

表題 回虫卵検査法としての超音波利用の是非について判断するための試験

受付番号 第 AA14-13-06367 号 (受付日 : 2014 年 5 月 8 日)

試験依頼者 国立感染症研究所 寄生動物部
東京都新宿区戸山 1-23-1

被験物質 ブタ回虫

試験項目 回虫卵検査法としての超音波利用の是非について判断するための試験

試験開始日 2014 年 5 月 8 日

試験終了日 2015 年 1 月 22 日

資料保管場所 公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所

保管期間 試験終了後 5 年間

試験施設 公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所
東京都町田市忠生 2-5-47

試験検査区分責任者 小高 秀正

試験検査員 堀内 朗子、平田 史子、松本 奈保子、
丸山 弓美、奥津 敬右、吉田 建介、秋葉 達也

試験検査部門責任者 公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所
所長 桑崎 俊昭
2015 年 1 月 22 日



試験目的	P.45
試験方法	
1. 試験項目	P.45
2. 被験物質	P.45
3. 試薬	P.45
4. 使用器具	P.45
5. 回虫卵接種野菜（検体）の調製	P.46
6. 超音波法の試験条件設定	P.46
6.1. 超音波法の試験条件設定	
6.2. 容器のリンス回数の検討	
7. 超音波法と、従来法およびストマッカー法の比較	P.47
7.1. 回収虫卵数の比較	
7.2. 沈渣量の比較	
試験結果	P.49
まとめ	P.53

《試験目的》

本試験は、回虫卵検査法として超音波利用の是非について判断することを目的に実施した。まず、超音波法による試験条件設定のための検討を行い、次いで、設定した条件による超音波法と、従来法およびストマッカー法の3種類の方法により回収虫卵数を求めて比較した。

《試験方法》

1. 試験項目

回虫卵検査法としての超音波利用の是非について判断するための試験

2. 被験物質

名称 : ブタ回虫
受領日 : 2013年11月26日 (受付番号 AA13-13-05803 で受領)
提供者 : 国立感染症研究所 寄生動物部

3. 試薬

消泡剤添加 0.5% Tween80・クエン酸緩衝液 (洗浄液) : 自家製

0.1M クエン酸溶液 614.5mL : 自家製

0.2M リン酸二ナトリウム溶液 385.5mL : 自家製

Tween80 5g : 関東化学

Antifoam A 150 μ L : SIGMA

酢酸エチル : 和光純薬

Sigmacote® : SIGMA

4. 使用器具

4.1. 回虫卵懸濁液作製用器具

眼科剪刀*

ピンセット*

5mL ポリスチレンラウンドチューブ*

マイクロピペット (チップ : 200 μ L*, 1,000 μ L)

ボルテックスミキサー (VTM-252) : 和光純薬

* : Sigmacote でコーティング

4.2. 各試験法で使用した器具

4.2.1. 共通器具

茶漉し (ϕ 6cm, メッシュ#40)

メッシュ (ϕ 10cm, 目開き 180 μ m, 線径 125 μ m)

円錐型液量計 (500mL, 1,000mL)

遠沈管 (15mL, 50mL)

スポイト

スライドガラス

カバーガラス

アスピレーター

遠心分離機 (5930) : クボタ

顕微鏡 (BX51) : オリンパス

4.2.2. 超音波法

超音波洗浄水槽 : ダルトン (発振器 : 東京超音波技研製, 型番 UP-305, 出力 700W, 周波数 27kHz)

洗浄容器 : 広口ねじ口瓶 1000mL : デュラン

4.2.3. 従来法

洗浄容器 : ステンレス製バット

洗浄器具 : 歯ブラシ

4.2.4. ストマッカー法

洗浄機器 : ストマッカー (Pro・media SH-II M) : エルメックス

洗浄容器 : ストマッカー袋 (細菌検査用ポリ袋 400mL) : オルガノ

5. 回虫卵接種野菜 (検体) の調製

虫卵を接種する野菜として白菜を選定し, 下記の操作により検体を調製した.

- 5.1. 回虫卵を, ブタ回虫のメス成虫の膈と子宮より採取し, はさみで細切したのち, 精製水に懸濁した. 得られた回虫卵懸濁液の 10 μ L または 20 μ L をスライドガラス上に取り, カバーガラスを掛けて顕微鏡下に虫卵数を計数し, その数を基に検体の調製に必要な虫卵の懸濁液量を求めた.
- 5.2. 白菜はざく切りにして全体を混ぜ合わせ, 所定の重量を秤量してトレイに重ならないように広げ, 所定の虫卵数となるよう回虫卵懸濁液を滴下して室温で自然乾燥させた. 乾燥させた検体はトレイごと密閉して, 試験当日まで冷蔵保管した.

6. 超音波法の試験条件設定

6.1. 超音波処理時間の検討

超音波洗浄装置を用いて検体から回虫卵を回収するために至適な超音波処理時間について, 検討を行った.

