

分担研究報告書

研究課題：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
不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品への芽胞接種保存実験

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不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品2種類におけるボツリヌス菌芽胞の増殖性と毒素産生性を調べた。試供した2種の食品（つぶのやわらか煮、たたきごぼう）にA、B型菌芽胞の混合液を接種し再密封後30℃で保存し、毒素産生の有無を調べた。水分活性は幾分低い

Hが中性域にある「つぶのやわらか煮」では、培養5日目で毒素産生が認められた。「たたきごぼう」は培養94日目で容器の膨化が確認され、毒素産生が認められた。この製品では

Hが低いことが一つの要因として、毒素産生の確認まで長期間培養が必要であったと考えられる。これらの結果は、ボツリヌス菌中毒の予防対策として気密性を有する包装食品に対しては求められている基準（

Hが4.6以下、水分活性が0.94以下）を越えるものは、製造過程中にボツリヌス菌芽胞により汚染を受けた場合には中毒を起こすのに充分量の毒素を産生することを示している。

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従来は考えられていた。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、これら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。最近、わが国ではこれまでほとんど分離されていないA型、B型菌による食中毒事件が発生し、国際的な広範囲

にわたる大量の物流に対応した対策が望まれている。食中毒の原因食品として疑われた密閉された容器包装詰食品は、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。現在、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加圧加熱食品が常温で流通している。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。今回はボツリヌス菌の増殖可能な条件を兼ね備えている pH 4.6 以上の低酸性の容器包装詰食品を対象としてボツリヌス菌芽胞の接種実験により、菌の増殖と毒素産生性の評価を行った。

B. 研究方法

1. 供試試料

製造者より購入した容器包装詰食品 2 種（つぶのやわらか煮、たたきごぼう）にボツリヌス菌芽胞（A、B 型菌の混合液）を接種した。これら一連の作業は缶詰協会研究所（横浜）で実施し、翌日から 30℃ の保存試験を開始した。

2. 芽胞接種実験

2-1. 使用菌株

Clostridium botulinum A 型菌 4 株；62A(ATCC7948)、62A(NFPA)、90A、BIG4、および B 型菌 1 株(213B)を用いた。

2-2. 培地

クロストリジウム属の菌数測定には市販のクロストリジア培地（ニッスイ）を使用し、滅菌パウチを用いて嫌気培養を行った。一般細菌は標準寒天培地（ニッスイ）を用いて好気培養を行った。

2-3. 芽胞懸濁液の調製

本研究班の分担研究者が所属する北海道衛生研究所で作製した。供試菌株の芽胞液 0.5 ml に滅菌ペプトン水（0.1%）4.5 ml を加え、80℃ 20 分間加熱処理した。さらにペプトン

水で 10 倍段階希釈を行い、これら 1 ml をそれぞれ 2 枚の滅菌パウチにし、55℃ に保温しておいたクロストリジア培地 10 ml を加え、よく混和した。パウチは口をシールした後、30℃ 7 日間培養後発育した黒色集落を算出し、芽胞数とした。各供試菌株の芽胞数が約 $2\sim 3 \times 10^7$ CFU/ml 煮成るように希釈し、これらの希釈液を等量混合し、接種用芽胞液とした。

2-4. 芽胞の接種方法

1 品目につき 14 袋の外側をアルコールで消毒し、シール部分を切断し接種用芽胞液を 20 μ l を 8 袋に添加し、シーラーで封印した。非接種群として残り 6 袋はそのままシールした。これらの検体全てを、低温滅菌器を用いて中心温度が 80℃ で 20 分保持されるように処理した。

2-5. 菌数測定

食品の全量を無菌的にストマッカー用ポリエチレン袋（S タイプ）にとり、等量の滅菌脱イオン水を加えて、ストマッカーで混和したものを原液とした。

3. 毒素の検出

3-1. 定性試験

試料原液は試験に供するまで -20℃ で保存した。解凍後、3,000 rpm、4℃ 10 分間遠心し、その上清を 0.5 ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種し、生死の有無 4 日間観察した。

