

平成25 - 27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
分担総合研究報告書

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
研究分担者	百瀬 愛佳	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	
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
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	榎田 和彌	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	

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年にボツリヌス対策に係る指導通知が出されている。しかし、平成22年に行われた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ており、ボツリヌス対策に関する現状調査ならびに食品内での菌動態および菌増殖にかかる理化学性状に関する検討の必要性が明らかとなった。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)に関する調査を行い、「たくあん」製品の一部では、指導内容を逸脱した製造基準で製造されている製品が流通販売されている実態を明らかにした。さらに上記の指導逸脱製品を用いて食品内の菌動態試験を行った結果、ボツリヌス芽胞菌が長期にわたり食品内で維持されうることを明らかにした。また、本菌増殖を許容する酸化還元電位と酸素濃度を検討したが、前者は多様な食品で見られる範囲で増殖が生じ、指導にあたっての理化学性状としては使用し難い状況であることが明らかとなった。また、概ね0.75%以上の酸素濃度下で本菌は良好な発育を示した。これらから、ボツリヌス対策の周知徹底の必要性とともに、食中毒対策強化として菌の増殖にかかる理化学的性状に関する更なる検討、情報収集の必要性が明らかとなった。加えて共鳴エネルギー転移を利用したボツリヌス毒素の*in vitro*定量検出法の有効性評価を行い、精製A型毒素ではマウス毒性試験法と同等の感度を有するが、B型毒素では感度が低く、マウス毒性試験法の代替法としては、更なる改良・検討が必要である事を明らかにした。

背景

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年度厚生労働省科学研究「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)。このように容器包装詰低酸性食品に対してポツリヌス食中毒対策がなされたが、平成 24 年に再び鳥取県内で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ポツリヌス食中毒が発生し、改めて、ポツリヌス対策の周知・指導の徹底および強化の必要性が明らかとなった。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、ポ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ポツリヌス菌もしくは代換となる指標菌の接種試験を行っていた食品が 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なされていない。

検討 1. インターネットを通じた流通情報の収集と指導内容の対応状況

A. 目的

平成 22 年 7～8 月に行われたフォローアップ調査より対策の改善が必要だと考えられていた食品が存在しており、その後さらに 3 年間が経過していることから、容器包装詰低酸性食品における現在のポツリヌス食中毒対応状況を把握することが求められていた。こうした背景から、本分担研究では、まず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。

B. 材料と方法

1. インターネットを通じた食品流通情報収集

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、容器包装詰低酸性食品として流通する製品の検索を行った。検索にあたっては、フォローアップ調査報告に掲載された製品名称「たくあん」「天日干したくあん」を用いることとした。

2. 衛生指標菌定量試験

各検体を 100 g に切り分けたものをストマック

袋に入れ、ペプトン水を 100 mL 加え、1 分間ストマッキング処理をした上清を試料とした。一般細菌数は調整試料原液および同希釈液 100 μ L を標準寒天培地 (Oxid) 2 枚に塗抹し 37℃ 24 時間培養後、検体 1 g あたりの菌数を算出した。大腸菌群 (Coliforms) 数は同様に調製した試料液 100 μ L を VRBL 寒天培地 (Oxid) 2 枚に塗抹し 37℃ 24 時間培養後、赤色を呈する集落を計数し、同じく検体 1 g あたりの菌数を求めた。

C. 結果

1. 国内に流通する容器包装詰低酸性食品に関する情報収集

平成 25 年 7 月 24 日～同月 25 日に、国内大手インターネットサイトを通じて、容器包装詰低酸性食品として購入可能な食品の検索を行った。平成 22 年 7～8 月に食品等事業者団体 (45 団体) を通じて行われた、ポ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集計された食品種を主対象として検索したところ、改善が求められるものとされていた「天日干したくあん」等の「たくあん」製品の一部が依然として、少なくとも表示上では常温で流通・保存されている実態が明らかとなった (表 1-3)。本検索にあたっては、「たくあん」「天日干したくあん」「天日干し&たくあん」「真空パック&たくあん」をキーワードとして用い、楽天では 1523 件、45 件、231 件、16 件の製品が、アマゾンでは 285 件、1 件、13 件、4 件の製品がそれぞれ検索された (表 1)。最終的に、容器包装詰低酸性食品として、常温での流通・保存がとられていた「たくあん」製品は、楽天、アマゾンで、それぞれ 35 件および 10 件に絞り込まれた (表 2, 3)。以上より、容器包装詰低酸性食品の範疇に入る「たくあん」製品の一部は依然として常温で流通・保存している実態が明らかになった。

