

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒リスク評価 におけるボツリヌス菌芽胞接種培養試験

石村 勝之 萱島 隆之 毛利 好江 橋渡 佳子
山本美和子 佐々木敏之 河本 秀一 平崎 和孝
荻野 武雄

最近のボツリヌス食中毒事例の発生形態から、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の構築が重要な課題となっている。厚生科学研究における分担研究として容器包装詰食品3品目(L(魚照焼), M(汁の具), N(炒めの素))のボツリヌス菌芽胞接種による発芽・増殖性および毒素産生性の評価を行った。1品目あたり5試料にA型およびB型ボツリヌス菌芽胞混合液を 10^4 /gレベルで接種・再密封し、30で培養した結果、食品L(pH6.0, 水分活性(Aw)0.97)は、約10日で5試料ともガス膨張を認められた。そのボツリヌス菌数は $10^7 \sim 10^8$ /gを示し、A・B型両毒素の産生が認められた。食品M(pH6.1, Aw0.98以上)は24日後(1試料)、約60日後(2試料)にガス膨張がみられ、ボツリヌス菌数は 10^7 /g $\sim 10^8$ /g、A型毒素の産生も認められたが、2試料は90日後もガス膨張、ボツリヌス菌の増殖等の変化は認められなかった。一方、食品N(pH5.5, Aw0.96)は、11日後(1試料)および18・20日後(4試料)にガス膨張が認められた。11日後の膨張品は、ボツリヌス菌数 10^8 /gを示し、A型毒素の産生が認められた。一方、18・20日後膨張品もA型あるいはA・B型毒素が認められたが、それらのボツリヌス菌数は 10^4 /gであった。

以上の結果、今回検討した3品目は、ガス膨張に必要とする日数、ボツリヌス菌数、ならびに毒素産生性および産生毒素型に差がみられたが、いずれも芽胞が残存し、増殖可能温度に保存された場合、ボツリヌス毒素の産生が可能な食品と考えられた。

キーワード： ボツリヌス菌食中毒 容器包装詰低酸性食品
リスクアセスメント

はじめに

近年の食品嗜好の多様化、生活様式の変遷、原材料を含む食品の輸入の拡大などにより、多種・多様の製品が製造・販売されている¹⁾。その中には、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が増加しているが、気密性を有する容器包装詰形態で、そのpHが4.6を超え、かつ、水分活性が0.94を超える物理的条件を有することから、ボツリヌス菌の増殖が可能と考えられる食品が流通していることが危惧されている。

本邦では、平成11年には千葉県内でボツリヌス食中毒が発生し、その原因食品として気密性を有する容器包装詰の要冷蔵品が疑われたため、厚生

労働省は関連する当該要冷蔵食品の衛生管理の徹底を通知し、注意を喚起した(衛食第120号)。

このような状況から、市販されている各種の容器包装詰低酸性食品についてボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行い、適切な対策に結びつけることは、我が国の食品衛生の確保、向上の観点から極めて重要となっている。

今回は、厚生労働科学研究の分担研究の一環として、容器包装詰食品の製造法として、容器包装内をガス置換後、加熱処理を行い製造された食品を主対象にボツリヌス菌芽胞の接種試験により増殖性および毒素産生性を評価することを目的とし、検討を行った。

表 1 供試試料

食品記号	製品	容器	総重量 (g)
L	魚照焼	透明パウチ(平袋)	117~141
	(2 切入)		
M	汁の具	アルミパウチ(平袋)	42~46
	(33g)		
N	炒めの素	アルミパウチ(平袋)	108~116
	(100g)		

方 法

1 供試試料

製造者より購入した容器包装詰食品3品目(L(魚照焼), M(汁の具), N(炒めの素)各23検体計69検体)を用いた(表1)。各検体には食品品目ごとにNo. 1~No. 23まで番号を付し、後述の処理内容および試験に供した。

2 試料の水分活性(Aw)およびpH測定

食品L, M, Nの未開封・非加熱検体各3検体(No. 1~No. 3)についてAwおよびpHを測定した。

Awは水分活性測定装置(ロトロニック製HYGRO-LAB), pHはpHメーター(東亜電波工業製, HM-50V)を用い測定した。ただし, pHの測定は, 液汁のある食品(食品M, N)はそのまま, 液汁のない食品(食品L)は等量の蒸留水を加え, 固形を潰したのち測定した。

3 ボツリヌス菌芽胞添加試料の作製および分析

(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。

(2) 芽胞液の調製

a 芽胞液の初発芽胞数測定

供試菌株の芽胞液は北海道立衛生研究所武士甲一博士より提供された。各芽胞液の芽胞数の測定を以下の方法で行った。芽胞液 0.5ml を滅菌 0.1%ペプトン水 4.5ml に接種し, これを 80℃, 20分加熱処理した。この液をさらに同ペプトン水(9ml入り)で10倍段階希釈した。滅菌アナエロビック・パウチ2枚のそれぞれに, 55℃に保温しておいたクロシトリジア測定用培地(CCA, 日水製薬製)10mlを取り, 各希釈段階液1mlずつを加えてよく混和した後, 平板に固化した。これらは30℃, 7日間培養し, 黒色集落を数え, 初発芽胞数とした。

b 接種用芽胞液の調製

供試試料への接種用芽胞液は各供試菌株の芽胞液を混合し用いた。すなわち, 供試菌株芽胞液の芽胞数が, 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 $7.3 \times 10^5 \sim 9.4 \times 10^5$ CFU/20μl 添加用芽胞液とした。