3-2. 中和試験

マウスがボツリヌス特有の症状を呈した検体について、適宜ゼラチン含有リン酸緩衝液（pH 6.2）で毒素

量が 10^4 LD₅₀/ml 程度になるように 10 倍段階希釈を行い、10 国際単位/ml の A 型および B 型抗毒素単独あるいは混合液と等量混和し、マウス腹腔内注射を行い産生された毒素型の確認を調べた。

4. その他

検体の pH は pH メーター Horiba F22 を用いて測定した。

C. 研究結果

1. 供試食品の理化学的、微生物学的性状

対象とした 2 品目の食品の pH および Aw は、「つぶのやわらか煮」では pH 7.1~7.3、Aw は 0.96 で、「たたきごぼう」では pH 5.6、Aw は 0.98 以上であった。芽胞接種後、加熱処理した食品には、一般生菌は検出されなかった。芽胞接種した検体には、「つぶのやわらか煮」においては $3.9 \sim 4.4 \times 10^6$ CFU/g、「たたきごぼう」では $8.8 \sim 13 \times 10^3$ CFU/g のクロストリジアが検出された。陰性対照として用いた食品からはクロストリジアは検出されなかった (表 1)。

2. 保存試験

2-1. 「つぶのやわらか煮」の結果

この食品は比較的 pH が高いが一般生菌およびクロストリジアは混入していなかった。培養 5 日目には検体全てが膨張し、接種したボツリヌス菌と推定される菌数は $2.0 \sim 5.2 \times 10^7$ CFU/g に達した。これらの検体から毒素が検出され、3 検体から A 型および B 型毒素が、残りの 2 検体から A 型あるいは B 型毒素が単

独で検出された。同時に測定した pH は若干低下し、6.9 の値を示した。

2-2. 「たたきごぼう」の結果

この食品は Aw とは対照的に低い pH を示した。陰性対照として用いた検体は培養 90 日目でも一般生菌およびクロストリジアは陰性であった。培養 94 日目で 3 検体の袋に膨張が認められた。これらの検体の pH は上昇しており pH 6.2~6.3 であった。膨化が認められなかった 2 検体の pH は 5.3 あるいは 5.4 であった。膨張が認められた検体中のクロストリジアは $4.1 \sim 8.0 \times 10^7$ CFU/g で、2 検体から A 型および B 型毒素が、残り 1 検体から A 型毒素が検出された。非膨張の 2 検体ではクロストリジアの菌数 (1.5×10^4 、 1.7×10^4 CFU/g) には変化がなかった (表 2)。

D. 考察

研究対象とした不活化ガス充填加圧加熱殺菌調理食品は、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°C 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、上述した不活化ガス充填加圧加熱殺菌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菌中毒のリスク評価を必要とした理由である。

ボツリヌス菌のリスク評価を行うために様々な接種実験が行われているが、通常対象とする食品 1 g に対して芽胞数が 1,000 CFU 程度が望ましいとされている。今回、これより多い芽胞数を接種実験に用いて対象食品のリスク評価を行った。接種した食品 2 品目の中で pH が中性に近い「つぶのやわらか煮」では保存開始 5 日目で極めて早い時期に毒素が検出された。この状況下の検体は臭い、外観は通常とは変わりがなく、食品の異常に気づかずに喫食する可能性がある。他方、「たたきごぼう」については、初めの pH が酸性域にあること、食品に含まれる栄養素が乏しいと考えられるため、毒素検出までの日数が長期に渡った。培養後 90 日以上を経て、5 検体中 3 検体に毒素の検出、菌の増殖が認められたが、これら陽性検体は開封時にボツリヌス菌特有の有機酸を排出した。「ごぼう」自体の組織も非常に脆弱で少しの力で崩れた。これらの結果は、ボツリヌス中毒へ対策として気密性を有する包装食品に対して求められている基準を越えるものについては、芽胞による汚染を受けた場合には極めて危険であることを示し

ている。一方、毒素が未検出の検体においては菌の増殖、毒素産生が認められなかったことは、製品に含まれる食材によっては pH 4.6 以上でも菌にとって不適當な条件があることを示し、このことが多様な食材により多数の製品が産み出されている状況下で、ボツリヌス菌に対するリスク評価を行うことの困難さを示している。