2. 容器包装詰低酸性食品として流通する「たくあん」製品における衛生指標菌の検出状況と理化学性状の検証

上記の調査結果を受けて、常温での流通もしくは保存がインターネットサイト上で商事されている 9 製品計 30 検体 (図 1) を入手し、当該製品における衛生指標菌の定量検出ならびに理化学性状 (pH、酸化還元電位) を調査した。表 4 のとおり、30 検体における一般細菌数および大腸菌群数の平均値は $1.21 \times 10^3 \pm 3.26 \times 10^3$ cfu/g および $2.27 \times 10^1 \pm 4.65 \times 10^1$ cfu/g であった。検体 No. 1-15 ならびに No. 25-27 の 6 製品については、大腸菌群数が検出された。また、検体 13-15 の 1 製品では一般細菌数が陰性であったが、残りの検体からは、 $2.00 \times 10^2 \pm 1.00 \times 10^1$ cfu/g～ 5.94×10^3 が検出された。理化学性状として、厚生労働省の通知に記載されている pH については、4.6 以下にするよう指導されている。本供試検体における平均 pH 値は 4.37 ± 0.61 であったが、このうち検体 No. 16-24 の 2 製品計 9

検体の pH 値は 5.22~5.26 であった (表 4)。また、酸化還元電位の測定値は、平均値が 115.49 ± 35.93 であったが、指導内容から逸脱する pH を示した検体については、他検体 ($124.13 \pm 0.15 \sim 162.00 \pm 3.12$ mV) と比して、相対的に低い酸化還元電位値を示した ($62.93 \pm 1.07 \sim 65.73 \pm 0.83$ mV) (表 4)。以上より、「たくあん」製品の一部では、理化学性状として、指導内容に逸脱する製品が流通している実態が把握された。

D. 考察

食品のグローバル化が進む昨今、我が国においても輸入食品の増加とその原材料や容器包装に係る多様化に対応する必要性に迫られている。特に、病原微生物の制御に根ざした食品の衛生管理は、食中毒の発生を予防するために必要不可欠な課題であり、継続的な情報収集と実験的検証が求められる。平成 22 年度のフォローアップ調査で対象とされた容器包装詰低酸性食品のうち、特に今後も検討が必要とされた製品の多くは、正月料理用の食材が多々見受けられたため、本研究では一年を通じて国内に流通が認められる「たくあん」製品を対象を選定した。調査の結果、流通・保存に当たり冷蔵表示がないものが依然として流通している実態が把握された。冷蔵表示に関しては、その多くが製造者の表示に基づくものであったが、一部に販売者では、自主的に冷蔵を推奨する表記を販売サイト上に記載している事例も求められた。こうした表示に対する取り組みは、製造者と販売者双方に求めて行くことも、有効な対策を論議する上で必要であろう。冷蔵保存・流通の表示のない製品の中には、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 ($\text{pH} \leq 4.6$) を逸脱する製品も含まれていた。一方、本研究の供試検体が、包装後十分な加熱を経ているか否かについては表示のみからは確認できなかったが、衛生指標細菌として検出された菌数は少数 (一部は非検出) であった。加熱表示についても今後の課題であると考えられる。

E. 結論

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」製品が一年を通して流通す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ことを明らかにした。

検討 2. ボツリヌス菌の食品内動態試験 (ボツリヌス菌添加/保存試験)

A. 目的

厚生労働省の指導内容に逸脱が認められた、常温で流通・保存される製品 (表 4 中の検体 No. 19-24 と同一製品) については、ボツリヌス菌汚染を受けた際、食品内増殖が懸念された。この

結果をふまえ、ボツリヌス A 型および B 型 (芽胞液および栄養型) を用いた添加回収試験を行い、食品内動態を検討した。

B. 試薬および材料

1. 供試検体 (食品)

検討 1 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で定める基準を逸脱 (pH 4.6 超) していた「たくあん」製品 1 種を検体とし、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。加えて、補助的検討に「煮豆」製品 1 種を使用した。

2. 供試菌株

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

3-1) クックドミート培地

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

3-2) 芽胞調製用培地

トリプチケースペプトン (BD BBL) 50 g、ペプトン (BD Bacto) 5 g およびメルカプト酢酸ナトリウム (和光純薬工業) 1 g を精製水 900 mL に溶解、pH を 7.0 に調整後、精製水を加えて 1,000 mL にし、 121°C 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3-3) 卵黄加 CW 寒天培地

カナマイシン不含 CW 寒天培地 (日水) 30 g を 500 mL の精製水に溶解し、 121°C 15 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後 50°C 程度まで冷却したものに、無菌 50% 卵黄溶液 (極東製薬) を 50 mL 加え、平板培地を作成した。

3-4) ブレインハートインフュージョン培地

ブレインハートインフュージョン培地 (BD Bacto) 14.8 g を 20 mL の精製水に溶解し、 121°C 15 分間高圧蒸気滅菌し、20 倍濃縮の BHI broth とした。

3-5) ペプトン加生理食塩水

ペプトン (BD Bacto) 1 g および塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 mL に溶解、pH を 7.0 に調整後、 121°C 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3-6) 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 分間高圧蒸気滅菌し、使用直前まで加温保存した。

