

で魚を保存した場合、真空条件下、および 70%ならびに 100%CO₂ 存在下のいずれにおいても、3~9 日後に毒素産生が認められた (ICMSFa)。ブロッコリーを気体透過性の異なる容器中で保存した結果、[酸素透過率 7,000 cm³/m²/24h, 二酸化炭素透過率 20,500 cm³/m²/24h] の容器では 13°C21 日後ならびに 21°C10 日後に、[酸素透過率 16,000 cm³/m²/24h, 二酸化炭素透過率 36,000 cm³/m²/24h] の容器では 21°C10 日後に、それぞれ毒素産生が認められた(Hao et al.)。すなわち、気体透過性があってもボツリヌス毒素は産生される。

- リスクに関して現在知られていること、例えば媒介食品の生産、加工、流通と消費者の取り扱いに関連してどの様にしてリスクが発生し、誰に影響を及ぼすか
 - 1969 年に宮崎県で起きた B 型ボツリヌス中毒は、ドイツ産キャビアを原因として患者 23 名死者 3 名を出した (国立感染症研究所・厚生労働省保健医療局結核感染症課)。前述の東京都のグリーンオリーブによる食中毒事例は、イタリアから輸入されたビン詰めの塩漬けグリーンオリーブが原因であり、我が国で 3 例目の B 型ボツリヌス毒素による中毒であった(門間千枝ほか)。食品の国際貿易の発達により、外国の土壤に芽胞として存在するボツリヌス菌が、食品や食材に混入して輸入される可能性が危惧される。
 - 1999 年に千葉県で発生したレトルト類似食品による A 型ボツリヌス中毒事例では、加熱後容器包装された原因食品に冷蔵保存の表示があったにもかかわらず、包装がレトルト食品に類似していたために常温で保存されたことが、中毒の原因であった。患者が喫食した商品と同日に宅配された「ハヤシライスの具」25 検体のうち 1 検体から A 型ボツリヌス菌ならびに毒素が検出された。(小林博司ほか、内村眞佐子ほか)

4. 研究事業ならびに調査事業の結果のまとめ

平成 14~16 年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「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」ならびに平成 17 年度「容器包装詰低酸性食品に関する試験検査」の結果を以下にまとめる。

- 常温流通容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌汚染実態
常温流通容器包装詰低酸性食品のうち、若干の気体透過性を有する容器包装に入れ、密封した後に 120°C 4 分間に満たない条件で加圧加熱殺菌された、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) の一部と、常温流通容器包装詰低酸性食品に広く添加される可能性のある非殺菌処理香辛料、そしてエスニック食品の一部 (水分活性は低かった) から、ボツリヌス菌が検出された。また、複数の常温流通容器包装詰低酸性食品において、高い一般生菌数、

好気性芽胞菌、*Clostridium* 属菌が検出された。

● 常温流通容器包装詰低酸性食品の物理化学的分析結果

研究ならびに調査の対象とした常温流通容器包装詰低酸性食品は、ほとんどが pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上であった。

● 常温流通容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞添加試験法の検討

供試ボツリヌス菌株、芽胞液調整法、食品への接種方法、保存期間と試験検体数について、現在の通知（本5項参照）に示される方法に替わる方法を提示した。

● 常温流通容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞添加試験結果

いわゆるレトルト類似食品の多く、惣菜類、一部の和菓子、無菌化包装米飯などで、ボツリヌス菌芽胞添加試験の結果、毒素の産生が認められた。

● まとめ

① 本菌は、土壌や動物の腸管内など、環境中に広く存在しているため、ほとんど全ての食品を汚染しうる菌であること

② ボツリヌス菌の増殖が可能である pH と水分活性の領域にある容器包装詰食品が多岐に亘り、常温で長期間流通している実態があること

③ それらの食品のうち、レトルト食品および缶詰を除くほとんどの食品では、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準（中心部の温度として 120°で4分間加熱あるいは同等以上）を満たす条件で加熱されていないこと

から、

○ 理論的には、原材料あるいは加工工程に由来するボツリヌス菌の芽胞が、最終製品中に残存することはありうる（混入を否定する根拠はない）と考えられる。（クロストリジアによる汚染や好気性芽胞菌の汚染もこの危険性を示唆するものである。）

さらに、

○ 万一産生された毒素を摂食した場合の健康被害は、死亡も含めて重篤である。

以上のことから、pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上であり、120°C、4分間に満たない条件で加熱された後、常温流通する食品については、