今回実施した接種実験の結果は、対象とする製品の安全性に関する情報を得るための最も確実な手段と考えられる。しかし、実際には個々の製品に対して同様な方法を適用することは実用的ではないことから、原材料あるいは市販製品におけるボツリヌス菌の汚染実態の調査など別の側面からの情報を得ることが必要であると思われる。

表1 「つぶのやわらか煮」に対する芽胞接種実験

検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Clf (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	21 22 23	理化学試験	0日	/	7.3 7.2 7.1	0.96 0.96 0.96	/	/	/	
A	無処理	3	15 16 17	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0日	/	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	ND ND ND	
B	無処理	3	18 19 20	保存試験 (未開封)	90日	無 無 無	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	ND ND ND	
C	開封芽胞非接種	3	9 10 11	細菌試験 (開封操作確認)	0日	/	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	/	
D	開封芽胞非接種	3	12 13 14	保存試験 (開封)	90日	無 無 無	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	/	
E	開封芽胞接種	3	6 7 8	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	/	/	/	10未満 10未満 10未満	3.9×10^4 4.4×10^4 4.1×10^4	/	
F	開封芽胞接種	5	1 2 3 4 5	細菌・毒素試験	5日 5日 5日 5日 5日	有 有 有 有 有	6.9 6.9 6.9 6.9 6.9	/	10未満 10未満 10未満 10未満 10未満	4.2×10^7 2.5×10^7 2.2×10^7 2.0×10^7 5.2×10^7	B A+B A A+B A+B	NOT TESTED

表2 「たたきごぼう」に対する芽胞接種実験

検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Clf (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	21 22 23	理化学試験	0日	/	5.6 5.6 5.6	0.98以上 0.98以上 0.98以上	/	/	/	
A	無処理	3	15 16 17	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0日	/	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	ND ND ND	
B	無処理	3	18 19 20	保存試験 (未開封)	90日	無 無 無	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	ND ND ND	
C	開封芽胞非接種	3	9 10 11	細菌試験 (開封操作確認)	0日	/	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	/	
D	開封芽胞非接種	3	12 13 14	保存試験 (開封)	90日	無 無 無	/	/	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	/	
E	開封芽胞接種	3	6 7 8	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	/	/	/	10未満 10未満 10未満	8.8×10^3 1.3×10^4 1.2×10^4	/	
F	開封芽胞接種	5	1 2 3 4 5	細菌・毒素試験	94日 94日 94日 94日 94日	有 有 無 無 有	6.2 6.2 5.4 5.3 6.3	/	10未満 10未満 10未満 10未満 10未満	8.0×10^7 4.1×10^7 1.7×10^4 1.5×10^4 5.9×10^7	A + B A ND ND A + B	NOT TESTED

ND:未検出

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
分担研究報告書

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対する
リスク評価のあり方に関する研究

分担研究者：春日文子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第三室長

研究要旨：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アセスメント手法として適切なあり方を提言するために、微生物学的リスクアセスメントの方法やタイプを検討した。その結果、現在利用可能なデータからは、半定量的なリスクランキングが適当であろうと結論された。

A. 研究目的

食品の微生物学的リスクに対する評価法は、国際的にもまだ歴史が浅く、具体的なガイドラインの作成作業も現在レビューの段階である。しかし、リスクアセスメントの目的や利用可能なデータの質や量に応じて、適切なタイプを選択することが望ましいとされている。

本研究では、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アセスメント手法として適切なあり方を検討することを目的とした。

B. 研究方法

諸外国ならびに国際機関によって行われた微生物学的リスクアセスメントを参考に、リスクアセスメントのタイプを比較検討した。

C. 研究結果

1. リスクアセスメントの必要性の判断

微生物学的リスクアセスメントがリスクマネジメントにとって必要とされる場合、有効に利用される場合は、以下のいずれかであると整理されている(1)。すなわち、

- ・衛生規範やガイダンスを作成する場合...MRA はどこをコントロールすれば最も効果的であるかを見つける助けとなる。
- ・定量的基準値を設定する場合...MRA は疾病発症と菌数に関する定量的な情報を提供する
- ・別個の食品衛生管理システムの同等性を評価する場合
- ・扱う問題(食品の種類も含め)や対策を科学的に優先順位付けすることにより幅広い食品衛生施策に対して改善を図ることができる
- ・生産から消費までのフードチェーンにおいてリスク軽減化施策を行うポイントを見つける必要がある場合
- ・研究やデータ収集の必要な部分を認識し強調する場合