3-7) 標準寒天培地

標準寒天培地 (日水) 23.5 g を精製水 1,000 mL に溶解後、 121°C 15 分間高圧蒸気滅菌し、使用直前まで加温保存した。

4) pH メーターおよび酸化還元電位測定

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

C. 方法

1) ボツリヌス菌株の MLST 解析

A 型保存株 (計 49 株) について、10 mL のクックドミート培地中で 1 夜嫌気培養した後、DNeasy kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。MLST プロファイルの作成にあたっては、Clostridium botulinum MLST database (<http://pubmlst.org/cbotulinum/>) に従って、PCR およびシーケンス反応を実施した。同データベース上の登録情報への参照を通じ、菌株の遺伝子型 (Sequence type) を決定した。Minimum spanning tree 作成にあたっては、同データベース上の A 型・B 型株のプロファイルを併用した。

2) ボツリヌス菌芽胞液

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 で一晚培養した。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、ウイルトツ芽胞染色キット (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積培養し、黒色集落数を測定し算出した。

3) 栄養型菌液の調製

-80°C に保存してあるボツリヌス菌芽胞液を解凍後、80°C 20 分間の加熱処理し、その 1 μ L を卵黄加 CW 寒天培地に塗布した。30°C で 24 時間嫌気培養し、発育した集落菌塊を滅菌精製水に懸濁し栄養型菌液とした。作製した栄養型菌液の菌数は、クロストリジア寒天培地を用いて混積培養し、黒色集落数を測定し算出した。

4) 食品検体への菌液添加

4-a) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験

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、検体食品 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4°C、25°C あるいは 30°C に保存した。菌液添加日を保存 0 日目とし、15 日、30 日、100 日、180 日、270 日、360 日目に、各保存温度につき 4 検体ずつ食品内の菌数測定に用いた。陰性対照として芽胞液非添加の検体を、芽胞液添加検体と同様に保存し、食品内菌数の測定および理化学的性状 (pH と酸化還元電位) の測定に供した。ただし、芽胞液非添加の陰性対照群の保存温度は、4°C および 30°C とした。

4-b) ボツリヌス栄養型菌液の「たくあん」製品への添加試験

ボツリヌス栄養型菌液 (A 型菌 5 種混合あるいは B 型菌 5 種混合) を、検体食品 1 g あたり 10^3 cfu 前後となるように添加し、4°C あるいは 30°C で保存し、60 日後に食品内菌数を測定した。ただし、保存期間中に容器包装に膨張等の変化が見られた場合はその時点で保存を終了し、食品内菌数の測定を行うこととした。本試験には、各保存温度につき 2 検体を使用した。陰性対照として滅菌精製水を添加した検体を作成し、栄養型菌液添加群と同様に保存、60 日後に食品内菌数の測定および理化学的性状 (pH と酸化還元電位) の測定に供した。

4-c) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験 2 (栄養素添加試験)

菌の発育に必要な栄養素の補充として 20 倍濃縮 BHI broth を検体食品 1 g あたり 0.25 μ L 添加した。その後、80°C 20 分間の加熱処理した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) を添加し、4°C あるいは 30°C で保存し、30 日後に食品内菌数を測定した。ただし、保存期間中に容器包装に膨張等の変化が見られた場合はその時点で保存を終了し、食品内菌数の測定を行うこととした。本試験には、各保存温度につき 2 から 3 検体を使用した。芽胞液添加の陰性対照として滅菌精製水を添加した検体を作成し、芽胞液添加群と同様に保存、食品内菌数の測定および理化学的性状 (pH と酸化還元電位) の測定に供した。

4-d) ボツリヌス菌芽胞液の「煮豆」製品への添加試験：炭素源および窒素源豊富な食品への菌添加試験 (補助的検討)

炭素源および窒素源が豊富な非動物性食品として黒豆の容器包装詰食品を用い、ボツリヌス菌芽胞液の添加試験を行った。80°C 20 分間の加熱処理した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「煮豆」製品それぞれ 1 検体に食品 1 g あたり 10^3 cfu となるように添加し、30°C で保存し、30 日後に食品内菌数を測定した。ただし、保存期間中に容器包装に膨張等の変化が見られた場合はその時点で保存を終了し、食品内菌数の測定を行うこととした。陰性対照として、芽胞液非添加の 3 検体を、芽胞菌添加検体と同様に 30°C で保存し、食品内菌数の測定および理化学的性状の測定に供した。

上記のボツリヌス菌液および BHI broth の検体への添加には、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。

5) 理化学的性状 (pH および酸化還元電位) の測定

ボツリヌス菌非添加の検体を用い、食品内理化学的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

用電極を食品内部に挿入し、pH および酸化還元電位を測定した。

6) 生菌数 (一般細菌数) の測定

無菌的に取り出した検体 100 g を細切後、滅菌ペプトン加生理食塩水 100 mL を加え、ストマッカーにて十分混和させ、これを試料原液 (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 を標準寒天培地と混釈し平板を作成後、35 °C で 48 時間培養を行ない、生育集落数を計測し、検体 1 g あたりの菌数を求めた。混釈平板は各段階希釈液に対して 2 枚ずつ作製した。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。

7) クロストリジア属菌数の測定

生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と混釈後、培地を重層し平板を作成し、35 °C で 48 時間嫌気培養を行なった。生育した黒色集落数を計測し、検体 1 g あたりのクロストリジア属菌の菌数を求めた。混釈重層平板は各段階希釈液に対して 2 枚ずつ作製した。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。

D. 結果

(a) 供試菌株の選出と遺伝的多様性

食品内動態試験に用いる菌株は、平成 14-16 年度厚生労働科学研究「容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価」の研究報告を参照する事としたが、これを補完する意義として、国立医薬品食品衛生研究所に保存されている A 型菌株間の遺伝的多様性を MLST 法により検討した。結果を表 5 および図 2 に記す(図 2 には、C. botulinum MLST database 上の A 型および B 型株由来プロファイルを併用して作成した minimum spanning tree を示した)。ボツリヌス A 型供試株 (計 49 株) は、計 6 種の遺伝子型に分類された。A/B 毒素方別の MST 解析では、B 型株に比べ、A 型はより多様性に富むことが示唆された (表 5, 図 2)。また、平成 14-16 年度厚生労働科学研究で使用されていた 62A 株、33A 株、36A 株、CB21 株は ST-1 に、Renkon1 株は新規 ST 型に分類された。ST-1 型は、供試株の 71.4% (35 株/49 株) を閉めており、最も主要な遺伝子型の株である事が実証された。これらをふまえて、本食品内動態試験 (添加・保存試験) には、A 型菌株として、62A 株、33A 株、36A 株、CB21 株、Renkon1 株を、B 型菌株としては、上記研究に従い、Okra 株、NH-2 株、67B 株、326-5 株、407-1 株を用いる事とした。

(b) ボツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験

b-1) クロストリジア属菌および一般細菌の食

品内動態 (表 6, 7)

試験開始時の A 型菌および B 型菌芽胞添加量は、クロストリジア属菌として検出される黒色集落数として、検体 1 g あたりそれぞれ 418 ± 213 cfu および $1,093 \pm 329$ cfu であった。検体食品内のクロストリジア属菌の動態は、A 型 B 型いずれの菌型においても保存温度に関係なく、6 ヶ月目まで添加時と同程度の菌数を維持していた (図 3)。その後、減少傾向に転じたが、1 年目においても菌は検出可能であった。6 ヶ月目以降の菌数の減少は、4 °C 保存群より保存温度が高い群 (25 °C および 30 °C 保存群) においてより顕著となる傾向があり、試験終了時点の 1 年目の平均菌数では、4 °C 保存群が最も高くなった。

試験開始時の一般細菌数 (生菌数) は、A 型菌芽胞添加群、B 型菌芽胞添加群、芽胞非添加群でそれぞれ、 406 ± 213 cfu/g、 396 ± 374 cfu/g、 246 ± 136 cfu/g であった。4 °C 保存群では、生菌数は、芽胞菌添加の有無に関わらず 1 年を通して開始時とほぼ同程度の菌数であったが、25 °C および 30 °C 保存群では、検体間で程度に大きな差がみられるものの、初期菌数よりも増加した (図 4)。

b-2) 理化学的性状の経時的変化 (表 7, 図 5)

芽胞菌非添加群を用いて、検体食品の理化学的性状 (pH 値と酸化還元電位) を測定した。保存試験開始時の pH 値は 5.15 ± 0.11 であった。pH 値は保存温度に関係なく 1 年を通して大きな変動なくおおむね pH5 前後から pH5.5 前後の範囲にあり、検体の pH 値は常にボツリヌス菌の生育が可能な条件にあったと考えられた。酸化還元電位は、試験開始時点で 32.02 ± 7.0 mV で、4 °C および 30 °C 条件下ともに、一旦上昇傾向になったがその後下降し、試験終了時の 1 年目では開始時点よりも低い酸化還元電位を示した。一般的に、ボツリヌス菌の生育可能な酸化還元電位は -200 mV 程度であると報告されているが、我々は平成 26 年度の検討結果から -200 mV から +200 mV までの広い範囲でボツリヌス菌が良好に発育することを明らかにしており (後述の検討 3)、酸化還元電位についても、検体はボツリヌス菌の生育が可能な値であったと考えられた。

(c) ボツリヌス栄養型菌液の「たくあん」製品への添加試験

芽胞菌を用いた試験(b)では、検体食品内でボツリヌス菌が長期間維持されているものの、菌の顕著な増殖はみられなかった。そこで、栄養型菌液の添加を行い、「たくあん」製品内でボツリヌス菌の増殖について確認試験を行った (表 8, 9, 10)。

試験開始時の A 型および B 型栄養型菌添加量は、それぞれ 277 ± 41 cfu/g、 419 ± 61 cfu/g であった。60 日の保存期間中、検体の容器包装の膨張等の変化は見られず、60 日後に保存を終了し菌数の

