, 加熱処理群では生存した。中和試験で抗A型毒素血清, 抗B型毒素血清ではそれぞれマウスは大差なく死亡したが, 両血清投与群では生存したことから, A型, B型の両方の毒素が確認された。また, マウス静脈注射法により毒素を定量したところ, 最高がCP-27における $5.6 \times 10^5$  ip LD<sub>50</sub>/g, 最低がCP-30における $6.4 \times 10^4$  ip LD<sub>50</sub>/gであった。

ゆで日本そば(pH5.0~5.1, Aw1.00)に芽胞液を接種し30℃で恒温保存試験を行なった。初期接種菌数は $6.5 \sim 7.8 \times 10^3$ cfu/g, 標準寒天での生菌数は $< 10$ /gであった。外観の変化は現在(90日目, 2005/5/3)まで全くみられていないが, 保存約1ヶ月目(36日目)に5検体, 保存約2ヶ月目(64日目)に10検体を開封して試験した。これら15検体のボツリヌス菌数(クロストリジア数)は $2.6 \sim 8.5 \times 10^3$ cfu/gと接種時と同じかやや低い菌数で, 増殖は認められなかった。標準寒天生菌数は $< 10$ /g, pHは4.8~5.0であった。マウス毒性試験ではすべて症状はみられず生存した。

#### D. 考察

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒予防の視点から植物抽出液の効果について検討した。一般に植物には外界の病原体からの自己防御手段として微量の抗菌物質が含まれることが多い。また、抗酸化性の機能成分が同時に抗菌作用を有している場合もみられる。一部の香辛料の抗防腐作用は人類の初期の時代から経験的に使われてきた。現在、ワサビやニンニク等の成分が食品保存に有効であることが証明され、一部は実用化している。お茶のポリフェノール成分であるガレートカテキン類やテアフラビンの効果もよく知られている。日持ち向上剤として用いられる天然物の多くは植物由来のものである。これまでに香辛料の食中毒細菌に対する抑制効果が調べられ、とくにグラム陽性菌に有効であることが分かっている。今回の試験で高い抗菌性がみられたメース、ナツメグ、ベイリース等の香辛料エタノール抽出液のボツリヌス菌に対する効果はすでに報告されている。但し、これらの有効濃度での添加は食品の味や風味を損ねる場合が多く、適用可能な食品は限定される欠点がある。これに対し、セントジョーンズワートとカレープランツはこれまでその抗菌性はほとんど報告されていない日本では珍しい部類のハーブである。香辛料とちがって水分を多く含む生ハーブであることから、MICが0.1%であることはメース、ナツメグ等よりも微量で有効な成分が含まれることが推測された。また、これらは天然物とは言え、安全性の面で今後十分な評価される必要があるが、香辛料のような強い食味はないのでこの点からも有効と思われた。

オトギリソウ科植物の多年生草本であるセントジョーンズワート (*Hypericum perforatum*) は、古くから日本でも搾汁を創傷や打撲傷に、湿布薬として神経痛、リウマチの治療に民間薬として用いられていたと著述がみられる。原産地はヨーロッパ、アジア、北アフリカで、現在では世界各地で栽培されている。最近では、これの抗うつ作用が注目を浴び、軽いうつ症状に処方される場合もある。これの抗菌性に関して、酢酸エチル、クロロホルムおよびメタノール抽出物の *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* に対する静菌効果、さらには、これの有効成分

として hypericin が報告されている。

カレープランツ (*Helichrysum italicum*) は黄色の花をつける低木で、ヨーロッパ、地中海地方に広く分布している。この花の部分は、その抗炎症効果や抗アレルギー性から日焼けや紅紋など皮膚の治療のための化粧品として民間療法に用いられてきた。同時に *Helichrysum* 属の植物は抗菌効果を有することが知られており、最近の研究から、*H. aurenitens* や *H. stoechas* のジクロロメタン抽出物がグラム陽性菌に抗菌効果を示すことが証明されている。このように、薬用ハーブの抗菌効果に関する科学的な報告については断片的なものが少しあるだけで十分ではないので調査の継続が必要である。

実際の食品は pH が低酸性領域で、しかも多少の塩分が含まれるものが多いことから、MIC に及ぼす pH と NaCl の影響を調べた。この結果、NaCl 濃度に関しては、本菌の増殖に影響を与えない 2% 濃度まで MIC に変化はみられなかった。これに対し、多くの植物抽出液では pH を 6.0 あるいは 5.5 に低下させると MIC は低下し、効果が高まった。植物中の有効成分の同定には至っていないが、これまでの多くの報告では、単一の成分での抗菌性は元の植物抽出液の活性と比較して低く、複数の成分が関与していることが推定されている。例えば、セントジョーンズワートの有効成分の 1 つである hypericin はベンゼン環に OH-基や CHO-基を有する物質であるが、これはむしろ酸性条件下では不安定とされている。今回ボツリヌス菌の増殖が阻害されない pH 5.5-6.0 で抗菌性が高くなったのは、菌にとって必ずしも増殖至適条件ではなかったことによるものと思われた。

ところで、植物抽出液の抗菌性はソルビン酸などの化学物質とは異なり、単独で制御因子とするにはかなりの高濃度が必要なため、むしろ別の抑制因子を補充あるいは補強する役割が期待される。今回は、食肉製品で使われる亜硝酸ナトリウムと植物抽出液の併用について検討した。発色剤の亜硝酸ナトリウムは食肉や魚肉などに含まれる二級アミンと酸性条件下で反応しニトロソアミンを形成することから、最大使用基準値の 70ppm よりかなり低い量で使われている。また、無添加であることを全面に強調したで冷蔵流通が必須の製品も増加している。今回