◎ 中心部の温度として 120°で4分間あるいは同等以上の加熱処理を行なうことによりボツリヌス菌芽胞を死滅させる

◎ 冷蔵流通を行なうことによりボツリヌス菌の増殖と毒素産生を防ぐ

◎ 常温流通期間を短くし、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生を防ぐ

以上のうちのいずれかの対策をとるか、あるいは

◎ ボツリヌス菌芽胞添加試験を行い、当該食品中でボツリヌス菌が増殖せず、毒素も産生しないことを証明する

以上のように規格基準の変更を検討することが必要と考えられる。

5. 既存のリスク管理措置の効果の範囲と有効性についての要約

● <規格基準>

現在、我が国では容器包装詰加圧加熱殺菌食品（いわゆるレトルト食品）について、当該食品に含まれる微生物に着目し、病原微生物はもとより腐敗細菌等当該食品中で増殖しうる微生物が存在しない状態、いわゆる商業的無菌状態を達成することにより、当該食品に含まれる微生物に起因した食中毒等食品衛生上の危害の発生を防止するために以下のとおり規格基準を設定している。

食品、添加物等の規格基準（抜粋）

第1 食品

D 各条

○ 容器包装詰加圧加熱殺菌食品

- 1 容器包装詰加圧加熱殺菌食品（食品（清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品を除く。）を気密性のある容器包装に入れ、密封した後、加圧加熱殺菌したものをいう。以下同じ。）の成分規格

容器包装詰加圧加熱殺菌食品は、当該容器包装詰加圧加熱殺菌食品中で発育し得る微生物が陰性でなければならない。この場合の微生物の試験法は、次のとおりとする。

試験法（略）

- 2 容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準

- (1) 製造に使用する野菜等の原料は、鮮度その他の品質が良好なものでなければならない。
- (2) 製造に使用する野菜等の原料は、必要に応じ十分に洗浄したものでなければならない。
- (3) 製造に当たっては、保存料又は殺菌料として用いられる化学的合成品たる添加物（次亜塩素酸ナトリウムを除く。）を使用してはならない。
- (4) 缶詰食品又は瓶詰食品以外の容器包装詰加圧加熱殺菌食品の容器包装の封かんは、熱溶融又は巻締めにより行わなければならない。
- (5) 製造の際に行う加圧加熱殺菌は、自記温度計を付けた殺菌器で行い、自記温度計によるその記録は3年間保存しなければならない。
- (6) 製造の際に行う加圧加熱殺菌は、次の二つの条件に適合するように加圧加熱殺菌の方法を定め、その定めた方法により行わなければならない。
 1. 原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法であること。
 2. そのpHが4.6を超え、かつ、水分活性が0.94を超える容器包装詰加圧加熱殺菌食品にあつては、中心部の温度を120°で4分間加熱する方法

又はこれと同等以上の効力を有する方法であること。

- (7) 加圧加熱殺菌後の冷却に水を用いるときは、飲用適の流水で行うか、又は遊離残留塩素を 1.0ppm 以上含む水で絶えず換水をしながらか行わなければならない。
- (8) 製造に使用する器具は、十分に洗浄したうえ殺菌したものでなければならない。

第3 器具及び容器包装

E 器具又は容器包装の用途別規格

- 1 容器包装詰加圧加熱殺菌食品（缶詰食品又は瓶詰食品を除く。以下この項において同じ。）の容器包装

容器包装詰加圧加熱殺菌食品の容器包装にあつては、次に掲げる条件のすべて（封かんが巻締めにより行われた容器包装にあつては(4)の条件を除く。）を満たすものでなければならない。

- (1) 遮光性を有し、かつ、気体透過性のないものであること。ただし、内容物が油脂の変敗による品質の低下のおそれのない場合にあつては、この限りでない。
- (2) 水を満たし密封し、製造における加圧加熱と同一の加圧加熱を行ったとき、破損、変形、着色、変色などを生じないものであること。
- (3) 強度等試験法中の耐圧縮試験を行うとき、内容物又は水の漏れがないこと。
- (4) 強度等試験法中の熱封かん強度試験を行うとき、測定された値が 23N 以上であること。
- (5) 強度等試験法中の落下試験を行うとき、内容物又は水の漏れがないこと。ただし、容器包装が小売のために包装されている場合は、当該小売のための包装の状態のまま試験を行うこと。

● <通知>

容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について

平成 15 年 6 月 30 日 /食基発第 0630002 号/食監発第 0630004 号/

各都道府県・各政令市・各特別区衛生主管部(局)長あて 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長・厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知（抜粋）