測定を行った。60日後のクロストリジウム属菌数は、A型菌添加4℃保存群で151±45 cfu/g、A型菌添加30℃保存群で71±10 cfu/g、B型菌添加4℃保存群で157±40 cfu/g、B型菌添加30℃保存群で95±21 cfu/gで、いずれの菌型、保存温度においても減少傾向にあり、栄養型菌添加においてもポツリヌス菌の検体食品内での発育・増殖は見られなかった(表8)。生菌数は、芽胞菌を用いた試験(a)の結果と同様に、いずれの群も開始時と同等程度の菌数を維持あるいは若干の増加傾向が見られた(表9)。栄養型菌非添加検体を用いた理化学的性状の測定結果から、これらの検体もpH値および酸化還元電位に関してはポツリヌス菌の発育可能範囲にあったと考えられた(表10)。

(d) ポツリヌス菌芽胞液の「たくあん」製品への添加試験 2 - 栄養素添加

細菌の発育には、培地等に窒素源および炭素源となる栄養素が必要となる。特にポツリヌス菌などクロストリジウム属菌は発育・増殖に高タンパク質および高炭水化物が必要とされ、検査室等で用いられるポツリヌス菌の発育・増殖用培地には、クックドミート培地やGAM寒天培地、CW寒天培地、TPYG培地など、標準寒天培地やLB培地等よりもタンパク質および炭水化物含量が高い培地が通常使用される。今回の検体が「たくあん」製品で窒素源および炭素源が非常に乏しい「だいこん」(参照:表14)が主たる原材料であることから、ポツリヌス菌が発育・増殖しなかった原因の1つとして、窒素源および炭素源の不足が考えられた。そこで「たくあん」検体に、芽胞液とともに、栄養素の補充として20倍濃縮のBHI brothを添加した条件下でポツリヌス菌の動態を検討した。BHI broth非添加A型芽胞液添加群、BHI broth添加A型芽胞液添加群、BHI broth非添加B型芽胞液添加群、BHI broth添加B型芽胞液添加群における試験開始時のクロストリジウム属菌は、それぞれ382±40 cfu/g、512±112 cfu/g、308±3 cfu/g、607±436 cfu/gであった(表11)。30日間の保存期間中、容器包装の膨張等の変化は見られず、30日後に保存を終了し菌数の測定を行った。30日後のクロストリジウム属菌数は、A型B型いずれの菌型、また保存温度においても、保存試験開始時よりも減少傾向にあり、BHI broth添加条件下でもポツリヌス菌の増殖は見られなかった。同じ検体および芽胞菌非添加検体での生菌数は、いずれの群も保存試験開始時より若干の増加傾向が見られ、一部例外もあるものの、BHI brothを添加した30℃保存群にその傾向が強かった(表12)。芽胞菌非添加検体を用いた理化学的性状の測定結果から、これらの検体もpH値および酸化還元電位に関してはポツリヌス菌の発育可能範囲にあった(表13)。

(e) ポツリヌス菌芽胞液の「煮豆」製品への添加試験 - 炭素源・窒素源豊富な食品への菌添加試験(補助的検討)

ポツリヌス菌の増殖に関わる栄養素に関する補助的検討として、炭素源および窒素源が豊富な非動物性食品へのポツリヌス菌芽胞液の添加試験を行った。豆類は一般的に栄養成分としてタンパク質および炭水化物を多く含む非動物性食品であり、豆類のうち大豆は特にタンパク質量が多い。大豆を原料とした「煮豆」製品は、容器包装詰食品として常温流通、販売されている場合も多い現状も鑑み、黒大豆煮豆製品に対してポツリヌス菌芽胞液の添加を行い、30℃で保存した。添加6日目には芽胞液添加検体でガス発生による容器包装の膨張が見られたため、7日目に保存を中止し、芽胞液添加検体ならびに陰性対照の芽胞液非添加検体の食品内菌数の測定を行った(図6)。芽胞液非添加の3検体のpH値は6.81±0.1、酸化還元電位は-245.2±3.7 mVで、一般細菌およびクロストリジウム属菌はいずれも検出しなかった。容器包装に膨張が見られた芽胞菌添加検体のクロストリジウム属菌数は、A型およびB型芽胞液添加検体それぞれ、 5.6×10^6 cfu/g および 2.3×10^6 cfu/gで、食品内でポツリヌス菌が顕著に増加していた。一方、生菌数は非検出であった。

