

平成 26 年度厚生労働省科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)

非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究

分担研究報告書

## 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、これに含まれる食品としては、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(pH 4.6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](http://www.rakuten.co.jp) およびアマゾン [www.amazon.co.jp](http://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200 mL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 10 mLをスクリー栓付き試験管(18 mm x 180 mm)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 1,000 mL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 1,000 mL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 (日水) 46.9 gを精製水 1,000 mL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 (日水) 23.5gを精製水 1,000 mL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 10 mL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、ウイ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1g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100gを無菌的に取り、ペプトン加生理食塩水100mLを加え、スト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1mL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1g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1mL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1mL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1g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

*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中で嫌気下で培養した。

### 2) 電気培養装置を用いた発育試験

電気培養装置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)添加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た。窒素通気後、定電位電解を行い、設定電位で安定後、定常期の*C. butylicum*(上述)約 $5 \times 10^6$  cfuを接種し、一定時間ごとに濁度を測定した。なお、上記培養は、-0.6V~+0.6Vの電位設定で通電を行い、上記細菌により還元されたMVを電氣的に酸化しながら培養を行なった。

## C. 研究結果

### I. 保存試験（ボ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  $5.15 \pm 0.11$  であった。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った。保存試験開始時点の 4 検体の酸化還元電位は  $32.02 \pm 3.56$  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った。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った。

#### 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、 $246 \pm 136$  cfu/g で、クロストリジア属菌は検出されなかった。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った。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った。

#### 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 1 g あたりそれぞれ  $418 \pm 213$  cfu、 $1,093 \pm 329$  cfu であった。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った。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った。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った。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った。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った。

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  $406 \pm 213$  cfu/g、 $396 \pm 374$  cfu/g で、芽胞未接種群（表 1）と同等であった。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った。

### 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* の発育試験を行なった。結果として、供試菌株は、 $-200$  mV ～  $+200$  mV 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 年度の本分担任研究の検討から、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もあり、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られる。本試験では、80℃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いえないといえよう。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	1,413	396 ± 374	1,413	1,093 ± 329			
			2	353		665					876								
			3	350		146					750								
			4	710		453					1,333								
	4	13	192	13	192	72	213 ± 102		4	25	359	25	359	842	235 ± 83	842	686 ± 140		
				14	311	207						711							
				15	215	300						689							
				16	182	273						503							
		25	1,290	1,660 ± 1,085	17	1,290	171		220 ± 119	15	25	1,295	29	1,295	480	1,611 ± 1,137	480	588 ± 328	
					18	3,260	75						270						
					19	1,238	315						555						
					20	850	320						1,045						
	30	563	719 ± 231	21	563	360	290 ± 95		15	30	563	33	563	630	1,603 ± 1,914	630	509 ± 236		
				22	910	185						610							
				23	480	380						640							
				24	924	235						155							
	30	4	795	1,015 ± 726	45	795	184		137 ± 91	30	4	3,750	57	3,750	264	1,937 ± 2,019	264	239 ± 99	
					46	891	102						232						
					47	332	28						110						
					48	2,040	234						348						
		25	1,000	861 ± 109	861 ± 109	49	1,000		354	283 ± 146	30	25	15,100	61	15,100	432	13,858 ± 9,558	432	322 ± 175
						50	885		230					290					
						51	814		106					87					
						52	745		440					477					
30		18,300	28,150 ± 15,882	28,150 ± 15,882	53	18,300	60	88 ± 27	30	25	40,500	65	40,500	356	12,171 ± 19,115	356	612 ± 351		
					54	17,300	118					330							
					55	51,300	72					1,080							
					56	25,700	102					682							

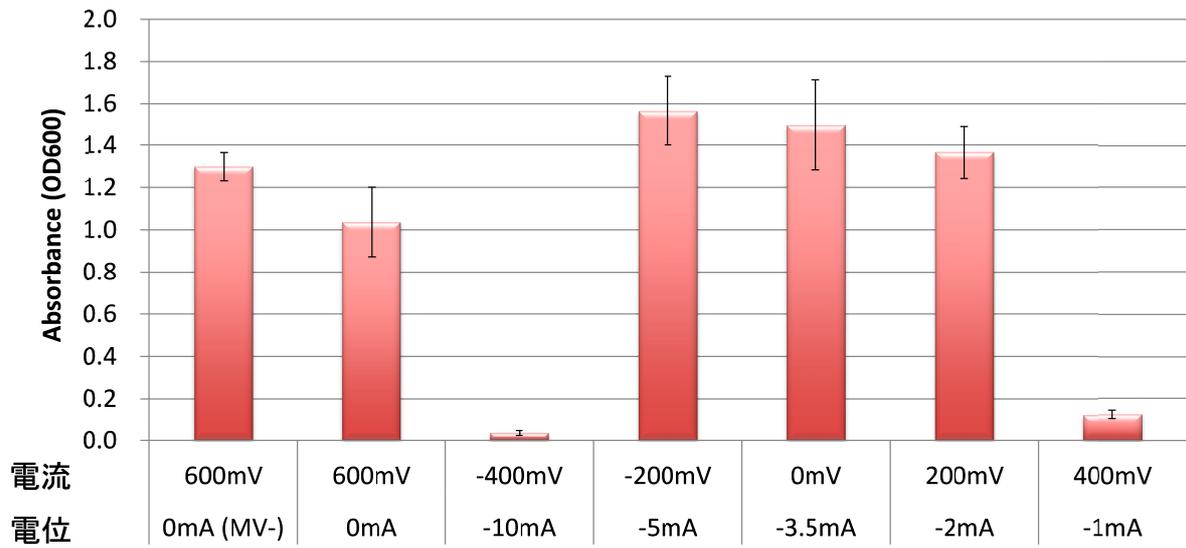


図 1. *C. butylicum* の発育を許容する酸化還元電位幅に関する検討