

表6 「さばの塩焼き(食品E)」のボツリヌス菌芽胞添加試験結果

試験開始日：2002年 12月 4日

検体処理内訳				理化学・細菌試験結果								
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)	Clt(cfu/g)	毒素型	備考(毒素価等)
	無処理	3	21	理化学試験	0日	無	6.3	0.98以上	NT	NT	NT	
			22			無	6.3	0.98以上				
			23			無	6.3	0.97				
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	無	NT	NT	10未満	10未満	(-)	
			16			無			10未満	10未満	(-)	
			17			無			10未満	10未満	(-)	
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日 (86日)	無	6.3	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
			19			無	6.3	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
			20			無	6.3	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	無	6.4	NT	10未満	10未満	NT	
			10			無	6.3		10未満	10未満		
			11			無	6.4		10未満	10未満		
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日 (86日)	無	6.3	0.97	10未満	10未満	(-)	
			13			無	6.3	0.97	10未満	10未満	(-)	
			14			無	6.4	0.97	10未満	10未満	(-)	
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	無	6.3	NT	10未満	9.1×10^3	NT	
			7			無	6.3		10未満	9.4×10^3		
			8			無	6.3		10未満	1.5×10^3		
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	15日	有	6.4	0.96	10未満	4.1×10^7	A	毒素量:1850
			2		有	6.5	0.96	10未満	3.1×10^7	A	1900	
			3		有	6.5	0.96	10未満	3.5×10^6	A	370	
			4		有	6.4	0.96	10未満	5.3×10^6	A	300	
			5		有	6.4	0.96	10未満	2.0×10^7	A	1630	

Clt: クロストリジウム菌数, SPC: 生菌数

毒素量: LD₅₀, 1単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値

NT: 実施せず

表7 「甘栗(食品F)」のボツリヌス菌芽胞添加試験結果

試験開始日： 2002年 12月 4日

検体処理内訳					理化学・細菌試験結果							
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(毒素価等)
	無処理	3	21	理化学試験	0日	無	5.8	0.98以上	NT	NT	NT	
			22			無	5.8	0.98以上				
			23			無	5.8	0.98以上				
A	無処理	3	15	細菌試験	0日	無	NT	NT	10未満	10未満	(-)	
			16			無			10未満	10未満	(-)	
			17 (陰性確認)			無			10未満	10未満	(-)	
B	無処理	3	18	保存試験	90日	無	5.8	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
			19			無	5.8	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
			20 (未開封)			無	5.8	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験	0日	無	5.9	NT	10未満	10未満	NT	
			10			無	5.9		10未満	10未満		
			11 (開封操作確認)			無	5.9		10未満	10未満		
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験	90日	無	5.7	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
			13			無	5.7	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
			14 (開封)			無	5.7	0.98以上	10未満	10未満	(-)	
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験	0日	無	5.9	NT	10未満	2.4x10 ⁴	NT	
			7			無	5.9		10未満	2.8x10 ⁴		
			8 (接種菌数確認)			無	5.9		10未満	3.1x10 ⁴		
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	86日	無	5.5	0.98以上	10未満	1.0x10 ⁴	(-)	
			2		86日	無	5.7	0.98以上	10未満	1.2x10 ⁴	(-)	
			3		86日	無	5.7	0.98以上	10未満	8.6x10 ³	(-)	
			4		86日	無	5.7	0.98以上	10未満	2.6x10 ⁴	(-)	
			5		86日	無	5.9	0.98以上	10未満	4.5x10 ³	(-)	