平成 15 年 6 月 19 日に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、当該食品の取扱いについて審議が行われた結果、

「pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える食品を若干の気体透過性を有する容器包装(セラミック又はアルミニウムを蒸着した合成樹脂、エチレンビニルアルコール共重合体樹脂等を用いた合成樹脂製の容器包装)に入れ、密封した後に 120° 4 分間に満たない条件で加圧加熱殺菌する食品については、

① 当該食品は、原材料等がボツリヌス菌に汚染されている場合に食中毒を引き起こす可能性があること、

② ボツリヌス菌による食中毒を未然に防止する観点から、当該食品については、容器包装詰加圧加熱殺菌食品(「食品、添加物の規格基準」(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)第 1 食品 D 各条に規定する「容器包装詰加圧加熱殺菌食品」をいう。)に準ずる衛生管理が行われることが望ましいこと、

③ 規格基準の策定については油脂の変敗防止の観点からも検討が必要であることから、「追加試験成績の提出を待って検討すること」とされた。

については、規格基準の策定までの当分の間、下記により衛生管理が行われることが望ましいと考える。

記

食品を若干の気体透過性を有する容器包装(セラミック又はアルミニウムを蒸着した合成樹脂、エチレンビニルアルコール共重合体樹脂等を用いた合成樹脂製の容器包装)に入れ、密封した後に加圧加熱殺菌する食品(清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品及び魚肉練り製品を除く。)であって、pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超えるものにあつては、中心部の温度を 120℃で 4 分間加熱する方法若しくはこれと同等以上の効力を有する方法で加熱殺菌を行う、又は 10℃以下で保存すること

ただし、別添のボツリヌス接種試験によりボツリヌス毒素の産生が認められないものにあつてはこの限りでない。

(別添)

ボツリヌス菌接種試験法 (省略)

● カナダにおける食品回収方針

カナダでは、加熱後に常温流通している pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上の容器包装詰め食品は、ボツリヌス食中毒の原因となる可能性があると判断し、微生物検査なしに食品の回収を行う。最近では、たけのこの水煮やきのこの水煮が回収されている。

6. 食品安全委員会への諮問の必要性和諮問内容案

- リスクプロファイルに基づき、微生物学的リスク評価がリスク管理機関の必要とする情報の解析を十分に行い、希望する結果・内容の提供要件を満たす手段として適当であるか：
 - 食品に新たな規格基準の適用を図る際には、食品安全委員会における食品健康影響評価が必要とされている。(食品安全基本法)
 - 対象食品におけるボツリヌス菌の汚染、汚染した場合の増殖ならびに毒素産

生、さらに毒素の致死量に関するデータならびに更なるデータの入手先がほぼ網羅されたことから、当該食品に起因するボツリヌス中毒の Exposure Assessment ならびに Hazard Characterization が可能であると考えられる。

- したがって、次項目に挙げるリスク管理措置案の効果をある程度推定することが可能と思われることから、リスク管理における施策判断の根拠として、リスク評価が十分役立つことが期待できる。
 - 仮にリスク評価が必要であることが確認されたとして、リスク管理機関からリスク評価機関へ問いかける初期の質問事項及び解析を希望する事項：
 - pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上であり、120℃、4 分間に満たない条件で加熱された後、常温流通する食品に由来するボツリヌス中毒に関しての、現在のリスクのおおよその推定
 - 当該食品に対し、以下の基準を課した場合の、リスクの変化の推定
 - 中心部の温度として 120℃で 4 分間あるいは同等以上の加熱処理を行なうことによりボツリヌス菌芽胞を死滅させる
 - 冷蔵流通を行なうことによりボツリヌス菌の増殖と毒素産生を防ぐ
 - 常温流通期間を短くし、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生を防ぐ
- 以上のうちのいずれかの対策をとるか、あるいは
- ボツリヌス菌芽胞添加試験を行い、当該食品中でボツリヌス菌が増殖せず、毒素も産生しないことを証明する

7. 現在の入手可能な情報と、不足している知見および情報

- この病原体・媒介食品の組み合わせに対する、既存のリスク評価
 - F. Carlin, et al.: Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project, *International Journal of Food Microbiology*, 60: 117-135 (2000)
 - European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products, *The EFSA Journal* 14: 1-31 (2003)
http://www.efsa.eu.int/pdf/biohazard/opinion_biohaz_04_en.pdf
 - US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition: Processing Parameters Needed to Control Pathogens in Cold Smoked Fish, <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift2-toc.html> (2001)
 - P.A. Voysey: A microbiological risk assessment for *Clostridium botulinum* in MAP, processed, sliced chicken, *available from the author*