- ① 検体 100g (回虫卵 1000 個接種) と洗浄液 500mL を洗浄容器に入れた.
- ② 約 10 分間検体を洗浄液に浸したのち, 超音波処理を行った. 超音波処理時間として 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 分の 6 群を設定した.
- ③ 超音波処理後, 洗浄液の全量を液量計に移し, 30 分間静置したのち, 上清 400 mL をアスピレーターで吸引除去した.
- ④ 3) で残った洗浄液 (100mL) を 50mL 遠沈管に分注した. 液量計の管壁を精製水 50mL で洗い, 50mL 遠沈管に移した. 管壁の洗いは 2 回行った.
- ⑤ これら 50 mL 遠沈管 (計 4 本) を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した.

- ⑥ 上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣を 15mL 遠沈管に移した。さらに精製水で 50mL 遠沈管の管壁を洗い、これを 15mL 遠沈管に加えた。
- ⑦ 6) を 2000 回転で 5 分間遠心分離した。
- ⑧ 上清を吸引除去した後、8 ml の洗浄液で沈渣を再浮遊し、これに酢酸エチルを 2mL ずつ加えて密栓し、1 分間激しく振とうした。
- ⑨ 8) を 2000 回転で 5 分間遠心分離した。
- ⑩ 沈渣を残して上清を吸引除去し、管壁に付着した浮遊層の残渣を綿棒でふき取った。
- ⑪ 得られた沈渣（回収沈渣）を少量の洗浄液に再浮遊させ、顕微鏡下に全量を観察し、虫卵数を求めた。

6.2. 洗浄容器のリンス回数の検討

洗浄容器の壁面等に虫卵が付着して、回収虫卵数の低下を招く可能性があることから、洗浄容器のリンス回数について検討を行った。

- ① 検体（回虫卵 1000 個）100g と洗浄液 500mL を洗浄容器に入れた。
- ② 10 分間検体を洗浄液に浸したのち軽く攪拌し、5 分間超音波処理を行った。
- ③ 洗浄液全量を液量計に移したのち、容器に新たに洗浄液 250mL を入れ、手で容器を回しながら検体をリンスした。リンスは合計 3 回実施し、各回の洗浄液は各々別の液量計に採取した。
- ④ 3) の液量計を 30 分間静置したのち、洗浄液の上清をアスピレーターで吸引除去して 100 mL とし、2 本の 50mL 遠沈管に移した。液量計はそれぞれの管壁を精製水 50mL で 2 回洗って遠沈管に加えた。
- ⑤ 4) を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。
- ⑥ 上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣を 15mL 遠沈管に集め、さらに水で各 50mL 遠沈管に付着した沈渣を洗い、これも遠沈管に加えた。
- ⑦ 遠沈管を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。
- ⑧ 回収沈渣を少量の洗浄液に再浮遊させ、顕微鏡下に全量を観察し、虫卵数を求めた。

7. 超音波法と、従来法およびストマッカー法の比較

7.1. 回収虫卵数の比較

超音波法と、従来法およびストマッカー法により虫卵回収を試み、回収虫卵数を比較した。ストマッカー法と従来法の操作は、本研究所発行の試験検査成績書（2014 年 2 月 27 日発行、AA13-13-05803 号）記載の方法に準拠した。いずれの試験法においても、検体重量は 50g、接種虫卵数は 1000 個または 200 個、洗浄液量は 250mL とした。試験数は各々 5 回（n=5）とした。得られた値は F 検定により分散を見極め、t-検定で有意差を調べた。

また、検体とした白菜に回虫卵の付着がないことを確認するため、無処理の白菜 50g を超音波法にて検査した。

7.2. 回収された沈渣の量と性状の比較

各試験法における回収沈渣の量と性状を比較するため、白菜 50g を超音波法および従来法、ストマッカー法でそれぞれ処理した。沈渣の重量は秤量し、性状を顕微鏡下に観察した。試

験数は各々2回 ($n=2$) とした.

《試験結果》

1. 超音波処理時間の検討

超音波処理の時間を0分から15分に設定し、虫卵の回収に最も有効な超音波処理時間について検討した。その結果、5分処理において最も回収虫卵数が多かったことから、本試験における超音波処理時間は5分間とした。なお、無処理群を除き、いずれの処理時間においても卵殻が破損された回虫卵がごく少数認められた。

表1 超音波処理時間と回収虫卵数

処理時間 (分)	回収虫卵数 (破損数)
0	336 (0)
1	70 (2)
3	654 (4)
5	935 (5)
7	206 (9)
10	97 (3)
15	256 (2)

2. 洗浄容器のリンス回数の検討

虫卵の回収に有効な洗浄容器のリンス回数について検討を行った。その結果、2回のリンスで虫卵総数の96%が回収できたことから、リンスの回数は2回とした(表2)。

表2 洗浄容器のリンス回数と回収虫卵数

リンス回数 (回目)	回収虫卵数 (個)	累積回収数 (個)	累積回収率 (%)
0	192	192	26
1	436	628	86
2	72	700	96
3	28	728	100

3. 3種類の試験法による回収虫卵数の比較

3.1. 接種虫卵数 1000 個での検討

1. および 2. により設定した条件で超音波法を実施し、回収虫卵数を従来法およびストマッカー法によるものと比較した。その結果、回収虫卵数はストマッカー法が最も多かった（表 3）。超音波法と従来法、超音波法とストマッカー法による回収虫卵数の有意差検定を行ったところ、 $P(T \leq t)$ の両側は各々 0.07, 0.11 が得られて 0.05 以上となり、有意水準 5% で有意差は認められなかった。一方、従来法とストマッカー法については、 $P(T \leq t)$ の両側が 0.02 で 0.05 以下となり、有意水準 5% で有意差が認められた。なお無処理の白菜からは、虫卵は検出されなかった。

表 3 3種の回収法による回収虫卵数

試験法	回収虫卵数 (個)					平均±SD	t 検定 : $P(T \leq t)$ 両側	
	超音波法	従来法	ストマッカー法	追加回虫卵数	平均		超音波法	従来法
超音波法	1031	1032	1263	1210	1112	1130 ± 105	-	-
従来法	854	469	1074	777	1132	861 ± 264	0.07	-
ストマッカー法	1505	1813	1670	1640	800	1486 ± 399	0.11	0.02*

* : 有意水準 5% で有意差あり

3.2. 接種虫卵数 200 個での検討

より少数（約 200 個）の回虫卵接種検体について、回収虫卵数を比較した。超音波法および従来法、ストマッカー法のいずれにおいても、有意水準 5% での有意差は認められなかった（表 4）。

表 4 3種の回収法による回収虫卵数

試験法	回収虫卵数 (個)					平均 ±SD	t 検定 : $P(T \leq t)$ 両側	
	超音波法	従来法	ストマッカー法	追加回虫卵数	平均		超音波法	従来法
超音波法	160	110	131	143	121	133 ± 19	-	-
従来法	122	151	185	107	102	133 ± 35	0.98	-
ストマッカー法	71	187	181	156	178	155 ± 48	0.38	0.45
追加回虫卵数	181	241	181	213	135	190 ± 40		

4. 各試験法により回収された沈渣の量と性状の比較

各試験法により回収された沈渣の量と性状を比較した(表5)。従来法ではメッシュを使用しないため粒子状の沈渣の混入を認めたが、その量は検体ごとにばらつきがあった。ストマッカー法では沈渣の重量は従来法の2分の1以下であったが、メッシュを通過する微細な沈渣が多く、その結果として肉眼的に認める沈渣の容量は最大となった(図1および2)。超音波法では沈渣量が最少となった。

各試験法により回収され沈渣を顕微鏡下に観察したところ、超音波法と従来法では沈渣に夾雑物が少ないのに対し、ストマッカー法では夾雑物が多数認められた(図3)。

表5 3種の回収虫卵方法による検体沈渣量の比較

試験数	超音波法	従来法	ストマッカー法
1	0.02	0.18	0.04
2	0.01	0.07	0.06
平均	0.01	0.13	0.05

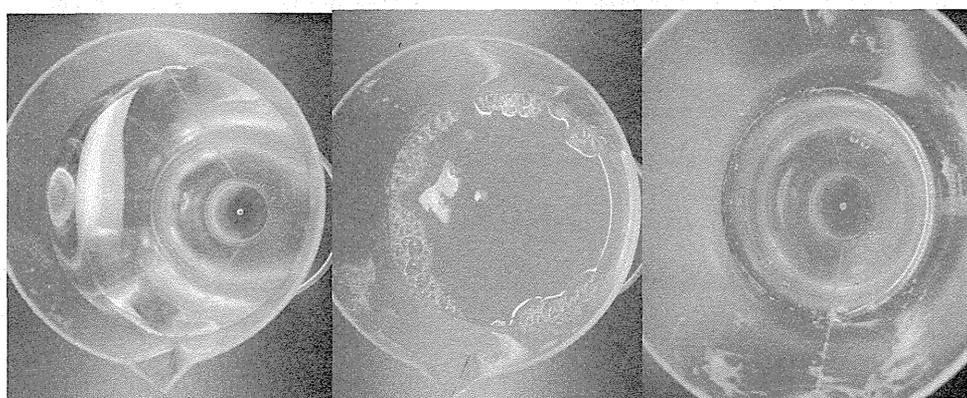


図1 3方法の回収洗浄液の性状(肉眼所見1)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

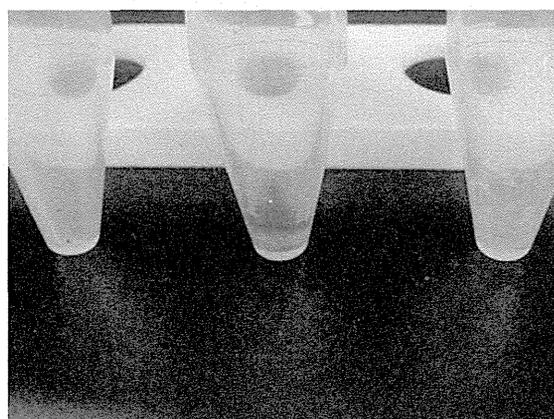


図2 3方法の検体沈渣の性状(肉眼所見2)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

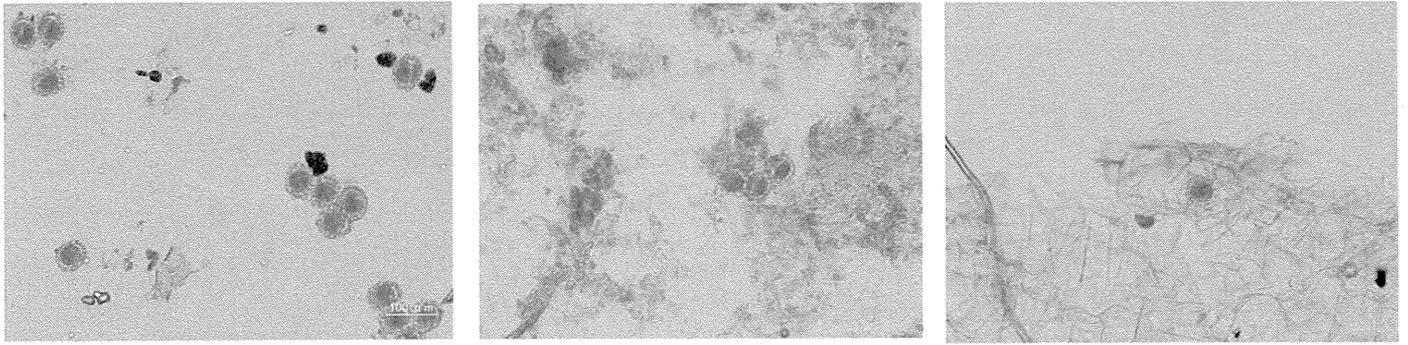


図3 3方法の検体沈渣の性状（顕微鏡所見）（×100）
（左，超音波法；中，ストマッカー法；右，従来法）

《まとめ》

回虫卵検査法として超音波利用の是非について判断するため、試験条件について虫卵回収数を指標に検討を行った。その結果、今回用いた機種では、5分間の超音波処理の後、洗浄容器を2回リンスすることにした。その上で超音波法による本試験を実施し、同時に実施した従来法およびストマッカー法による試験結果と相互に比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意な差を認めなかった（接種回虫卵数が1,000個及び200個の場合共に）。なお接種回虫卵数を1,000個とした場合に、ストマッカー法による回収虫卵数が、従来法のそれより有意に高いとの結果を得た。

試験検査区分責任者： 小高 秀正 印

容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌対策に係る情報収集と 食品内挙動に関する研究

研究分担者	廣井豊子	国立大学法人帯広畜産大学	畜産衛生学研究部門	食品衛生学分野
協力研究者	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学	畜産衛生学研究部門	食品衛生学分野
研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	
協力研究者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	
協力研究者	倉園 久生	国立大学法人帯広畜産大学	畜産衛生学研究部門	食品衛生学分野

研究要旨

国内に流通する容器包装詰低酸性食品については、平成 20 年 6 月 17 日付食安基発第 0617003 号及び食安監発第 0617003 号において、ボツリヌス対策に係る指導通知が出されている。しかしながら、平成 22 年のボツリヌス食中毒対策状況に関するフォローアップ調査で、指導内容を逸脱する製品の流通がみられた。この結果をうけ、昨年度の本分担研究では、通年で流通する「たくあん」製品を対象に、低温流通・保存の製品表示の有無、衛生指標菌検出状況および理化学性状 (pH、酸化還元電位) に関する調査を行ない、低温流通・保存が表示されず流通する 9 製品中 2 製品で pH が 4.6 を超えており、指導内容を逸脱している状態であることを確認した。本年度は、昨年度の検討で指導内容を逸脱していた製品を検体として用い、保存実験を行なった。使用した検体の pH は、昨年同様依然、指導内容を逸脱している状態で改善は見られていなかった。ボツリヌス菌芽胞液未接種群での 4℃ および 30℃ での保存試験では、保存期間にともない、pH、酸化還元電位の上昇傾向が見られた。ボツリヌス菌芽胞液添加群での保存試験では、保存初期 15 日目で菌数の減少がみられたが、その後は維持あるいは微細な上昇傾向も見られ、さらに継続して、長期的な保存試験の必要性があると思われた。また、クロストリジア属菌の発育を許容する酸化還元電位幅に関する知見を得るため、電気培養装置を用いた検討を行なったところ、約-200~+200mV の範囲で発育が認められた。当該範囲は大気中における多くの食品が含まれることから、酸化還元電位をボツリヌス菌の発育阻止する理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

A. 研究目的

市場に流通する食品は、原材料や産地の多様化に加え、その容器包装形態にも近年、多様化の傾向がみられる。その中で、容器包装に密閉した常温流通食品は、その利便性から様々な原材

料に適用され、これに包含される食品としては、120℃ 4 分間以上または同等の加熱加圧殺菌がなされている「レトルトパウチ食品 (容器包装詰加圧加熱殺菌食品) のほか、pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超えるものであって

120℃ 4 分間に満たない条件で殺菌を行う、いわゆる「容器包装詰低酸性食品」等が含まれる。レトルトパウチ食品に比べ、容器包装詰低酸性食品では、常温保存/放置により、ボツリヌス菌等のヒト健康危害の高い病原微生物の食品内増殖を招く恐れがあることが報告されており、実際に平成 11 年には千葉県内では家庭内で誤って常温保存された要冷蔵容器包装詰食品の喫食により、ボツリヌス食中毒が発生している。こうした事態を踏まえ、厚生労働省では、平成 14-16 年度厚生労働科学研究「容器包装詰低酸性食品ボツリヌス食中毒に対するリスク評価」を通じて、関連食品における汚染実態や食品内挙動、および海外のボツリヌス食中毒に関する情報収集を行なって来た。その後に開催された、厚生労働省 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会（平成 19 年 6 月 26 日開催）では、上記研究課題の成果並びにコーデックス委員会をはじめとした海外諸国の対応状況を鑑み、国内に流通する当該食品の原材料の処理および製造における管理措置として、①当該食品中のボツリヌス菌を除去する、②ボツリヌス菌の増殖を防止する、または③ボツリヌス毒素の産生を防止する、のいずれかをとることとし、具体的には①中心部温度を 120℃ 4 分間加熱する方法またはこれと同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行なうこと、②冷蔵（10℃ 以下）保存、③適切な常温流通期間の設定を行なうよう、通知が出された（平成 20 年 6 月 17 日付、食安基発第 0617003 号、食安監発第 0617003 号）。

その後、平成 24 年 7 月 27 日に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会では、平成 22 年 7～8 月に食品等事業者団体（45

団体）を通じて、ボツリヌス食中毒対策状況についてフォローアップ 調査を行なった結果が開示された。平成 22 年の通知時点または調査時点では、計 59 品目の食品が容器包装詰低酸性食品に該当するとの報告がなされ、このうち、①120℃ で 4 分間または同等以上の条件で加熱殺菌を行なっていた食品は 12 品目、②10℃ 以下の冷蔵条件で流通されていた食品が 6 品目、③pH を 4.6 以下に調整していた食品が 1 品目、④水分活性を 0.94 以下としていた食品が 5 品目、⑤ボツリヌス菌もしくは代換となる指標菌の接種試験を行なっていた食品が 21 品目、⑥対策の改善が必要だと考えられていた食品が 14 品目であった（うち、2 品目は部会開催時において既に 120℃ で 4 分間と同等以上の殺菌を実施するよう改善が図られたほか、5 品目は販売中止となっていた。）以後、十分な対応が取られていない可能性がある食品等事業者が含まれる団体については、厚生労働省担当者による危害性の個別周知を図っているが、その後の流通状況を踏まえた調査は行っていない。前回の調査より 3 年間が経過していることから、現在における対応状況を把握することが求められている。本分担研究では、こうした背景から、平成 25 年度にインターネットを通じて購入可能な容器包装詰低酸性食品の情報を収集するとともに、厚生労働省による指導内容の対応状況について検証を行なった。その結果、容器包装詰低酸性食品として国内に流通する食品のうち、「たくあん」製品が一年を通じて流通している現状を把握するとともに、厚生労働省による指導内容を逸脱した製造基準を経て、製造・流通される製品が存在する事を明らかにした。さらに一部の製品では、ボツリヌス菌の短

期保存が確認された。この結果をふまえ、平成26年度には、ボツリヌス菌芽胞液の添加保存実験を3つの異なる温度帯で長期的に行なうとともに、ボツリヌス菌の増殖を許容する酸化還元電位の幅の調査を行なった。

B. 材料と方法

1. 保存試験 (ボツリヌス菌添加回収試験)

1. 供試検体 (食品)

平成25年度の本分担研究の検討結果で、容器包装詰食品で常温流通にもかかわらず、理化学性状が厚生労働省 指導内容(平成20年6月17日付食安基発第0617003号および食安監発第0617003号)で定める基準を逸脱していた(pH4.6超)「たくあん」製品1種を本年度の検体とし、大手インターネットサイト(楽天市場 www.rakuten.co.jp およびアマゾン www.amazon.co.jp)を通じて購入した。

2. 供試菌株

平成25年度と同様に、ボツリヌスA型菌として、62A, 33A, 36A, CB21, Renkon1の5菌種を、ボツリヌスB型菌としてOkra, NH-2, 67B, 326-5, 407-1の5菌種を用いた。

3. 試薬および培地等

1) クックドミート培地

ブドウ糖0.6g、可溶性デンプン0.4gを精製水200mLに加熱溶解させた。クックドミート培地(Difco)1gと、上記のブドウ糖可溶性デンプン水溶液10mLをスクリュウ栓付き試験管(18mm x 180mm)に分注後、121°C 15分間オートクレーブした。オートクレーブ後は、冷水にて急冷させた。

2) 芽胞調整用培地

トリプチケースペプトン(BDバイオサイエンス)50g、ペプトン(BDバイオサイエンス)5gおよびメルカプト酢酸ナトリウム(関東化学)1gを精製水1,000mLに溶解、pHを7.0に調整後、121°C 15分間オートクレーブした。

3) ペプトン加生理食塩水

ペプトン(BDバイオサイエンス)1gおよび塩化ナトリウム8.5gを精製水1,000mLに溶解、pHを7.0に調整後、121°C 15分間オートクレーブした。

4) クロストリジア培地

クロストリジア培地(白水)46.9gを精製水1,000mLに溶解後、121°C 15分間オートクレーブし、使用直前まで加温保存した。

5) 標準寒天培地

標準寒天培地(白水)23.5gを精製水1,000mLに溶解後、121°C 15分間オートクレーブし、使用直前まで加温保存した。

6) pHメーター

堀場製LAQUA F21を用い、pH測定用電極として#9680を、酸化還元電位測定用電極として#9300-10Dを使用した。

4. 方法

1) 芽胞液の調製

各供試菌株をクックドミート培地で一晚嫌気培養後、芽胞調整用培地10mLに接種し、30°Cで一晩培養した。80°C 20分間の加熱処理後、再び30°Cで培養した。同加熱処理を翌日および一週間後に繰り返した後、滅菌水で3回洗浄した。芽胞形成は、ウィルツ芽胞染色キット(武藤化学(株))を用いて芽胞染色後、顕微鏡下で観察する事で確認した。作製した芽胞液は、試料保存容器に分注後、-80°Cに保存した。芽胞菌数は、凍結融解後、クロストリジア寒天培地を

用いて混釈培養し、黒色コロニー数を測定し算出した。

2) 保存試験

ボツリヌス菌芽胞液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、80°C 20 分間の加熱処理後、検体 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように接種した。芽胞液接種時には、検体の容器包装の密閉性を保つため、封かん強度測定器用ゴムシール (サン科学) を使用した。芽胞液接種後の保存期間は 0 日、15 日、30 日、90 日、120 日、180 日、360 日とし、保存温度は、4°C、25°C、30°C とした。(実験開始日を保存期間 0 日とする。現在、継続試験中である。) 本試験には、各保存期間、各保存温度につき 4 検体を供した。陰性対照として、芽胞液未接種の検体を芽胞菌接種検体と同様に保存試験に供した。ただし、陰性対照群の保存温度は 4°C と 30°C とした。

3) 理化学性状の測定

芽胞液未接種の検体を用い、経時的に食品内理化学性状の測定を行なった。検体の容器包装を外部から 70%エタノールで消毒後、使い捨て滅菌済みメスを用いて、容器包装および検体食品の一部を切開した。pH 電極ならびに酸化還元電位用電極を検体内部に挿入し、pH および酸化還元電位を測定した。

4) 一般細菌数の測定

検体 100 g を無菌的に取り、ペプトン加生理食塩水 100 mL を加え、スタマッカーにて十分混和させ試料原液 (検体の 2 倍希釈液) とした。試料原液は、さらにペプトン加生理食塩水を加え 10 倍希釈液を作成し、その後さらに 10 倍段階希釈した。各試料液 1 mL を標準寒天培地に

混釈し、35°C で 48 時間培養を行ない、コロニーを計測し、検体 1 g あたりの菌数を求めた。混釈培地は各段階希釈液に対して 2 枚作製した。培養の陰性対照として、検体希釈に用いたペプトン加生理食塩水 1 mL を培地に混釈し、同様に操作、培養を行なった。

5) クロストリジア数の測定

一般細菌数測定時に作成した 10 倍段階希釈試料液を使用した。各試料液 1 mL をクロストリジア寒天培地に混釈し培地を重層後、35°C で 48 時間嫌気培養を行なった。生育した黒色コロニー数を計測し、検体 1 g あたりの菌数を求めた。混釈培地は各段階希釈液に対して 2 枚作製した。

II. 酸化還元電位幅に関する検討

1. 菌株および培地

本研究では、*Clostridium butylicum* 2 株

(No.15, 8501) を発育試験に供した。いずれも、チオグリコール酸培地を用いて 35°C での嫌気培養に供した。

2. 電気培養装置を用いた発育試験

電気培養装置 (タイテック) を用いた上述菌株の発育試験を行なうため、作用極槽に 2mM メチルピオロゲン (MV) を添加したチオグリコール酸培地 250ml を加え、対極槽には MV を含まない同培地を加え、窒素通気後、定電位電解を行い、培養液電位が設定電位で安定後、定常期の *C. butylicum* (上述) 約 5.0×10^6 cfu を接種し、発育過程における通電効果を評価した。

行なう中で、酸化還元電位を調節する目的で、対数増殖期にある上述の菌株 (約 $1.7-2.5 \times$

10³cfu) を

上記細菌の培養にあつては、+1.2V~+0.3Vの範囲で設定した電位で通電を行い、細胞により還元されたメチルピオロゲン (MV) を電氣的に酸化しながら培養を行なつた。非通電時に比べて、培地中での異なる酸化還元電位の再現を行なう目的で、電気培養装置 (タイテック) を用いた。同装置の培地としては酸化還元電位

C. 研究結果

I. 保存試験 (ポツリヌス菌添加回収試験)

1) 芽胞液未接種群での理化学性状の経時的変化 (表 1)