Clf: クロストリジウム菌数, SPC: 生菌数

毒素量: LD₅₀, 1単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値

NT: 実施せず

表8 「牛タン・くん製(食品G)」のボツリヌス菌芽胞添加試験結果

試験開始日: 2002年 12月 4日

検体処理内訳				理化学・細菌試験結果									
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)	Clt(cfu/g)	毒素型	備考(毒素価等)	
	無処理	3	21	理化学試験	0日	無	6.3	0.96	NT	NT	NT		
			22			無	6.4	0.96					
			23			無	6.4	0.96					
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	無	NT	NT	10未満	10未満	(-)		
			16			無			10未満	10未満	(-)		
			17			無			10未満	10未満	(-)		
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日 (86日)	無	6.3	0.94	4.1x10 ³	10未満	(-)		
			19			無	6.3	0.94	2.8x10 ²	10未満	(-)		
			20			無	6.4	0.95	6.2x10 ³	10未満	(-)		
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	無	6.4	NT	10未満	10未満	NT		
			10			無	6.4		10未満	10未満			
			11			無	6.4		1.1x10 ²	10未満			
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日 (86日)	無	6.5	0.94	9.6x10 ⁴	10未満	(-)	B.cereus 検出	
			13			無	6.3	0.93	3.4x10 ⁴	10未満	(-)		
			14			無	6.4	0.94	7.3x10 ⁴	10未満	(-)		
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	無	6.3	NT	10未満	4.4x10 ⁴	NT		
			7			無	6.4		10未満	2.7x10 ⁴			
			8			無	6.4		2.5x10 ¹	2.9x10 ⁴			
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	33日	無	6.3	0.94	10未満	5.6x10 ³	A	毒素量:1000	
			2		30日	有	6.6	0.95	5.4x10 ²	3.0x10 ²	A		700
			3		30日	有	6.2	0.95	2.7x10 ²	10未満	A		80
			4		26日	無	6.1	0.94	1.1x10 ³	7.9x10 ²	A		120
			5		26日	無	6.1	0.94	1.4x10 ²	4.7x10 ²	A		330

Clt: クロストリジウム菌数, SPC: 生菌数

毒素量: LD₅₀, 1単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値

NT: 実施せず

表9 「豚生姜煮(食品H)」のボツリヌス菌芽胞添加試験結果

試験開始日： 2002年 12月 4日

検体処理内訳					理化学・細菌試験結果								
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)	Clt(cfu/g)	毒素型	備考(毒素価等)	
	無処理	3	21	理化学試験	0日	無	5.6	0.96	NT	NT	NT		
			22			無	5.6	0.96					
			23			無	5.7	0.96					
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	無	NT	NT	10未満	10未満	(-)		
			16			無			10未満	10未満	(-)		
			17			無			10未満	10未満	(-)		
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日 (86日)	無	5.7	0.96	10未満	10未満	(-)		
			19			無	5.8	0.96	10未満	10未満	(-)		
			20			無	5.8	0.96	10未満	10未満	(-)		
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	無	5.9	NT	10未満	10未満	NT		
			10			無	5.8		10未満	10未満			
			11			無	5.9		10未満	10未満			
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日 (86日)	無	5.7	0.96	10未満	10未満	(-)		
			13			無	5.7	0.95	10未満	10未満	(-)		
			14			無	5.7	0.96	10未満	10未満	(-)		
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	無	5.8	NT	10未満	1.3×10 ⁴	NT		
			7			無	5.8		10未満	1.3×10 ⁴			
			8			無	5.8		10未満	2.3×10 ⁴			
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	33日	有	6.0	0.95	10未満	2.0×10 ³	A	毒素量:4000	
			2		30日	有	6.2	0.96	10未満	1.2×10 ³	A		6400
			3		30日	有	6.0	0.95	10未満	1.7×10 ³	A		2300
			4		26日	有	6.1	0.96	10未満	3.3×10 ³	A		5300
			5		26日	有	6.1	0.96	10未満	5.2×10 ³	A		4800

Clt: クロストリジウム菌数, SPC: 生菌数

毒素量: LD₅₀. 1単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値

NT: 実施せず

表10 「牛タン・くん製(食品G)」の追加試験結果

No.	培養日数(30°C)	供試量(g)	袋の膨張	pH	Aw	SPC(cfu/g)	Clt(cfu/g)	Deso(cfu/g)	<i>B. cereus</i>	ボツリヌス毒素	ボツリヌス菌	備考	
A	1	11日	38	無	6.4	0.95	1.4x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	2	11日	37	無	6.5	0.95	1.2x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	3	11日	38	無	6.1	0.95	1.3x10 ⁵	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	4	11日	36	無	6.3	0.95	2.1x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	5	11日	37	無	6.5	0.95	6.3x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	6	11日	29	無	6.4	0.95	3.5x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	7	11日	36	無	6.4	0.95	3.9x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	8	11日	37	無	6.3	0.95	3.4x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	9	11日	38	無	6.4	0.95	3.7x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	10	11日	37	無	6.4	0.95	3.4x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	11	18日	40	無	6.5	0.95	9.7x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	12	18日	48	無	6.5	0.94	9.1x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	13	18日	37	無	6.5	0.95	5.8x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	14	18日	35	無	6.6	0.95	2.4x10 ⁰	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	15	18日	36	無	6.5	0.95	2.4x10 ⁵	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	16	18日	14	無	6.5	0.94	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	「粘り」有, 食品の重さは約1/3
	17	18日	37	無	6.5	0.97	5.2x10 ³	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	18	18日	37	無	6.5	0.95	1.1x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	19	0日	35	無	6.5	0.95	2.3x10 ²	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	20	0日	13	無	6.5	0.94	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	「粘り」有, 食品の重さは約1/3
B	1	11日	39	無	6.4	0.92	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	2	11日	37	無	6.5	0.93	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	3	11日	39	無	6.4	0.94	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	4	11日	37	無	6.4	0.94	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	5	11日	39	無	6.4	0.92	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	6	18日	40	無	6.5	0.94	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	7	18日	37	無	6.5	0.93	1.6x10 ²	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	8	18日	39	無	6.5	0.93	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	9	18日	38	無	6.6	0.92	2.5x10 ¹	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	10	0日	26	無	6.5	0.95	10未満	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
G	27	7日	38	無	6.3	0.95	4.6x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	28	7日	36	無	6.5	0.95	3.7x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	29	7日	37	無	6.5	0.95	1.8x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	
	30	7日	37	無	6.5	0.96	4.2x10 ⁴	10未満	10未満	(-)	(-)	(-)	

供試量: 内容量のほぼすべてを供試した
 Clt: クロストリジウム菌数, SPC: 生菌数
 NT: 実施せず

関連試験 1

「水分活性測定装置」の比較

1. 目的

水分活性の測定は2種類の水分活性測定装置「デカゴン アクアラブ CX-3」と「ロトロニック製 HYGRO-LAB」で行われたので、2種の測定値を比較した。

2. 測定機種

「デカゴン アクアラブ CX-3」：東京都健康安全研究センター（都衛研）で測定。

「ロトロニック製 HYGRO-LAB」：缶詰協会と A 社（測定試料を調整）で測定。

3. 測定試料

「つゆの素」のストレート、2倍濃厚液、3倍濃厚液の各々にアルコールを0%、2%、4%の割合で添加したもの。

4. 結果

表 11 に示す。

「つゆの素」の濃度、アルコール添加の有無、その濃度に関わらず、2種類の水分活性測定装置の測定値には有意の差は認められなかった。

5. まとめ

2種類の水分活性測定装置「デカゴン アクアラブ CX-3」と「ロトロニック製 HYGRO-LAB」の測定値を比較した。測定値が2機種の間で差異が無いことを確認した。

「つゆの素」水分活性測定値の比較

記号	製品の種類	アルコール添加量(%)	Aw				pH		
			A (都衛研)	B (A社)	B (缶詰協会)		都衛研	A社	缶詰協会
A-0	ストレート	0	0.97	0.96	0.97	0.97	4.8	4.9	4.8
			0.97		0.97	0.97			
					0.97	0.97			
A-2	"	2	0.97	0.96	0.96	0.97	4.8	4.9	4.8
			0.97		0.96	0.97			
					0.96	0.97			
A-4	"	4	0.97	0.95	0.96	0.96	4.7	4.9	4.8
			0.97		0.96	0.96			
					0.96	0.96			
B-0	2倍濃厚液	0	0.93	0.92	0.94	0.94	4.7	4.8	4.8
			0.93		0.94	0.94			
					0.94	0.94			
B-2	"	2	0.93	0.91	0.93	0.93	4.7	4.9	4.9
			0.93		0.93	0.93			
					0.93	0.93			
B-4	"	4	0.93	0.91	0.92	0.92	4.7	4.9	4.8
			0.93		0.92	0.93			
					0.92	0.93			
C-0	3倍濃厚液	0	0.89	0.88	0.90	0.90	4.8	4.8	4.8
			0.89		0.90	0.90			
					0.90	0.90			
C-2	"	2	0.89	0.88	0.90	0.90	4.7	4.9	4.8
			0.89		0.90	0.89			
					0.90	0.90			
C-4	"	4	0.89	0.87	0.89	0.89	4.8	4.9	4.8
			0.89		0.89	0.89			
					0.89	0.89			

水分活性測定装置 A:デカゴン アクアラブ CX-3
B:rotoronic Hydroskop DT

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）
平成14年度 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：
容器容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞の接種試験成績

分担研究者 林 賢一 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当
研究協力者 石川和彦 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当
研究協力者 辻 朋子 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当

研究要旨

最近のボツリヌス食中毒の発生状況から、気密性を有する容器包装詰の低酸性食品によるボツリヌス食中毒の発生防止対策が重要な課題となっている。今年度は、容器包装詰食品のうち、「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」3品目、すなわち「あさり生姜」、「豆腐のスクランブル」および「肉じゃが」に、ボツリヌス菌芽胞を接種（A型およびB型ボツリヌス菌芽胞混合液は食品1gあたり $10^3 \sim 10^4/g$ ）し、30℃で保存培養後、ボツリヌス菌の増殖および毒素産生性について評価を行った。

その結果、いずれの食品も水分活性、pHはボツリヌス菌が十分発育できる値であった。また、供試食品3品いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素が産生された。食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残した場合、ボツリヌス毒素が産生され、ボツリヌス食中毒の発生につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

食品嗜好性の多様化、生活様式の変化、輸入食品の拡大などにより、多種多様の食品が製造販売されている。その中には製造技術や容器包装技術の向上により、常温で長期間保存が可能とする食品も増加してきている。

そのうち、市販されている「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（いわゆるレトルト類似食品）」を対象に、細菌汚染状況を調べるとともに、ボツリヌス菌芽胞を接種し、その増殖性および毒素産生性を評価した。

B. 研究方法

1. 供試食品

製造業者から購入した「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」3品目、すなわち「あさり生姜（食品O）」、「豆腐のスクランブル（食品P）」および「肉じゃが（食品Q）」を供試食品とし、各40検体ずつ計120検体を用いた（表1）。各検体には食品の品目ごとにNo.1～40まで番号を付し、後述の試験に供した。

2. 水分活性、pHおよび熱伝達の測定

1) 水分活性

水分活性 (A_w) は、水分活性測定装置 (ロトロニック製 HYGRO-LAB) を用いて測定した。

2) pH

pH は、試料に等量の蒸留水を加え、十分に混釈した後、pH メーター (東亜電波工業製、HM-50V あるいは HORIBA 製、EX20) を用いて測定した。

3) 熱伝達

熱伝達の測定には、一温度測定装置に記録式温度計(エラブ社製、CMC-821 型)を、温度センサーはステンレス保護管付き熱電対(外径 1.2mm)を用い、(社)日本缶詰協会研究所で測定した。

3. 培地および試薬

1) クロストリジア測定用培地

市販のクロストリジア測定用培地(日水製薬製)を用いた。ただし、濃度は 1000ml あたり 46.9g(常法の 2/3 量)とした。

2) 標準寒天培地

市販の標準寒天培地(日水製)を用いた。

3) ボツリヌス毒素抗血清

ボツリヌス毒素抗血清は千葉県血清研究所製造品の A 型および B 型を用いた。

4) マウス

ボツリヌス毒素の検出には、ddY 系マウス (雄、体重 約 20 g) を用いた。

4. ボツリヌス菌芽胞液および芽胞添加食品の調整

1) 供試菌株

Clostridium botulinum A 型株 4 株 ; 62A (ATCC7948)、62A (NFPA、米国食品製造業者協会)、90A、B1G4) および B 型 1 株 (213B) の計 5 株を用いた (表 2)。

2) 芽胞液の調整

芽胞液は、北海道衛生研究所武士甲一博

士より提供された。

接種用芽胞液は各供試菌株の芽胞液を混合して用いた。すなわち、芽胞液の芽胞数が約 $2 \sim 3 \times 10^7$ cfu/ml になるよう希釈し、この希釈液を等量ずつ混合して添加用芽胞液として用いた。

3) 供試食品へのボツリヌス菌芽胞の接種および対照試料の作製

1 品目あたり検体 14 袋の外側をアルコールでよく拭き、そのうち 8 袋に芽胞液 20 μ l を接種し、直ちにシーラー(卓上型ノズル式脱気シーラー、富士インパルス製、V-400NTW)でシールした。また、無接種対照として 6 袋は接種せずにそのままシールした。これらの接種およびシール操作は、缶詰協会研究所で行った。

4) 加熱処理

各食品の無接種対照群 6 検体および接種群 8 検体を、低温殺菌機(石田式)を用いて温水中で 80℃、20 分加熱処理した。なお、加熱時間はあらかじめ供試試料の熱伝達を測定し、加熱時間には供試試料の中心が 80℃に達するまでの時間を加えて加熱処理した。これらの加熱処理は缶詰協会研究所で行い、直ちに滋賀県立衛生環境センターに搬送した。

5. 保存試験

ボツリヌス菌芽胞接種食品および未接種食品の保存試験方法の概要を図 1 に示す。

保存試験開始時に非加熱処理の未開封試料各 3 検体を、以下の方法により嫌気性菌数、一般生菌数およびマウスに対する毒性を調べた。他の保存試験用試料は、ガス膨張破裂による汚染を防止するため、個別に 2 重にビニール袋に入れ、30℃の孵卵器内で培養 (保存) した。保存期間中に容器

がガス発生により膨張した試料は、4℃の冷蔵庫に保管後、検査に供した。

1) 試料原液の作製

試料の全量を無菌的にストマッカー用滅菌ポリエチレン袋(栄研器材製、ストマフィルターSタイプ)にとり、等重量の滅菌精製水を加え、ストマッカーで混和し、これを試料原液(検体の2倍希釈液)とした。

2) 一般生菌数の測定

上記試料原液 20ml を滅菌ペプトン加生理食塩水 80ml に加え 10 倍希釈液を作製した後、滅菌ペプトン加生理食塩水 9ml で 10 倍段階希釈液を作製した。これらの希釈液 1ml ずつを 2 枚の滅菌ポリシャーレにとり、標準寒天培地 15ml を加えよく混和し、培地を固化させた。さらに同培地 10ml を重層し、固化・乾燥後、37℃で 48 ± 3 時間培養後、コロニー数を計数し 1g あたりの生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加生理食塩水 1ml ずつを各々 2 枚の滅菌ポリシャーレに入れ、試料の場合と同様に培養した。また、培地の陰性対照も同様に作製した。