E. 考察

平成20年に通知された指導内容を逸脱していた「たくあん」製品を用いて菌の添加/長期保存試験を行った。本試験では、計72個の「たくあん」製品を菌非添加検体として用いたが、いずれからもクロストリジウム属菌は検出されず、ポツリヌス菌の原材料への汚染はなかったと考えられた。しかし、食品内のポツリヌス菌動態の検討結果から、原材料がポツリヌス菌芽胞に汚染された場合、長期にわたりポツリヌス菌芽胞数が初期濃度で維持される可能性が示唆された。ポツリヌス菌の場合、乳児等の一部のグループを除き、菌が増殖し毒素を産生する状況でない限りヒトへの健康危害はないと考えられるが、芽胞菌数が減少せず食品内で長期維持されることは留意すべき点であると考えられる。本試験では、「たくあん」検体のpH値および酸化還元電位がポツリヌス菌の発育が可能な条件下にあったにもかかわらず、添加したA型およびB型ポツリヌス菌(芽胞および栄養体)は食品内で増殖しなかった。その理由として発育に必要な窒素源および炭素源の不足を考え、BHI broth存在下でのポツリヌス菌の添加試験も行ったが、同様に食品内での増殖は見られなかった。しかしながら、炭素源および窒素源が豊富な「煮豆」製品を用いた検討では、短期間でガス発生を伴うポツリヌス菌の顕著な増加が確認された。BHI brothを添加した「たくあん」製品においてポツリヌス菌の発育がみられなかったのは、(1) BHI brothの添加量が不十分であった(2) BHI brothは糖含量があまり高くないことから、炭素源が不足状態であった、などの可能性に加え、BHI broth添加群で生菌数の増殖がよ

い傾向にあったことから (3) 検体内に存在する一般細菌等により添加した栄養素が消費され、ポツリヌス菌の発育より先に一般細菌の発育が促進してしまった可能性なども考えられた。検体内に存在する一般細菌に関しては、ポツリヌス菌の増殖が顕著であった「煮豆」製品では、生菌数は検出されず、共存菌はなかったと考えられる。「煮豆」製品に関しては、ポツリヌス菌が容易に増殖する事は既に報告され、平成 20 年の厚生労働省の指導通達後、ポツリヌス対策として「120℃ 4 分間の加熱と同等以上の効力を有する方法での加熱殺菌を行っている」と平成 22 年のフォローアップ調査で回答している。今回、用いた「煮豆」製品から生菌数が検出されなかった理由としては、120℃ 4 分間の加熱と同等以上であったかどうかは本試験だけでは判定できないが、少なくとも一般細菌が死滅する程度の加熱殺菌は実施されていた結果と考えられた。これらから、ポツリヌス菌の食品内増殖については、競合する他菌の有無の影響や食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集、更なる検討が必要と考えられた。平成 20 年に通達されたポツリヌス対策では、背景でも述べたように、①当該食品中のポツリヌス菌を除去する、②ポツリヌス菌の増殖を防止する、または③ポ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ており、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。[2] 冷蔵 (10℃ 以下) 条件で流通保存することとし、容器包装にその旨を明記する。[3] pH を 4.6 以下に調整し、菌の増殖およびポツリヌス毒素の産生を防止する。[4] 水分活性を 0.94 以下にし、菌の増殖およびポツリヌス毒素の産生を防止する。などがあり、これらの措置は容器包装詰低酸性食品を取り扱う業界団体の責任において講じる事となっている。上記のうち[2]以外は、当該製品の外観からではどの措置がなされているのか判別できない。対策未実施製品があった場合は、本研究のように「市場品を用いた調査/検討の実施」、あるいは事故発生により違反が判明する状態である。市場に出回っている「煮豆」製品の中には、加熱処理済みである旨を記載しているものも見受けられた (図 7) ことから、当該食品を扱う業界団体には指導内容の遵守に加え、自主的に対策内容の表記を行う団体/企業が増える事を期待したい。

F. 結論

平成 20 年に通知された指導内容を逸脱した「たくあん」製品にポツリヌス芽胞菌を添加・長期保存し、経時的に食品内の菌数 (クロストリジウム属菌及び生菌数) と理化学性状値を測定し、食品内動態を検討した。用いた「たくあん」製品は、保管温度に関わらず 1 年間の保管期間を通して食品内 pH および酸化還元電位はポツリヌ

ス菌の発育可能範囲であった。A 型・B 型芽胞菌の添加後、6 ヶ月目迄は添加時と同等の菌数が食品内に維持され、その後減少傾向が見られたが 1 年後においても菌は検出可能であった。さらに、「たくあん」製品に対しポツリヌス菌 (栄養体) 添加/保存試験を行いポツリヌス菌の食品内動態を検討したが、ポツリヌス菌の発育は認められなかった。「たくあん」製品とは異なり、菌の発育に必要な窒素源・炭素源が豊富な「煮豆」製品にポツリヌス菌芽胞を添加し 30℃ で保存したところ、1 週間で容器の膨張が見られ、ガス産生を伴ったポツリヌス菌の顕著な増加が確認された。以上の成績より、ポツリヌス菌の食品内増殖については、食品の炭素源・窒素源に関する情報の収集が必要と考えられた。

検討 3. ポツリヌス菌の増殖にかかる理化学的性状に関する検討

A. 目的

容器包装詰低酸性食品におけるポツリヌス対策として、ポツリヌス菌の増殖にかかる理化学性状として、pH や水分活性値の基準値が示されている。本項目では、本菌の増殖に影響を示すその他の理化学性状として酸化還元電位ならびに酸素濃度が指標となるか検討を行った。