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス

ス汚染に関する問題は、上記第 1 項あるいは第 2 項に相当すると考えられる。

2. リスクアセスメントのタイプ

微生物学的リスクアセスメントのタイプは、定性的、半定量的、あるいは定量的(決定論的および確率論的)なものに分類できる(2)。

班会議において提供されたデータおよびその他文献等から利用可能なデータ、さらに厚生労働省側の規制導入に関する判断根拠の必要性から、ボツリヌスに対しては半定量的なリスクアセスメントが可能であり、適当であると判断された。

具体的な内容の考え方については、表 1 に提示する。

さらに、リスクアセスメントの基本的構成要素を満たすことは最低条件である。それに沿って書く項目の案を表 2 にまとめた。

結果の示し方は、アメリカ FDA によって行われた *Listeria monocytogenes* リスクアセスメント(3)を参考に、対象食品群毎のリスクを比較検討する形(図 3 参照)が可能かと考えられた。

E. 結論

ボツリヌス毒素は、食品中に存在することが許されないものであるため、そのリスクアセスメントは半定量的に行なわれ、対象食品の危険度ランキングを目的に行なわれるべきであると考えられた。

D. 考察

ボツリヌスを対象としたリスクアセスメントは、国際的にもまだ本格

的に行われてはおらず、直接参照できる文献もない。そこで、アプローチの仕方から検討する必要があった。行政側から規制導入に関する判断根拠を早急に提示してほしいとの要請があったため、できるだけ、既存の情報からリスクアセスメントを行う必要があると考えられた。そこで、不確実性や変動は無視せざるをえないものの、迅速性と平易性を考えて、リスクランキングが適切であると判断した。

【参考文献】

1. Report: Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Kiel, Germany 18 - 22 March 2002 (http://www.who.int/fsf/Micro/Report_Kiel2002.pdf)
2. 春日文字：食品汚染病原微生物のリスクアセスメント。モダンメディア、47 (5)、1-9 (2001)
3. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods (<http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>)

表 1

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アセスメントの、目的と範囲、概要の考え方

目的と範囲は？

-対象食品をどこまでとし、何を結果として求めるか

-例えば、各食品群毎の潜在的なリスクの大きさを比較する、新たな製造規範や規格基準を提案するなど

必要なデータは？

-すでにあるものの収集、分析

-添加実験による菌、毒素の推移

モデリング（解析の流れの構築、数学的処理）

どういうタイプのリスクアセスメントが可能であるか？

表 2

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アセスメントの項目概要

Hazard Identification:

不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品を含む容器包装詰低酸性食品の物理化学的性状の評価と、市販品の抜き取り微生物検査における食用不適格食品の検出頻度から、危険が予測される食品（群）のリストアップを行う。

Exposure Assessment:

芽胞添加試験を不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品以外の容器包装詰低酸性食品（特に各地の特産品に着目する）に拡大し、各食品の製造流通実態調査、初年度の研究結果を含む芽胞添加試験によるボツリヌス菌の増殖ならびに毒素産生データから、消費時点における毒素産生の確率を推定する。

Hazard Characterization:

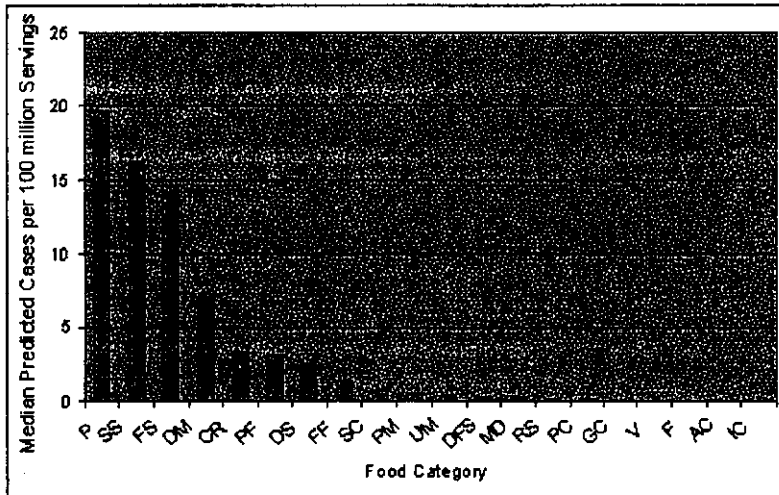
毒素量と発症確率に関する解析は、本菌について本研究班の任務としては不要と考えるので、省略する。