3) 嫌気性菌数の測定

一般生菌数の測定時に作成した試料希釈液を使用した。滅菌パウチ(酒見医科機械製)に、加熱溶解し、50℃に保温しておいたクロストリジア寒天培地 15ml と試料希釈液 1ml を加えてよく混和した後、冷却・固化させた。各希釈段階に 2 枚のパウチを用いた。これらは 37℃で 1~5 日間培養し、黒色集落を計測し、1g あたりの嫌気性菌数を算出した。なお、嫌気性菌数の測定値をボツリヌス菌数とした。

4) ボツリヌス毒素の検査

a. マウス毒性試験

試料原液はマウス毒性試験に供するまで、-20℃で保存した。冷凍した試料は解凍後、4℃下で 3,000rpm 20 分間遠心分離し、上清 0.5ml ずつを 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。マウスの生死は 5 日間観察し、ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡するか否かを観察した。マウスが死亡した場合、マウス毒性陽性として、ボツリヌス毒素の確認試験を行った。

b. ボツリヌス毒素の確認試験

マウス毒性試験の結果、ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡した場合は A 型ボツリヌス抗毒素および B 型ボツリヌス抗毒素を用いて中和試験を行い毒素型の確認を行った。中和試験は、試料原液と 1~8IU に滅菌生理食塩水で希釈したボツリヌス毒素抗血清を等量混合し、37℃で 30 分間恒温後、その 0.5ml ずつを 2 匹のマウスに注射した(抗血清はマウスあたり 1~2IU)。同時に、試料原液を 100℃10 分加熱し、0.5ml ずつを 2 匹のマウスに注射した。加熱処理によりマウスに対する毒性が失活し、かつ A 型あるいは B 型、または両方の抗毒素血清によって中和された場合、ボツリヌス毒素陽性とした。

c. ボツリヌス毒素の定量試験

ボツリヌス毒素の定量試験は、マウス静脈内注射による定量法によって 1g あたりのマウス ipLD₅₀ を算出した。

6. 倫理面への配慮と試験操作上の留意点

使用したマウスには、できる限り苦痛を与えぬよう配慮し実験を行った。ボツリヌス菌の取り扱い、移動、試験操作および保管等は、滋賀県立衛生環境センター病原体等安全管理規程に基づいて、専用の実験室

で実施した。芽胞摂取後膨張した試料の開封は安全キャビネット内で行い、使用した実験器具は、実験後すみやかに 121℃で 30 分間オートクレーブにより処理した。

C. 研究結果

1. 供試食品の Aw および pH

保存培養試験を行う前の Aw および pH の測定結果を、表 3～5 に示す。

食品 O(あさり生姜)は Aw0.97～0.98 以上、pH6.1～6.2、食品 P(豆腐のスクランブル)は Aw0.98 以上、pH5.6 ならびに食品 Q(肉じゃが)は Aw0.98 以上、pH5.4～5.5 であった。

2. 供試食品の熱伝達

供試試料の熱伝達測定結果および加熱処理時間を表 6 に、熱伝達測定チャートを図 2 (あさり生姜、豆腐のスクランブル) および図 3 (肉じゃが) に示す。

加熱処理時間は、80℃に達してから 20 分とするため、測定結果(カムアップタイム)に 20 分加えた時間とし、「あさり生姜」が 39 分、「豆腐のスクランブル」が 23 分および「肉じゃが」が 54 分とした。

3. 調製した芽胞液の菌数

調製した各供試菌株の芽胞液の芽胞数を表 7 に、接種用に調製した混合芽胞液の芽胞数を表 8 に示す。調製した各供試菌株芽胞液は、 $2\sim 3 \times 10^7$ CFU/ml になるよう、5101 株は 20 倍、5102 株は 10 倍、5105、5108 および 5106 株は 200 倍に希釈し、等量ずつ混合し、接種用芽胞液とした。20 μ l あたりの計算値は $4\sim 6 \times 10^5$ 個である。