B. 材料および方法

1. 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 5×10^6 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 を電気的に酸化しながら培養を行なった。

2. 酸素濃度に関する検討

クックドミートブイオンを用いて、37℃ で嫌気培養したポツリヌス菌約 10^3 cfu をクックドミートブイオン 10mL に接種し、BIONIX 低酸素培養キット (スギヤマゲン) を用いて、酸素濃度を 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.0, 4.0% に調整した上で、37℃ 下にて最大 1 週間まで培養を継続した。増殖確認は、クロストリジウム寒天培地への混釈培養により行った。

C. 結果

1. 酸化還元電位幅に関する検討

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 ~ +200mV の範囲において良好な発育を認めた (図 8)。

2. 酸素濃度に関する検討

計 9 供試株では、酸素濃度 0.75%以下で培養 1 日以内に良好な増殖を示し、うち 407 - 1 を除く 8 株は 1.00%でも同 4 日以内に増殖を呈した (表 14)。一方、CB21 株については、0.50%以下での増殖を示すにとどまった。また、生存菌の存在は、より高い酸素濃度下においても、ヒートショック後には確認された。

D. 考察

ボツリヌス菌の増殖を許容する酸素濃度条件については、概ね 0.75%以下であることが示された。真空包装食品におけるボツリヌス菌の発育ならびに毒素産生に関する点では、Kasai らが包装米飯において 5%以下の酸素濃度で発育・毒素産生リスクがあると報告している。本研究では、食品マトリックスを用いた検討は行っていない他、実際の食品にあっては、他菌による酸素濃度への影響あるいは食品マトリックスに含まれる栄養組成がボツリヌス菌の栄養要求性を満たすかどうかといった点も考慮する必要があると考えられる。本研究により得られた結果からは、少なくとも 1%以下の酸素濃度を有する食品に対しては、ボツリヌス菌の増殖リスクがあると想定され、一定濃度以上の酸素を均一に含む食品製造が本菌汚染リスクの低減には有効と思われた。

E. 結論

酸化還元電位はボツリヌス菌の増殖指標とは成り難いことが示された。また、酸素濃度は一定の目安としては使用可能と思われ、様々な容器包装詰低酸性食品における実態調査が必要と考えられた。

検討 4. ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出法の探索 (マウス毒性試験法との比較検討)

A. 目的

食品内でボツリヌス菌が増殖した場合、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毒性試験法により行なわれているが、近年では、PCR-ELISA、イムノクロマト、共鳴エネルギー転移 (FRET) 等の手法を用いた in vitro 系での検出法の開発も海外では進められている。本研究では、共鳴エネルギー転移を利用したボツリヌス毒素の in vitro 定量検出法とマウス毒性試験法との比較検討し、検出法の有効性評価を行った。

B. 材料

1. 試薬および動物

1) 精製ボツリヌス毒素

精製ボツリヌス毒素として、当該施設所有のボツリヌス A 型毒素およびボツリヌス B 型毒素 (和光純薬工業, 現在は取り扱いなし) を用いた。

2) ゼラチン加リン酸緩衝液

第二リン酸ナトリウム・12 水和物 4 g とゼラチン (BD Difco) 2 g を精製水 900 mL に溶解、pH を塩酸溶液で 6.2 に調整後、精製水を加えて 1,000 mL にし、121 °C 15 分間高圧蒸気滅菌した。

3) 10% トリプシン溶液

生理食塩水中に 10%となるようにトリプシン 1:250 (ナカライテスク) を添加し、泡立てないように溶解させた。

4) マウス

マウス毒性試験法でのボツリヌス毒素の検出には、ICR 系マウス (Jcl:ICR, 日本クレア, 雌, 体重約 20 g) を用いた。

5) ボツリヌス毒素の in vitro 定量的検出用試薬

ボツリヌス毒素の in vitro 検出用試薬として BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit および BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit (BioSentinel 社, 米国) を用いた。黒色平底 96 穴プレートは Greiner-Bio One 製を用いた。必要に応じ、Matrix A Botulinum Neurotoxin Immunoprecipitation Kit あるいは Matrix F Botulinum Neurotoxin Immunoprecipitation Kit (BioSentinel 社) も使用した。

C. 方法

1) マウス毒性試験法 (毒素の in vivo 検出法)

精製ボツリヌス A 型毒素および B 型毒素は、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。菌培養液の場合は、クックドミート培地での菌培養液を 3,000 rpm 20 分間遠心し、その遠心上清を 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過し、ゼラチン加リン酸緩衝液で段階希釈した。希釈した各試料液を 0.5 mL ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種し 4 日間観察した。陰性対照として、試料液を 100 °C 20 分間加熱処理することで毒素の不活化したものを作製し、同様に 0.5 mL ずつ 2 匹のマウス腹腔内に接種し 4 日間観察した。