保存試験開始時における芽胞液未接種群 4 検体の pH は 5.15±0.11 であつた。保存期間 15 日目で pH は 5.5 前後に上昇し 30 日目まで維持された。15 日目、30 日目いずれにおいても、保存温度 (4℃ と 30℃) の間には、有為な差は見られなかつた。保存試験開始時点の 4 検体の酸化還元電位は 32.02±3.56 mV で、保存した期間が長くなるに従い酸化還元電位は上昇傾向にあつた。15 日目、30 日目いずれにおいても、保存温度 (4℃ と 30℃) の間には、有為な差は見られなかつた。

2) 芽胞液未接種群での一般細菌およびクロストリジア属菌の検出状況 (表 1)

保存試験開始時点の芽胞液未接種群 4 検体の一般細菌数は、246±136 cfu/g で、クロストリジア属菌は検出されなかつた。検体間にばらつきがみられるものの、保存した期間が長くなるに連れて一般細菌数は上昇傾向にあつた。一般細菌数が大きく上昇した検体においても、検体の容器包装の密閉状態は保たれており、ガス産生等

外見上の大きな変化はみられなかつた。

3) 芽胞液接種群での一般細菌およびクロストリジア属菌の検出状況 (表 2)

A 型菌および B 型菌芽胞液接種量は、検体 1g あたりそれぞれ 418±213 cfu、1,093±329 cfu であつた。4℃ に保存した検体でのクロストリジア属菌数は、A 型 B 型いずれの菌型接種群においても、保存期間が長くなるにつれ菌量が減少傾向にあつた。25℃ に保存した検体では、15 日目では A 型 B 型いずれの菌型接種群においても菌量は減少傾向にあつた。30 日目では、A 型菌芽胞接種群で 15 日目と同等レベルに維持或は軽微ながらも増加傾向、B 型菌芽胞接種群では継続して減少傾向にあつた。30℃ に保存した検体では、25℃ 同様、15 日目では A 型 B 型いずれの菌型芽胞接種群においても菌量は減少傾向にあつた。30 日目では、A 型菌芽胞接種群では継続して減少傾向にあり、B 型菌芽胞接種群で 15 日目と同等レベルに維持或は軽微ながらも増加傾向にあつた。

保存試験開始時点の一般細菌数は、A 型菌芽胞接種群、B 型菌芽胞接種群でそれぞれ 406±213 cfu/g、396±374 cfu/g で、芽胞未接種群 (表 1) と同等であつた。保存温度により程度の差はあるものの、A 型菌芽胞接種群、B 型菌芽胞接種群いずれにおいても、保存した期間が長くなるに連れて一般細菌数は上昇傾向にあつた。

II. 酸化還元電位の検討

本研究では、電気培養装置を用いて酸化還元電位の安定化をはかり、*C. butylicum* の発育試験を行なつた。結果として、供試菌株は、-200mV ~ +200mV の範囲において良好な発育を認めた (図 1)。

D. 考察

I. 保存試験

平成 25 年度の本分担研究の検討から、常温保存・流通の容器包装詰製品の中に、厚生労働省により当該製品に対して指導通知されている理化学性状 (pH < 4.6) を逸脱している製品が含まれていることが明らかになり、その逸脱していた製品を今年度の検体として入手した。製品のロットは昨年度の検討に用いたものと異なるが、昨年同様、理化学性状 (pH < 4.6) は依然、逸脱している状態で改善は見られなかった。ボツリヌス菌未接種群の保存試験では、保存期間が長くなるに連れて、pH、酸化還元電位の上昇傾向がみられ、容器包装未開封の製品であっても、その理化学性状が安定でない事が示された。未開封の芽胞菌未接種群における一般細菌数は、保存期間が長くなるに連れて増加傾向にあり、この一般細菌数増加は理化学性状の変化に関連している可能性が考えられる。また本製品では、たくあん（大根）本体だけでなく、製品製造時に使用したと考えられる漬け込み液もたくあんと共に容器包装詰されている。検体の包装後加熱処理の有無は表示されておらず不明であり、加熱処理の有無とその条件、漬け込み液の成分と量なども、保存期間中の理化学性状の変化、一般細菌数の変化に影響している可能性が考えられる。

芽胞接種群の保存試験では、A 型菌、B 型菌いずれの菌型においても、保存短期間 (15 日) では菌数の減少がみられたが、その後の検体中の菌数は、温度や菌型によって異なるものの、15 日目時点の菌数を維持或は軽微な上昇傾向が

みられるもののあり、さらに継続した検討が必要と考えられた。また、先にも述べたが、検体の包装後加熱処理の有無は衛生的観点からも重要であるが、さらに、芽胞形成菌にとっては発芽刺激になりうる事から、留意すべき点であると考ええる。本試験では、80°C 20 分間の加熱処理後の芽胞液を用いて行なっているが、栄養体接種での食品内挙動も精査したい。