- R.C. Whiting and J.C. Oriente: Time-to-turbidity Model for Non-Proteolytic Type B *Clostridium botulinum*, *International Journal of Food Microbiology* 35: 49-60 (1997)
- リスク評価を実行することも含め、リスク管理活動を促進するその他の関連した科学的知見やデータの存在
 - 平成 14、15、16 年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「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」(主任研究者 小熊恵二) 総括ならびに分担研究報告書
 - 平成 17 年度「容器包装詰低酸性食品に関する試験検査」総括ならびに分担報告書
- リスク管理を行う上で欠如している情報
 該当食品の種類、製造量、流通量、考えられる対策の実行可能性と必要経費(加熱加圧法の変更、冷蔵流通、消費期限の短縮、添加試験の実施を含む)

8. 参考文献

- Y.Y. Hao et al.: Microbiological quality and production of botulinal toxin in film-packaged broccoli, carrots, and green beans, *Journal of Food Protection*, 62: 499-508 (1999)
- ICMSFa: *Clostridium botulinum*, In: *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*, Blackie Academic & Professional, London, pp. 66-125 (1996)
- ICMSFb: *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg (1998)
- B.M. Lund and M. W. Peck: *Clostridium botulinum*, In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*, An Aspen Publication, Gaithersburg, pp. 1057-1109 (2000)
- US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition: *Bacteriological Analytical Manual Online*, Chapter 17, *Clostridium botulinum*, January 2001.
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
- 内村眞佐子ほか：千葉県柏市で発生したボツリヌス食中毒事例、病原微生物検出情報、20 (12)、7 (1999)
- 厚生労働省食品安全部：食中毒・食品監視関連情報
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>
- 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部：食品安全情報
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/index.html>

- 国立感染症研究所・厚生労働省保健医療局結核感染症課：特集 ボツリヌス症、病原微生物検出情報、21 (3)、1-2 (2000)
- 小林博司ほか：急性弛緩性四肢麻痺を呈したボツリヌス中毒の一例、1999 年 8 月－千葉県柏市、病原微生物検出情報、20 (11)、8 (1999)
- 阪口玄二：ボツリヌス症－病因、病形、発症機構、診断と治療－、病原微生物検出情報、21 (3)、3-4 (2000)
- 武士甲一：ボツリヌス中毒、新訂食水系感染症と細菌性食中毒（編集：坂崎）、中央法規、492-513 (2000)
- 松村美由紀、岩田誠：東京都内で発生したグリーンオリーブの塩漬けによる B 型ボツリヌス食中毒事例 (1)－臨床、病原微生物検出情報、21 (3)、4-5 (2000)
- 門間千枝ほか：東京都内で発生したグリーンオリーブの塩漬けによる B 型ボツリヌス食中毒事例 (2)－検査結果、病原微生物検出情報、21 (3)、5 (2000)

(平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金研究事業「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」分担研究報告書より)

【菌の性状】

a) 定義・分類

偏性嫌気性グラム陽性の桿菌 (0.8-1.2 x 4-6 μm) で、耐熱性芽胞を形成する。菌は産生する毒素の抗原性の違いにより A から G 型の 8 型に分類されている。古くから C 型と D 型毒素間交差反応があり、これは C、D 各型菌が免疫学的に異なる複数の毒素因子を産生することによると考えられていた。しかし、この交差反応は C、D 型毒素間に存在する共通抗原部位に由来することが明らかになっている。同様に E、F 型毒素間でも交差反応があることが指摘されている。ほとんどの全ての菌株は 1 種類の型の毒素を産生する。しかし、土壌、食中毒、乳児ボツリヌス症などの検体から例外的に 2 種類の毒素を産生する菌が分離されている。