2) 毒素の in vitro 定量検出法

精製ボツリヌス A 型毒素および B 型毒素は、滅菌リン酸緩衝液で段階希釈した。A 型毒素には BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit を、B 型毒素には BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用い、各 Kit のマニュアルに従い操作した。陰性対照には、滅菌リン酸緩衝液のみおよび加熱処理によって不活化をした毒素を用いた。切断前の基質は 434 nm の励起光下で 526 nm の最大蛍光波長を、毒素活性により切断された基質は 470 nm の最大蛍光波長を有しているため、35 °C 24 時間反応後、434 nm の励起光下で 470 nm 及び 526 nm の蛍光強度を測定した。毒素活性は 470 nm と 526 nm の蛍光強度比 (RFU at 526 nm / RFU at 470 nm) から算出し、毒素の検出は毒素活性値に基づき行った。B 型毒素に関しては必要に応じて

事前にトリプシンによる活性化を行った。

3) トリプシン処理

毒素溶液に 1/10 容量の 10%トリプシン溶液を加え、時々振盪させながら 37℃ 1 時間反応させた。

D. 結果

蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した迅速・高感度のボツリヌス毒素 *in vitro* 検出法「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」が米国 BioSentinel 社によって開発されている。本試験では、この「BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit」と現在の国際的な標準法であるマウス毒性試験法 (*in vivo* 法) を用い、検出感度の比較検討を行った。

精製ボツリヌス A 型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は 6-10 pM であった。一方、BioSentinel 社の A 型毒素用キット (BoTest™ A/E Botulinum Neurotoxin Detection Kit) を用いた試験では、陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 pM であった (図 10)。また精製ボツリヌス B 型毒素を用いた場合、マウス毒性試験法での検出最低濃度は 30-100 pM であったのに対し、B 型毒素用キット (BoTest™ B/D/F/G Botulinum Neurotoxin Detection Kit) で陰性対照と有意差があった最低濃度は 10 nM であった (図 10)。

E. 考察

ボツリヌス毒素の検出法・定量法としては、体重 20 g 前後のアルビノマウス (ddY 系あるいは ICR 系) を用いたマウス毒性試験法がゴールドスタンダード法として位置づけられており、日本においてもマウス毒性試験法が公定法に採用されている。マウス毒性試験法は検出感度が高く、この方法で測定された LD50 値を 1 U とし、ボツリヌス毒素量表記の基準となっている。しかしながらマウス毒性試験法は動物実験であることから、施設、動物倫理などの多くの面から制約があり、食品の安全性を試験する方法としてこのマウス毒性試験法が一般検査機関で実行できる状態にないのが現状である。このような背景から、マウス毒性試験法の代替法となる、動物を使用せず、かつ、通常の検査施設で実施可能な高感度なボツリヌス毒素の定量的検出法が必要とされている。これまでに、毒素タンパク質に対する抗原抗体反応を検出原理とした ELISA 法やその改良法 PCR-ELISA 等の *in vitro* ボツリヌス毒素の検出法が開発されているが、現時点では、検出感度の点でマウス毒性試験法に勝る方法はない。また毒素遺伝子の検出を原理とした PCR 法も開発されているが、試料に混在する食品成分による PCR 反応阻害などの問題点に加え、毒素遺伝子の存在と毒素産生が一致しない場合もあり、PCR 法などの毒素遺伝子検出法は補能助的な使用に留まっている。近年、米国 BioSentinel 社によって開発され

た蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したボツリヌス毒素検出法は、毒素の作用本体であるエンドペプチダーゼ活性を検出原理としており、毒素の基質の一部に 2 種の蛍光色素を標識したものをを用いる。検出原理がマウス毒性試験法と同じであることから、他法と比してマウス毒性試験法とのよい相関性が期待できるのではないかと考え、この蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用したボツリヌス毒素の *in vitro* 定量的検出法とマウス毒性試験法の感度の比較検討を行った。精製ボツリヌス A 型毒素を用いた場合、検出感度は両試験法で同等程度であり、マウス毒性試験法の代替法としての可能性を期待させる結果であったが、B 型毒素を用いた場合は大きな差がみられた。予備実験的に、菌培養上清を用いた検討やトリプシンによる B 型毒素活性化処理、同社の Immunoprecipitation Kit を用いた精製/濃縮操作等も行ったが、現在の時点では感度の相違は改善できなかった。検査試料の前処理等についてのさらなる検討が必要と感じられた。

F. 結論

ボツリヌス毒素の *in vitro* 定量法探索としては、共鳴エネルギー転移を利用した BioSentinel 社製 (米国) の BoTest™ Botulinum Neurotoxin Detection Kit を用い、マウス毒性試験法との感度の比較検討した。A 型毒素についてはマウス毒性試験法と同等の高い検出感度を示したが、B 型毒素の検出感度は、マウス毒性試験法に比べて低く、今後も継続した改良と検討が必要と考えられた。

G. 健康危害情報

なし

H. 研究発表

1) 論文発表

(1) 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

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