の試験では TPGY 培地ではなく、より食肉製品に近い CMM (クックトミート) 培地で試験した。亜硝酸塩の抗菌性は加熱によって高くなるためオートクレーブ前に添加した。通常の CMM (pH7) で試験すると MIC は 250ppm 以上と高かった。TPGY における MIC は数 ppm であるので、肉成分により亜硝酸塩の効果が激減したと思われた。そこで、より食肉製品に近い pH6.0, 2% NaCl にした CMM で試験を行なった。亜硝酸塩単独での MIC は 60ppm であったが、0.02% という微量のセントジョーンズワート抽出液と併用すると 15ppm, 0.05% 濃度では 8ppm 以下に MIC を低下させることができた。ナツメグでも 0.01% の併用で亜硝酸塩の MIC が 8ppm 以下となった。このような植物抽出液と亜硝酸ナトリウムの相乗効果は他のいくつかの植物抽出液においても認められた。亜硝酸ナトリウムの場合と異なり、食品成分 (肉成分) による植物抽出液の抗菌性の低下はそれほど認められなかったことも考えると、亜硝酸ナトリウムの添加量を抑えた製品の安全性を確保するために植物抽出液の利用は有効と考えられた。亜硝酸ナトリウム以外の阻害要因の補強効果についても検討する価値が高いと思われた。

次に、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において、実際の食品への接種保存試験は重要であるため、2品目を担当して試験した。「カスタードプディング」は pH6.7, Aw0.99 かつ豊富なタンパク含量から、保存料などの添加物が使われていない限り、十分に本菌の発芽、増殖、毒素産生を支持するものと当初考えていたが、予想通り5日目増殖が始まり12日目には全検体で容器の破裂および内容物の漏出がみられた。腐敗臭はそれほど強くなく、ヨーグルトあるいはチーズのような発酵臭であった。糖分が豊富なため pH は 6.0 前後まで低下したが、これはまだ十分増殖可能で産生毒素を安定化させる条件であった。毒性試験におけるマウスの神経症状の進行や A 型 19S 毒素から推定した静脈注射法による毒力から培地に匹敵するほど本菌の増殖と毒素産生を支持するものであることがわかった。ボツリヌス菌数はほとんど  $10^6$  cfu/g のオーダーにとどまり、接種菌数の  $10^4$  cfu/g から考えてこれだけ高い毒性は不思議であった。この理由として、

1) 脂肪を多く含む検体中で菌体が塊状に存在し、ストマッカー処理やその後のボルテックス攪拌でも十分に単一の細胞に分離されていなかった、2) 容器から漏出するまで培養を続けたが実際は早い時期に最高菌数に達しており菌数測定時には死滅期に入っていた、あるいは 4℃ で数日保存中に菌数が減少した、3) 毒性試験で大量の脂肪部分を2度除いて液体部分を試験したため毒素の濃縮が起きた、などの要因が考えられた。また、DW を接種したコントロールでは、製品の細菌増殖特性に反して、好気性菌数、嫌気性菌数ともに  $<10$ /g であったこと、また消費期限が 10 か月と長期に設定されていることから考えて、製品は当初から完全に滅菌されている可能性が高かった。そこで、これらの製品の製造工程における加熱条件を製造元に問い合わせたところ、115℃、40 分のレトルト釜で加熱されていることが判明した。これは製品中心部の温度ではないことを考慮しても 120℃、4 分相当以上の加熱がなされている製品とみなせる食品と思われた。脂肪や蛋白を多く含む食品であるので、実際に芽胞接種検体の殺菌試験を行って確認する必要があるかもしれないが、現時点ではボツリヌス菌に関するリスクの低い製品と判断した。但し、加熱不十分な場合はボツリヌス菌の増殖を容易に許す製品であるので、完璧な加熱工程の保証が重要であることが再確認された。

「ゆで日本そば」については実験途中で年度末となったが、現在のところボツリヌス菌の増殖、毒素産生はみられていない。本製品の Aw は 1.00 であったが、pH が 5.0 と低くこれがボツリヌス菌芽胞の発芽抑制あるいは増殖抑制に働いているものとみられた。この製品の製造について製造元に問い合わせたところ、「保存性に富むゆで麺の製造方法」として自社特許を得た製法、すなわち食酢、グリシン、クエン酸ナトリウムの混合液に浸漬工程があることから、pH や有機酸などが微生物の増殖抑制要因であることが推定された。加熱工程は 98℃、22 分間であるので、ボツリヌス菌芽胞の汚染があれば残存する製品であった。酸性領域で増殖可能な他の汚染微生物が増殖した場合の影響が無視できるかどうかは不明である。現時点では、ボツリヌス菌に関するリスクはかなり低い品目と判

断した。消費期限が4か月とされているので、残りの15検体については観察を継続し、消費期限の1.5倍の期間である6ヶ月目(2005年8月)には開封検査して安全性を最終確認する予定である。

#### E. 結論

ボツリヌス食中毒予防の観点から植物抽出液の抗菌性の利用は有効と思われた。とくに、セントジョーンズワートやカレープランツのエタノール抽出液はほとんど食味に影響しない0.1%濃度でボツリヌス菌の増殖を完全に阻止し、弱酸性条件ではさらに抗菌性が高まった。さらに、亜硝酸ナトリウムとの相乗効果もみられ、低塩化した食肉製品のリスク低減に役立つと考えられた。また、接種保存試験における容器包装詰低酸性食品のリスク評価において分担した「カスタードプディング」および「ゆで日本そば」の2品目について、前者では増殖・毒素産生がみられたものの、所定の製造工程が確実に実施されておればリスクは非常に低い製品であると判断した。

#### F. 研究発表

特になし

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし