

ボツリヌス菌接種試験法（案）

第1 試験法

ボツリヌス菌接種試験は以下の手順に従って行う。

1 供試菌株

ボツリヌスA型菌及びたんぱく分解性B型菌を用いる。なお、菌株は5株以上とし、A型菌として62A株を、B型菌として213B株を含むものとする。また、A型菌として97A株及びRenkon株、B型菌としてOkra株（Lamanna株）を含むことが望ましい。

2 毒素の力価測定

すべての供試菌株は、産生する毒素の力価が1,000MLD(Minimal Lethal Dose：2匹以上のマウスに接種し、全てが死亡する量)/ml以上であることを確認する。

3 芽胞調製

供試菌株毎に、以下の手順により芽胞の調製を行う。

- (1) 供試菌株の保存培養液を芽胞産生用培地に接種し、35～37° で1日間培養する。
- (2) (1)の培養液を再度、芽胞産生用培地に接種し、80° で20分間加熱処理した後、35～37° で培養する。この培養操作を3回繰り返し、顕微鏡下で芽胞形成を確認する。培養期間については、菌株、使用する培地等により異なるので、適宜培養液を抽出して顕微鏡で観察し、芽胞の形成を確認した上で決定する。
- (3) 芽胞が十分に形成されたならば、その培養液1mlを80° で20分間加熱処理し、500～1,000mlの芽胞産生培地に接種して35～37° で培養する。
- (4) 芽胞形成が確認されたならば、(3)の培養液を遠心分離して芽胞を採取し、滅菌蒸留水で3回以上遠心分離による洗浄を行い、再度、適量の滅菌蒸留水を加えて均等な芽胞浮遊液とする。芽胞浮遊液については小分けし、-20° 以下で保存する。
- (5) (4)については、その一部を採取して80° で20分間加熱し、10倍段階希釈後、各希釈液の一定量を芽胞測定用培地に接種して芽胞数を算定する。

4 接種

供試菌株の食品への接種は、以下の手順により行う。

- (1) 各芽胞浮遊液を混合して均一な芽胞懸濁液を作製する（以下、「接種用芽胞懸濁液」という。）。接種用芽胞懸濁液の芽胞数については、1ml当たり 10^7 個を目安とする。
- (2) (1)で作製した接種用芽胞懸濁液を、供試食品1g当たりの芽胞数が 10^2 ～ 10^3 個となるように接種した後に、80° で20分間加熱処理する（以下、

「検体」という。)

なお、ガス封入包装等の特殊な包装が施された供試食品については、供試食品の包装状態（酸素、二酸化炭素、窒素等のガス分圧）を再現するまでの間は8～10° に保ち、その後に80° で20分間加熱処理することとする。

5 恒温放置

検体を恒温下で放置する。なお、恒温放置温度は30° とし、放置期間は供試食品の品質保持期限の1.5倍とする。

6 検査実施時期及び検体数

検査は、接種直後、ガスの産生が確認された時点、品質保持期間終了時及び品質保持期間の1.5倍を経過したときの合計4回以上の時期において実施する。検体数については、芽胞を接種して保存試験を行う場合に5検体、その他については3検体以上とする（表1参照）。

7 毒素検出検査

毒素検出検査は、以下の手順により行う。

- (1) 検体に等量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカーで十分に混和した後、その上澄み液を採取し、これを滅菌ペプトン加生理食塩水で5倍に希釈する。これを10° 以下で15分間遠心分離し、上清を毒素検出用試料とする。
- (2) 毒素検出用試料の0.5 ml ずつを1群2匹以上のマウスの腹腔内に注射し、その生死を4日間観察する。必要に応じて、毒素検出用試料については、毒素の力価測定及び中和試験を行う。

8 その他の検査項目

「7」の毒素検出検査の他に以下の項目について検査を行う。

(1) 芽胞非接種の検体

開封操作を行わない検体については、保存開始時に、水分活性、pH、一般生菌数及び嫌気性生菌数（35° で2～5日間培養）の測定を行い、品質保持期限終了時に pH、一般生菌数及びクロストリジウム属菌数を測定する。

開封後芽胞を接種せずに密封する検体については、保存開始時に、一般生菌数及びクロストリジウム属菌数、品質保持期限終了時に pH、一般生菌数及びクロストリジウム属菌数を測定する。

(2) 芽胞接種の検体

開封後芽胞を接種した検体については、保存前に pH、一般生菌数及びクロストリジウム属菌数を測定する。

第2 判定

保存試験において、すべての検体からボツリヌス毒素が検出されない場合は、当該食品はボツリヌス菌による食中毒発生のおそれがないものとみなす。

第3 留意事項

- 1 ボツリヌス菌接種試験を実施するに当たっては所期の目的が達せられるよう接種試験法の詳細を設定し、接種試験法自体の科学的な妥当性を確保できるように努めること。
- 2 当該試験は、食品自体の特性からボツリヌス毒素が産生されないことを確認するための試験法である。実施に当たっては、供試食品の理化学的性状（pH 及び水分活性等）について十分な確認を行い、通常の製造において考えられる最高の pH 及び水分活性を有する食品を供試食品とすること。

表1：ボツリヌス菌芽胞接種試験の内訳

検体処理					試験結果				
区分	処理内容	検体数	項目	保存日数	pH	水分活性	一般生菌数 (cfu/g)	クロストリジウム属菌数 (cfu/g)	ガス産生
A	無処理	3	理化学	0日	○	○			
B	無処理	3	細菌 ¹⁾	0日			○	○	○
C	無処理	3	保存 ²⁾	*	○		○	○	○
D	開封後芽胞非接種	3	細菌 ³⁾	0日	○		○	○	
E	開封後芽胞非接種	3	保存 ⁴⁾	*	○		○	○	○
F	開封後芽胞接種	3	細菌 ⁵⁾	0日	○		○	○	
G	開封後芽胞接種	5	保存 ⁶⁾	*	○		○	○	○

(注1) 1)～6)

1) 細菌試験陰性対照、2) 保存試験陰性対照、3) 開封操作確認試験、4) 開封操作後の保存試験陰性対照、5) 初発芽胞数の測定、6) 保存試験本試験

(注2) 「*」は、ガス産生が確認された日、品質保持期限、品質保持期限の1.5倍に相当する日

(注3) 「○」は、該当する試験

アルミレスパウチの遮光性及び気体透過性評価検討会概要

社団法人日本缶詰協会

1. 目的

容器包装詰加圧加熱殺菌食品の容器に関する規格基準において容器の性能として求められている遮光性及び気体透過性と油脂の酸化の関係について科学的基礎データを集積する。

2. 検討会委員

氏名	所属	
武士甲一	北海道衛生研究所 微生物部主任研究員	学識経験者
島崎弘幸	帝京大学医学部第一生化学助教授	〃
岡本英文	ハウス食品株式会社ソマテックセンター部長	食品メーカー
倉岡義博	ヤマモリ株式会社品質保証部部長	〃
正井慎悟	アヲハタ株式会社生産技術部マネージャー	〃
速水 宏	大塚食品株式会社徳島食品研究所第一研究室長	〃
石川 始	凸版印刷株式会社研究開発本部第一部部長	容器メーカー
佐々木 昭	藤森工業株式会社研究所営業技術主席マネージャー	〃
野田 博	東洋製罐株式会社品質管理部品質管理第二課係長	〃
三田浩三	大日本印刷株式会社包装研究所リーダー	〃
土橋芳和	社団法人日本缶詰協会技術部課長	事務局

3. 試験概要

- 1) 供試試料 内容物 食品モデル（大豆油）、食品（ツナ油漬、コンビーフ）
 包材 無機蒸着フィルム(PET/NY/PP)、
 EVOH 積層フィルム(PET/EVOH/PP)、
 アルミ箔積層フィルム(PET/Al/PP)、
 透明フィルム(PET/NY/PP)

	アルミ箔	無機蒸着	EVOH	透明
酸素透過度 (cc/m ² ・day・atm)	0.01 以下	0.62	1.8	69.16
水蒸気透過度 (g/m ² ・day)	0.02	1.42	5.4	7.03

2) 試料製造日 平成 14 年 9 月 27 日

3) 殺菌条件

大豆油	殺菌温度	120℃、	殺菌時間	10 分、	F ₀ 値	5.8 分
ツナ油漬	殺菌温度	121℃、	殺菌時間	17 分、	F ₀ 値	9.0 分
コンビーフ	殺菌温度	118℃、	殺菌時間	20 分、	F ₀ 値	6.5 分

4) 試験項目 油価特数（酸価、過酸化物価）、官能評価、フィルムバリアー性

5) 貯蔵期間 12 ヶ月（測定区 直後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、12 ヶ月後）

6) 保管場所 常温暗所、常温明所、恒温暗所（35℃）

7) 試験機関 油脂特数；（財）食品環境検査協会
官能評価；日本缶詰協会 研究所
バリアー性；容器メーカー各社

4. 試験結果

最終試験期日（12 ヶ月貯蔵区）；平成 15 年 10 月中旬を予定

食発第 0521001 号
平成 14 年 5 月 21 日

各
〔 都道府県知事
政令市長
特別区長 〕 殿

厚生労働省医薬局食品保健部長

小麦のデオキシニバレノールに係る暫定的な基準値の設定について

デオキシニバレノールは赤かび病菌として知られるフザリウム属真菌が産生するかび毒です。昨年開催された F A O / W H O 合同食品添加物専門家会議において、デオキシニバレノールに関する安全性評価が行われ、現在、F A O / W H O 合同食品規格計画（コーデックス委員会）の食品添加物・汚染物質部会においてデオキシニバレノールを含有する食品のリスク管理について検討が行われているところです。

今般、平成 13 年度厚生科学研究の結果として、一部の小麦が比較的高濃度にデオキシニバレノールに汚染されていることが報告され、平成 14 年 5 月 14 日に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格・毒性合同部会において審議が行われた結果、今回の報告内容から、我が国における小麦のデオキシニバレノールによる汚染が直ちに人の健康に影響を及ぼすことは考え難いが、デオキシニバレノールの摂取による健康リスクを低減し、健康危害を未然に防止する観点から食品衛生法第 7 条に基づく規格基準の設定に向けた検討が必要であるとされ、規格基準の設定までの間、小麦に含有するデオキシニバレノールについて行政上の指導指針となる暫定的な基準値を設定すべきとの結論が得られたところです。

これを踏まえ、小麦に含有するデオキシニバレノールについての行政上の指導指針として暫定的な基準値を下記のとおりとしたので、貴管下関係者に対する指導方よろしくお願いします。

なお、平成 13 年度厚生科学特別研究報告書概要を別紙 1 により取りまとめたので、参考として下さい。

記

1 暫定的な基準値

小麦に含有するデオキシニバレノールの暫定的な基準値は、1.1ppmとする。
本基準値は、FAO/WHO合同食品添加物専門家会合で定められた暫定的最大1日耐容摂取量及び国民栄養調査による小麦類の1人当たり1日摂取量に基づき、小麦から小麦粉へのデオキシニバレノールの減衰を考慮し、現時点で活用し得る限りの科学的知見に基づいて定められたものです。

2 試験方法

試験方法は、原則として、定性及び定量試験を紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフィー、水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフィー、又は電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフィーにより行い、確認試験を液体クロマトグラフ・質量分析又はガスクロマトグラフ・質量分析により行うものとします。なお、試験法の詳細については別紙2を参照して下さい。

3 暫定的な基準値の運用について

- (1) 本基準値は、市場に流通する小麦の安全性を確保するための行政上の指針として定めたものであり、暫定的な基準値を超える小麦が市場に流通しないよう効果的な運用をお願いします。
- (2) 検査の結果、暫定的な基準値を超えるものを発見した場合は、農林関係部局とも密接な連携を図りながら、販売の自主規制等の適切な指導を行うものとします。
- (3) 規格基準設定に当たっての基礎データとするため、検査結果については集計の上、平成14年12月下旬目途に当職あて別紙3の様式により報告をお願いします。

(別紙1)

平成13年度厚生科学特別研究報告書(概要)