4. 加熱処理後保存試験直前の検査成績

加熱処理後(開封群)で保存試験直前の芽胞接種検体および無接種検体各 3 検体ず

つの検査結果を、表 3～5 に示す。

一般生菌数は、いずれの検体からも検出されなかった(10cfu 未満/g)。また、嫌気性菌(ボツリヌス菌)は開封ボツリヌス菌芽胞非接種群(区分 C)からは検出されなかったが、開封ボツリヌス菌芽胞接種群(区分 E)からは、食品 O(あさり生姜)では $2.4 \times 10^3\sim 2.5 \times 10^4$ cfu/g、食品 P(豆腐のスクランブル)では $2.4 \times 10^4\sim 3.6 \times 10^4$ cfu/g および食品 Q(肉じゃが)では $1.4 \times 10^4\sim 1.6 \times 10^4$ cfu/g 検出された。

5. 保存後の検査成績

1) あさり生姜(食品 O)

食品 O の検査結果を表 3 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験では、一般生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10cfu 未満/g であった。開封芽胞接種群では、保存 4 日目に供試した 5 検体すべてにガス発生による袋の膨張が認められた。膨張した検体の一般生菌数はすべて 10cfu 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は $6.3 \times 10^7\sim 9.8 \times 10^7$ cfu/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は $5.4 \times 10^4\sim 1.0 \times 10^5$ マウス ipLD₅₀/g であった。

培養後の pH は 6.2～6.5 であり、培養していない開封芽胞接種群や開封芽胞未接種群の 6.2～6.3 と比べて若干高くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)では 90 日後まで膨張が認められなかった。その一般生菌数およびボツリヌス菌数は 10cfu 未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

2) 豆腐のスクランブル(食品 P)

食品 P の検査結果を表 4 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験では、一般生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10cfu 未満/g であった。開封芽胞接種群では、保存 4 日目に供試した 5 検体すべてにガス発生による袋の膨張が認められた。膨張検体の一般生菌数はすべて 10cfu 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は $2.0 \times 10^7 \sim 3.6 \times 10^7$ cfu/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型と B 型のボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は $1.4 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^5$ マウス ipLD₅₀/g であった。

培養後の pH は 5.8 であり、培養していない開封芽胞接種群や開封芽胞未接種群の 5.6~5.7 と比べて若干高くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)では 90 日後まで膨張が認められなかった。その一般生菌数およびボツリヌス菌数は 10cfu 未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

3) 肉じゃが (食品 Q)

食品 Q の検査結果を表 5 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験では、一般生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10cfu 未満/g であった。開封芽胞接種群では、保存 4 日目に供試した 5 検体すべてにガス発生による袋の膨張が認められた。膨張検体の一般生菌数はすべて 10cfu 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は $4.0 \times 10^7 \sim 3.2 \times 10^8$ cfu/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は $3.0 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^5$ マウス ipLD₅₀/g であった。

培養後の pH は 5.7~5.8 であり、培養し

ていない開封芽胞接種群や開封芽胞未接種群の 5.6~5.7 と比べて若干高くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)では 90 日後まで膨張が認められなかった。その一般生菌数およびボツリヌス菌数は 10cfu 未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

D. 考察

わが国のボツリヌス食中毒は、従来その 90%以上を占めていた E 型食中毒(北海道、東北地方では主として「いずし」、滋賀県では「はずずし」が原因食品)に代わり、瓶詰、缶詰あるいは気密性のある容器包装食品等を原因とした A 型、B 型による食中毒が多く認められるようになってきた。平成 10 年 8 月にはイタリア産グリーンオリーブの塩漬(瓶詰)を原因食品とする B 型食中毒事例(東京都で患者 18 名)、平成 11 年 8 月にはハヤシライスの具(レトルト類似食品)を原因食品とする A 型食中毒事例(千葉県で患者 1 名)が発生している。