Risk Characterization:

Hazard Identification、Exposure Assessment との総合によるリスクランキングを行う。また、Exposure Assessment の解析過程からリスク軽減の可能性を検討し、コントロールすべきポイントや規格基準設定の提言を行う。

図1 USFDAによる *Listeria monocytogenes* のリスクアセスメントの結果の一部
(<http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>から引用)

Predicted Relative Risks Associated with Food Categories for the Total Population based on the Median Predicted Cases of Listeriosis per 100 million Servings



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

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関する研究

分担研究者 武士 甲一 北海道立衛生研究所微生物部主任研究員

研究要旨

不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（容器包装詰低酸性食品）を対象にボツリヌス菌芽胞の添加試験を行った。供試 5 製品のうち、馬刺くん製、帆立時雨煮、酢豚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発芽・増殖と毒素産生は確認されなかった。

馬刺くん製においては、製品を培養せずにそのままを検査した 3 検体中の 1 検体からボツリヌス菌が 30 cfu/g 検出され、また、製品を開封後、芽胞を接種せずにシールし、その後、80℃で 20 分間加熱処理して 30℃で 28 日間培養した 3 検体中の 1 検体から枯草菌とボツリヌス菌が検出された。帆立時雨煮においては、同様に保存試験を行った 3 検体中の 1 検体から培養 5 日後にボツリヌス菌が検出された。

試験に供した 5 製品の理化学的性状は、pH 4.7～6.7、水分活性 (Aw) 0.96～0.99 の範囲で、いずれもボツリヌス菌の増殖可能範囲であった。しかし、芽胞添加後の保存試験において芽胞の発芽・増殖と毒素産生が確認されなかった製品があったので、今後製品の冷蔵保存の義務付け等、当該製品の取り扱いに関する指導を行う場合には、製品への芽胞の添加試験の実施が必要であると考えられた。

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て、その理化学的性状及びボツリヌス菌芽胞添加後の発芽・増殖ならびに毒素の産生を確認することによって、当該食品におけるボツリヌス菌による危害発生の可能性を評価することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1. 供試検体

市販の不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品を用いた。その内訳を表 1 に示す。

2. 検体の Aw, pH

Aw の測定については水分活性測定装置（ロトロニック、HYGRO-LAB）、pH の測

定については pH メーター（東亜電波工業、HM-50V）を用い、液汁を含む製品については無処理のままを、また、液汁を含まない製品については、検体に蒸留水を加えて 2 倍乳剤とした試料を測定した。

3. 供試菌株

Clostridium botulinum type A 及び type B を用いた。その内訳を表 2 に示す。

4. 芽胞の調製

供試 5 株を各々 TP 培地（5% Trypticase peptone; BBL, 5% Bacto peptone, pH 7.0）に接種し、37℃で一夜培養した。培養後、その 1 ml ずつを各々滅菌小試験管に採取し、これを 80℃で 20 分間加熱処理した後、再度 TP 培地 10 ml に接種して一夜培養し

た。この操作を3回繰り返し、培養液を顕微鏡下で観察して芽胞形成を確認した後、各培養液1 mlを加熱処理し、各々を1,000 mlのTP培地に接種して培養した。経時的に各培養液を顕微鏡下で観察し、芽胞形成が十分に認められた培養液を出発材料とした。各培養液を遠心(6,000回転15分間)して芽胞の濃厚浮遊液とし、その芽胞数を測定した後、小分けして使用するまで-30°Cで保存した。

5. 接種用芽胞液の調製及び食品への接種
凍結保存された芽胞液を融解した後、各芽胞液を約 $2\sim 3 \times 10^7$ cfu/mlになるように希釈し、各希釈液を頭領ずつ混合して接種用芽胞液とした。

各供試製品14袋の表面を消毒用アルコールで十分に消毒した。開封部位を火炎で消毒したメスを用いて開封し、芽胞液20 μ lを8袋に接種し、接種後、直ちにシーラー(卓上型ノズル式脱気シーラー、富士インパルス、V-400NTW)でシールした。このとき、別の6袋については開封後、芽胞を接種せずにシールし、芽胞非接種の対照とした。接種には滅菌注射器(テルモ、ツベルクリン用、針長15 mm)を装着した分注器(Indicon, TRIDAK Division, STEPPER)を用いた。

6. 加熱処理

芽胞非接種の対照6検体と芽胞接種の8検体を低温殺菌機(石田式)を用い、80°Cで20分間加熱した。加熱時間については、予め検体の熱伝導を測定し、検体の中心が80°Cに達するまでの時間(カムアップタイム)を加算した。

7. 加熱処理後の検体の分析

検体の内容全量を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倍乳剤とした試料を分析用の出発材料とした。これをさらに5倍希釈して10倍乳剤を調製し、その1 mlずつを2枚の滅菌シャーレ及び2枚のアネロービック・パウチに各々接種し、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混釈固化した。これを標準寒天については37°Cで48時間、クロストリディア培地については37°Cで7日間培養した。なお、2倍乳剤については、pHも測定した。

芽胞を接種した8検体については、3検体を初発芽胞数の測定に供し、残り5検体については保存試験(30°Cで90日間)に供した。保存試験については、一般生菌数及びクロストリジウム数の測定の他に、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を防止し、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、炭酸ガスによって速やかに安楽死させた。

C. 研究結果

5製品の不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品総計200検体について行ったボツリヌス菌芽胞添加試験及び理化学試験の結果を表3~7に示す。

馬刺くん製の理化学的性状はpH 6.0~6.2, Aw 0.96~0.97の範囲で、ボツリヌス菌が増殖可能な性状であった。初発芽胞数(区分E)は $3.9\sim 4.2 \times 10^4$ cfu/gの範囲であった。製品を培養せずにそのまま検査した3検体中の1検体(区分A)からボツリヌスA型菌とB型菌が30 cfu/g検出され、また、製品を開封後、芽胞を接種せずにシールし、その後、加熱処理して保存試験を行った3検体中の1検体(区分D)からボツリヌスB型菌が 6.1×10^5 cfu/g、枯草菌が 2.7×10^6 cfu/g検出された。芽胞を接種して保存試験を行った5検体(区分F)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。このうち、1検体からは枯草菌も検出された。

帆立時雨煮の理化学的性状はpH 6.6~6.9, Aw 0.99で、ボツリヌス菌が増殖可能な性状であった。その初発芽胞数(区分

E) は $3.0 \sim 3.9 \times 10^4$ cfu/g の範囲であった。製品を開封後、芽胞を接種せずにシールし、その後、加熱処理して保存試験を行った 3 検体中の 1 検体(区分 D)から 1.3×10^8 cfu/g のボツリヌス B 型菌と B 型毒素が検出された。芽胞を接種して保存試験を行った 5 検体(区分 F)については、いずれの検体においてもボツリヌス菌と A 型毒素のみが検出された。

飛魚のやきの理化学的性状は pH 6.7~6.8, Aw 0.97~0.98 の範囲で、初発芽胞数は $2.5 \times 10^3 \sim 3.5 \times 10^4$ cfu/g の範囲(区分 E)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(区分 F)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 日後の残り 1 検体については、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、その初発芽胞数は $2.5 \sim 3.5 \times 10^4$ cfu/g の範囲(区分 E)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(区分 F)については、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。

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 の範囲(区分 E)であった。本製品はその pH がやや低いもののボツリヌス菌の増殖可能範囲で、芽胞を添加して保存試験を行った 5 検体中のすべて(区分 F)においてボツリヌス菌の増殖及び A 型毒素と B 型毒素の産生が確認された。

D. 考察

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°C で 4 分間の加熱殺菌が必要である。本製品には 120°C で 4 分間の加熱処理済みと表示されていたが、実際には 75°C , 10 分間及び 80°C , 10 分間の二段階加熱処理で、しかも製品の中心温度を測定していない。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、容器包装内に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種類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。

E. 結論

5 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 製品において確認されなかった。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。