1 麦類のデオキシニバレノール(DON)の汚染実態

- (1) 国産小麦: サンプル数36、DON値0~2,248ppb(平均388ppb)
- (2) 輸入小麦: サンプル数20、DON値0~740ppb(平均100ppb)
- (3) 大麦: サンプル数3、DON値2~20ppb(平均9ppb)
- (4) はだか麦: サンプル数22、DON値0~46ppb(平均6ppb)

2 考察

- (1) 本研究で認められたレベルの小麦の汚染によって直ちに人の健康障害が招来されることは考え難い。
- (2) 今後、小麦についてDON摂取による健康危害を未然に防止するための対策を検討する必要があるものと考えられる。
- (3) 小麦について経年的な汚染実態調査、小麦の加工過程に伴う減衰に関する研究等が必要。

(参考)

○デオキシニバレノール(DON)

- ・ 主にフザリウム属真菌が産生するかび毒であり、穀類(麦類、米、トウモロコシ等)を汚染する。
- ・ 麦の開花期から乳熟期と梅雨等の湿潤な気候が重なると赤カビ病として麦を汚染する。
- ・ 人においては悪心、嘔吐、下痢等の消化器症状が、マウスへの投与実験では胸腺、脾臓、心臓、肝臓への影響が報告されている。
- ・ 熱安定性が高く、通常の調理過程では減毒されない。

(別紙2)

デオキシニバレノール試験法

1 装置

定性及び定量試験として紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ、水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ又は電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフを用い、確認試験として液体クロマトグラフ・質量分析計又はガスクロマトグラフ・質量分析計を用いる。

2 試薬・試液

次に示すもの以外は、第1食品の部D各条の項の○穀類、豆類、果実、野菜、種実類、茶及びホップの2穀類、豆類、果実、野菜、種実類、茶及びホップの成分規格の試験法の目の(2)試薬・試液に示すものを用いる。

多機能ミニカラム^{註1)}

内径12~13mmのポリエチレン製のカラム管に、多機能カラム充てん剤(逆相樹脂、イオン交換樹脂、活性炭)約2.5gを充てんしたもの又はこれと同等の性能を有するものを用いる。

トリメチルシリル化剤

酢酸エチル9mlにトリメチルシリルイミダゾール1ml及びトリメチルクロロシラン0.2mlを加え、混和する。用時調製する。

3 標準品

デオキシニバレノール 本品はデオキシニバレノール98%以上を含む。

融点 本品の融点は151~153°である。

標準溶液 本品をアセトニトリル又はメタノールを加えて溶かし、調製する。

4 試験溶液の調製

a 抽出法

検体を420µmの標準網ふるいを通るように粉碎した後、その50.0gを量り採り、500mlの共栓付き三角フラスコに移す。これにアセトニトリル及び水の混液(85:15)200mlを加え、振とう機を用いて30分間激しく振り混ぜた後、10分間超音波処理を行う。

これを、ケイソウ土を1cmの厚さに敷いたろ紙を用いてすり合わせ減圧濃縮器中に吸引ろ過する。次いで、アセトニトリル及び水の混液(85:15)約10mlを用いて共栓付き三角フラスコを洗い、その洗液でろ紙上の残留物を洗う操作を2回繰り返す。両洗液を上記の減圧濃縮器中に合わせ、ろ液を

250ml 共栓付きメスシリンダーに移した後、アセトニトリル及び水の混液 (85 : 15) を加え、250ml とする。

b 精製法

多機能ミニカラムに a 抽出法で得られた溶液 10ml を注入し、毎分 1 ml 以下の流速で流出させる。デオキシニバレノールが流出する分画^{註2)} の 5ml をすり合わせ減圧濃縮器、又は共栓付き試験管に採り、45°C以下で溶媒を除去する。

次いで、高速液体クロマトグラフィー用試験溶液にあつては、上記の残留物にアセトニトリル、水及びメタノールの混液 (5 : 90 : 5) 1ml を加えて溶かした後、10,000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液を試験溶液とする。

ガスクロマトグラフィー用試験溶液にあつては、上記の残留物にトリメチルシリル化剤 0.5ml を加え、栓をして攪拌し、30 秒間超音波処理した後、室温で 30 分間放置する。この反応溶液に酢酸エチルを加え、正確に 2ml として、これを試験溶液とする。

5 操作法

a 定性試験

- ① 紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて試験を行う場合

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル (粒径 5 μm) を用いる。

カラム管 内径 4~4.6mm、長さ 250mm のステンレス管を用いる。

カラム温度 40°

検出器 波長 220nm で操作する。

移動相 アセトニトリル、水及びメタノールの混液 (5 : 90 : 5) を用い、デオキシニバレノールが約 15 分で流出する流速に調整する。

- ② 水素炎イオン化検出器又は電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフを用いて試験を行う場合

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品について 4 試験溶液の調製のガスクロマトグラフィー用試験溶液と同様に操作して得られたものと一致しなければならない。

操作条件

カラム 内径 0.25~0.53mm、長さ 30m のケイ酸ガラス製の細管に、ガスクロマトグラフィー用 5% フェニルーメチルシリコンを 0.25~1.5 μm の

厚さでコーティングしたもの。

カラム温度 80° で1分間保持し、その後毎分 20° で昇温する。200° に到達後、毎分 5° で昇温し、280° に到達後 10分間保持する。

試験溶液注入口温度 280°

注入方式 スプリットレス

検出器 290° で操作する。

ガス流量 キャリヤーガスとしてヘリウムを用いる。デオキシニバレノールのトリメチルシリル化体が約 20分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

① 紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフを用いて試験を行う場合

a 定性試験①と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

② 水素炎イオン化検出器又は電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフを用いて試験を行う場合

a 定性試験②と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

c 確認試験

① 高速液体クロマトグラフ・質量分析計を用いて試験を行う場合

a 定性試験①と同様の操作条件で液体クロマトグラフ・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じてピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

② ガスクロマトグラフ・質量分析計を用いて試験を行う場合

a 定性試験②と同様の操作条件でガスクロマトグラフ・質量分析を行う。試験結果は標準品について4 試験溶液の調製のガスクロマトグラフ用試験溶液と同様に操作して得られたものと一致しなければならない。また、必要に応じて、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

注1) MultiSep #227 (Romer Labs, Inc. 社製)などが使用できる。

注2) MultiSep #227 (Romer Labs, Inc. 社製)を使用する場合は、最初の流出液 3ml は捨て、次いで流出する 5ml を採取する。なお、流出するパターンは使用するカラムによって異なるので、標準品を用いて事前に適切な流出分面を確認する。

農林水産省におけるデオキシニバレノールに係る取組みについて

平成15年6月19日
農 林 水 産 省

農林水産省においては、昨年5月の小麦に係るデオキシニバレノール（DON）の暫定的な基準値の設定を踏まえ、暫定的な基準値を上回るDONを含む小麦が生産及び流通されないよう、以下の対策を講じている。

1 国内産麦

- 1) 赤かび病の発生自体を抑制するために、適期防除の徹底及び赤かび病抵抗性品種の作付を行うよう指導するとともに、赤かび病被害を受けた麦と健全な麦との仕分けの徹底等生産現場における対策の強化
- 2) 赤かび粒の混入防止の強化を図る観点から、農産物検査法に基づく検査規格を改正（食用麦の赤かび粒の混入限度を1.0%から0.0%に変更。平成15年産麦から適用）
- 3) 自主的な分析の実施により、暫定的な基準値を上回る小麦が市場に出回らないよう生産者団体等を指導（平成14年産小麦については生産者団体等において約2400点分析を実施）
- 4) DONのリスク管理の検討の基礎となる国内産麦のDONの実態調査を実施（平成14年産麦に引き続き、平成15年産麦についても実施予定）

2 輸入小麦

- 1) 輸出国の公的検査機関により、赤かび粒の混入が0.0%以下でDONの濃度が暫定的な基準値以下であることの証明を受けた小麦を買い付け
- 2) 輸入に際して小麦を輸送する船（ロット）ごとにロットを代表するサンプルによりDONの検査を行い、暫定的な基準値を超えたものの輸入を防止

3 研究開発

中長期的な取組として、赤かび病抵抗性品種の開発、簡易な分析技術や効果の高い防除技術等の研究開発を推進