II. 酸化還元電位の検討

本研究では、広い酸化還元電位幅において、クロストリジウム属菌 (*C. butylicum*) の発育を許容するとの知見を得た。この電位幅は、大気中における食品の多くが含まれると想定されることから、食品中におけるボツリヌス菌の増殖を制御するための理化学指標として、酸化還元電位を用いる意義は必ずしも大きいとは言いがたいといえよう。現行の指導内容に含まれる理化学性状は、pH と水分活性があるが、容器包装詰低酸性食品においては、酸素濃度あるいは酸価といった理化学性状もボツリヌス菌の発芽・発育に関わる影響因子であることから、次年度に向けた課題として検討を視野に入れていきたい。

食品内での菌増殖に伴い、本菌がヒト健康危害の高いボツリヌス神経毒素を産生する事も懸念される。ボツリヌス毒素の定量試験は未だマウスアッセイにより行なわれているが、近年では、PCR-ELISA、イムノクロマト、FRET 等の手法を用いた検出キットの開発も海外では進められている。来年度にはこうしたアッセイ系の有効性評価についても検討を行なうとともに、同毒素定量を通じて、食品内のボツリヌス菌による危害性の動態を精査すべきと考ええる。

E. 結論

本研究では、厚生労働省による指導内容を逸脱した容器包装詰低酸性食品を用い、ボツリヌス菌添加保存試験を行い、菌量の一部保持されていることが確認され、更に長期の保存試験が必要と考えられた。また、酸化還元電位を容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス対策の理化学指標として用いる意義は必ずしも大きくはないと考えられた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

・ Momose Y, Asakura H, Kitamura M, Okada Y, Ueda Y, Hanabara Y, Sakamoto T, Matsumura T, Iwaki M, Kato H, Shibayama K, Igimi S. Food-borne botulism in Japan in March 2012. Int J Infect Dis. 2014 Jul;24:20-2.

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

なし

表 1 芽胞液未接種群での理化学性状とクロストリジア属菌数および一般細菌数

菌型	保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	pH		酸化還元電位		一般細菌数		クロストリジア属菌数			
				pH	mean ±SD	mV	mean ± SD	cfu/g	mean ±SD	cfu/g	mean ± SD		
None	0		9	5.18	5.15 ±0.11	35.2	32.0 ± 7.0	96	246 ± 136	<2	< 2		
			10	5.00		39.4		214		<2			
			11	5.24		30.5		248		<2			
			12	5.20		23.0		425		<2			
	15	4		37	5.66	5.53 ±0.12	54.6	47.6 ± 17.8	457	389 ± 118	<2	< 2	
				38	5.38		58.1		415		<2		
				39	5.50		56.5		215		<2		
				40	5.59		21.0		467		<2		
		30			41	5.48	5.51 ±0.15	51.3	53.1 ± 25.8	31,500	53,181 ± 73,290	<2	< 2
					42	5.74		89.7		162,000		<2	
					43	5.39		40.0		11,400		<2	
					44	5.45		31.2		7,825		<2	
	30	4		69	5.48	5.43 ±0.12	79.6	69.6 ± 9.8	8,805	2,756 ± 4,036	<2	< 2	
				70	5.27		75.1		510		<2		
				71	5.55		65.9		920		<2		
				72	5.42		57.6		790		<2		
		30			73	5.37	5.42 ±0.07	62.6	57.4 ± 11.1	3,550	9,258 ± 4,820	<2	< 2
					74	5.44		67.6		7,080		<2	
					75	5.36		41.9		14,000		<2	
					76	5.52		57.6		12,400		<2	

表 2 芽胞液接種群でのクロストリジア属菌数および一般細菌数

菌型	保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	一般細菌数		クロストリジア属菌数		菌型	保存期間 (日)	温度 (°C)	ID	一般細菌数		クロストリジア属菌数	
				cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD					cfu/g	mean ± SD	cfu/g	mean ± SD
A	0		1	211	406 ± 213	406	418 ± 213	B	0		5	236	396 ± 374	1,413	1,093 ± 329
			2	353		665					876				
			3	350		146					750				
			4	710		453					1,333				
	4	4		13	192	225 ± 59	72		213 ± 102	25	359	235 ± 83	842	686 ± 140	
				14	311		207			711					
				15	215		300			689					
				16	182		273			503					
		15	25		17	1,290	1,660 ± 1,085		171	220 ± 119	29	1,295	1,611 ± 1,137	480	588 ± 328
					18	3,260			75		270				
					19	1,238			315		555				
					20	850			320		1,045				
	30			21	563	719 ± 231	360		290 ± 95	33	563	1,603 ± 1,914	630	509 ± 236	
				22	910		185			610					
				23	480		380			640					
				24	924		235			155					
	30	4		45	795	1,015 ± 726	184		137 ± 91	57	3,750	1,937 ± 2,019	264	239 ± 99	
				46	891		102			232					
				47	332		28			110					
				48	2,040		234			348					
		25			49	1,000	861 ± 109		354	283 ± 146	61	15,100	13,858 ± 9,558	432	322 ± 175
					50	885			230		290				
					51	814			106		87				
					52	745			440		477				
30				53	18,300	28,150 ± 15,882	60	88 ± 27	65	40,500	12,171 ± 19,115	356	612 ± 351		
				54	17,300		118		330						
				55	51,300		72		1,080						
				56	25,700		102		682						