これらの事例では、調理された食品が気密性を有する容器包装に充填された後、加熱殺菌が不十分のまま常温放置された結果、ボツリヌス菌が増殖し、毒素を産生したため食中毒に至ったと推定された。特にハヤシライスの具(レトルト類似食品)の事例では、原因食品は「要冷蔵食品」であったが、外観上はレトルト食品(121℃、4 分相当の加熱加圧殺菌処理が製造基準で定められている)と類似していたことなどにより常温放置されていたことが、ボツリヌス食中毒の発生につながったと考えられている

る。E 型以外の事例では、これらのほかに平成 11 年に大阪府と東京都でいずれも A 型食中毒事例が発生しており、原因食品は不明となっている。

このように、最近、A 型や B 型ボツリヌス食中毒が続けて発生していること、多種多様な輸入食品等が流通していること、製造技術や容器包装技術の進歩により常温で長期間保存が可能な食品の販売が増加傾向にあることなどから、ボツリヌス食中毒発生の危険は常に存在している。しかし、わが国では、ボツリヌス食中毒に対するリスク評価は十分には行われていなかった。とりわけ、常温流通する容器包装詰された低酸性食品におけるリスク評価は、容器包装詰加圧加熱殺菌食品と違い食品衛生法の規制を全く受けていないこと、さらに本食中毒の重篤性からも急務のことであった。リスク評価が必要な食品のうち、今回は、食品の食味・風味・食感、色調を損なわない工業的調理法として需要が拡大している「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」をリスク評価の対象とした。ボツリヌス菌接種試験の方法としては、できる限り製造品に近い状態で評価を行うため、製造所から買い上げた製品にボツリヌス菌芽胞液を接種し、再密封した製品試料を用いた。また、接種したボツリヌス菌の増殖性と毒素産生性をより確実に評価するため、複数の異なる菌株からなる混合芽胞(A 型菌 4 株と B 型菌 1 株)を用い、比較的多量の芽胞濃度 $10^3 \sim 10^4$ cfu/g を接種し、30℃で培養(保存)し、評価を行った。

その結果、食品 O (あさり生姜)、食品 P (豆腐のスクランブル) および食品 Q (肉じゃが) の品目を問わず、ボツリヌス菌芽

胞を接種後培養した群では供試した 5 検体すべてに短期間(培養後 4 日目)でボツリヌス菌の増殖とボツリヌス毒素の産生が認められた。しかも、産生された毒素量は、1g あたり $10^4 \sim 10^5$ マウス ipLD₅₀ という極めて高い値であり、食中毒の発生に必要な十分な毒素量と考えられた。これらの食品の pH が 5.4~6.2 であったこと、Aw が 0.97 以上であったこと、さらにボツリヌス菌の発育に影響する可能性のある雑菌(一般細菌数)が検出されなかったことを考えると、このような結果は当然のことと考えられた。

また、ボツリヌス毒素型は、食品 O (あさり生姜) と食品 Q (肉じゃが) では供試した 5 検体ともすべて A 型毒素のみが産生され、食品 P (豆腐のスクランブル) では供試した 5 検体とも A 型毒素と B 型毒素の両方が産生され、B 型毒素の産生性に違いが認められた。その理由としては、「あさり生姜」や「肉じゃが」に B 型菌芽胞が発芽・増殖を阻害する物質が含まれていた可能性などが考えられるが、今回の成績だけでは明確に説明できない。

以上のように、今回検討した 3 品目すべての食品中で、ボツリヌス菌芽胞は発芽・増殖し、いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素が産生された。したがって、これら食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残した場合、流通や保存の条件によってはボツリヌス毒素の産生が起こることが示唆された。したがって、今後、加熱殺菌条件の評価や保存・流通条件(例えば「冷蔵保存食品」等)について検討する必要がある。