b) 生化学的性状

ボツリヌス菌は生化学的な性状により 4 群に分類することができるが、毒素型による分類とは一致しない。第 I 群菌には全ての A 型菌とタンパク分解性 B、F 型菌が属し、最も耐熱性の高い芽胞を形成する。第 I 群の株と *C. sporogenes* とは毒素産生以外の性状で区別することができない。第 II 群菌には全ての E 型菌と蛋白非分解性の B、F 型菌が属している。発育至適温度は最も低く、形成する芽胞の耐熱性も最も低い。蛋白分解酵素の産生能を欠くため、毒素は毒性の低い、いわゆる「前駆体」の形で産生されるため毒素活性の測定にはトリプシンによる活性化が必要である。第 III 群菌には C、D 型菌が属している。この群に属する菌の芽胞の耐熱性は第 I 群菌と第 II 群菌の中間の値を示す。菌の増殖に対する酸素許容量は低く、他の群の菌と比べて高い嫌気条件を要求する。*C. novyi* が極めて類似した性状を示す。第 IV 群菌として G 型菌のみが属している。他の群とは異なり糖非分解性でリパーゼを産生しない。第 III 群菌と同様酸素に対する耐性が低い。G 型菌は芽胞形成能が低く、また形成された芽胞の大部分は易熱性で一部の芽胞のみが耐熱性を獲得している。最近 G 型菌と遺伝学的に相同性のある菌群に対して *C. argentinense* の名称が提案された。この種には *C. subterminale* と *C. hastiforme* の毒素非産生菌が含まれる。欧米および最近東京で発生した乳児ボツリヌス症から分離された菌の中で、ある種の *C. butyricum*、*C. barati* がそれぞれ E、F 型と非常に類似した毒素を産生することが明らかになっている。

単に分類学上の視点からでは、ボツリヌス菌の分類は不完全であるが、現在の分類は医学細菌学の研究者の利便や分類学上の混乱を避けるため残されている。

c) 分布・生態

芽胞は土壌、河川、湖沼、海岸地帯の堆積物、泥あるいは動物、鳥類の消化管内や魚類、甲殻類のえらなどから分離される。野生動物や鳥類の死体には通常多数の菌が存在し感染源になっている。温帯地方では時にはこのような死体の中で毒素が産生され、死体を摂取した動物で散発的にボツリヌス症が発生し、また腐肉を食べる習性のある動物では大規模な発生も見られる。

蛋白分解性の第Ⅰ群菌は比較的雨量の少ない地域から分離される。アメリカではA型菌とB型菌に地理的分布に特徴が見られる。A型菌はロッキー山脈より西側でよく検出され、B型菌はミシシッピ川から東部かけて分布している。土壌も菌の分布に影響を与え、A型菌は有機物の少ない中性からアルカリ性の土壌から、B型菌は有機物が比較的多い、酸性の土壌からよく分離される。ヨーロッパではA型菌の分布は非常に低い。B型菌はスイス、イタリアの土壌に第Ⅱ群菌に属する蛋白非分解性菌と混在しながら分布している。その他、ブラジル、アルゼンチン、ロシア、中国、台湾でA、B型菌、オーストラリア、ケニアでA型菌の存在が確認されている。我が国では秋田県下の土壌調査で低頻度ながらA型菌が検出されている。

第Ⅱ群菌は比較的水分および有機物の多い地域に分布している。最も分布調査が行われているE型菌はアメリカ、ヨーロッパ、ロシアなど北半球各地の海岸、湖沼に存在しているが、南半球のブラジル、アルゼンチン、オーストラリア、ニュージーランドでは検出されていない。我が国では食中毒の発生が多い北海道、東北地方の沿岸、湖沼から高頻度に検出されている。第Ⅱ群菌（B、E型菌）は他の群菌と比べ塩濃度に影響を受けやすく、海水の塩濃度（3.5%）条件下ではほとんど発育しないと思われる。このことは湖沼、河川、汽水域で菌の検出率が高いことを示唆している。

第Ⅲ群菌は淡水中の土壌や堆積物中で増殖すると考えられている。菌は気温の高い地域により分布している傾向がある。アメリカでは検出頻度は低いが、C型菌が南部の酸性土壌からD型菌が西部のアルカリ性土壌から検出された。オランダでは野生カモのボツリヌス症が発生した貯水池からC型菌が高頻度に検出されている。インドネシア、タイ、台湾、バングラディッシュ、ブラジルでC、D型菌の両方、あるいはC型菌が検出されている。

第Ⅲ群菌の増殖は他の細菌（*Bacillus* 属菌など）に影響を受けやすく、実際イギリス、フランス、スペインの土壌中にC型菌の芽胞を接種後、検査しても毒素は検出されなかった。我が国では石川県下の湖の調査でC型菌が検出されている。また日本海沿岸、九州北部、瀬戸内海にもC型菌が分布している。

第Ⅳ群菌に属するG型菌はアルゼンチンとスイスの土壌から検出されている。