4 保存試験

ボツリヌス芽胞接種試料および未接種試料の保存試験のフローを図1に示した。以下に記した加熱処理済み試料の作製は缶詰協会研究所において行い, 作製された3品目計24検体は直ちに広島

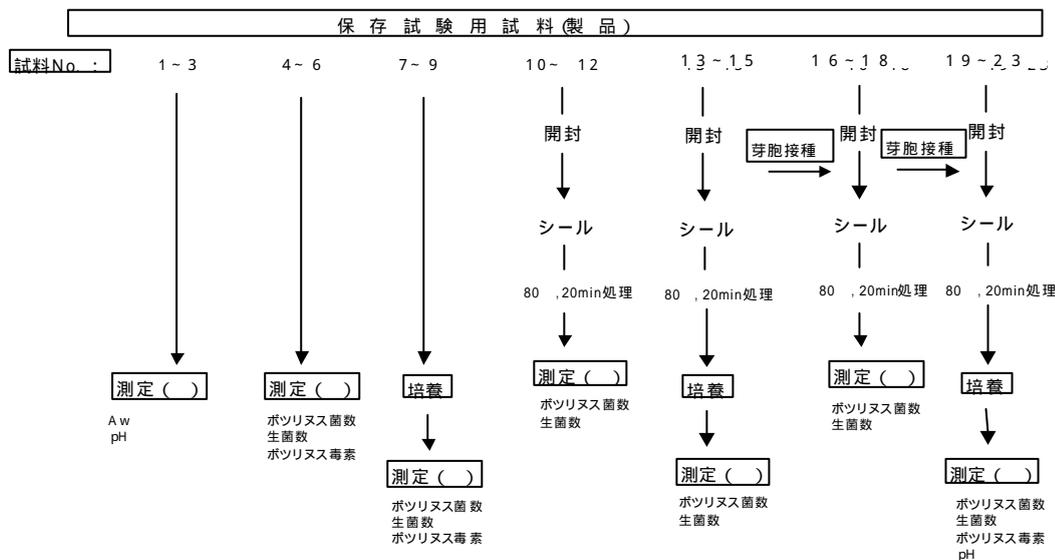


図 1 接種保存試験フロー

市衛生研究所に郵送し、他の検査区分検体とともに保存試験に供した。

詳細は下記の方法により行った。

(1) 接種試料および対照試料の作製

1品目あたり試料 14 袋の外側をアルコールでよく拭き、シール部（食品製造者側）を切り取りこの部分から接種芽胞液 20 μ l を 8 袋に接種し、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。接種には、滅菌済注射器（テルモ製、ツベルクリン用、1ml、針を長さ 150mm のものに交換）を装着した分注器（Indicon 社、TRIDAK Division 製、STEPPER）を用いた。

試料への接種時には、接種用芽胞液 20 μ l 中の初発芽胞数を以下のように測定した。すなわち、試料 2~4 品目毎、16~32 検体）への接種中に無作為に 3 回、それぞれ滅菌蒸留水 10ml 入りの試験管に 20 μ l 接種した。これを加熱処理に供した。

(2) 加熱処理

食品品目ごとに無接種対照試料 6 検体 (No. 10~15 および接種試料 8 検体 (No. 16~23)) 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、あらかじめ供試試料の熱伝達を記録式温度計（エラブ社製、CMC-821 型）で測定し、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。

(3) 加熱処理直後の試料分析

a 検液の調製

加熱処理済み試料 (No. 6~8) 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、等重量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカーで混和し、これを検液（検体の 2 倍希釈液）とした。

b 一般生菌数の測定

上記検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加え、よく混和した（検体の 10 倍希釈液）。この液 1ml ずつを 2 枚のペトリ皿にとり、SA 適量を加え、よく混和後、平板に固化した。さらに同培地を重層し、固化、乾燥後、35℃、48 時間培養した。

c ボツリヌス菌数の測定

上記検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加え、よく混和した（検体の 10 倍希釈液）。さらに、滅菌 0.1% ペプトン水（9ml 入り）を用いて、10 倍段階希釈し、滅菌アナエロビック・パウチのそれぞれに、加熱溶解し、55℃に保温しておいた CCA

10ml をとり、10 倍希釈液 1ml を加え、よく混和した後、平板に固化した。各希釈段階に 2 枚のアナエロビック・パウチを用いた。これらは 30℃、7 日間培養し、黒色集落を数え、結果を“CFU/g”で示した。

d pH 測定

検液の pH は、pH メーター（東亜電工業製、HM-50V）を用い測定した。

(4) ボツリヌス菌芽胞接種試料の保存試験

a 保存試験試料

缶詰協会研究所から搬送した加熱処理済試料 24 検体（食品 L, M, N 各 8 検体 (No. 1~No. 8)）および非加熱処理検体 18 検体（1 品目各 6 検体 (No. 12~No. 14, No. 18~No. 20)）を供試した。

b 保存培養方法

保存試験開始時に非加熱処理の未開封試料 9 検体（1 品目各 3 検体 (No. 6~No. 8)）を下記方法によりボツリヌス菌数、一般生菌数、およびマウス毒性の検査項目で試験に供した。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、個別に滅菌ストマッカー袋に入れ、シール後、30℃の孵卵器（冷凍機付インキュベータ（サンヨー、MIR553）内）で保存培養した。保存期間中に容器がガス発生により膨張した試料は、4℃の冷蔵庫に保管し、検査に供した。

c 芽胞非接種試料の試験法

(a) 一般生菌数の測定

食品全量をストマフィルターに入れ、滅菌蒸留水で 2 倍に希釈し、1 分間ストマッキングしたものを試料原液とした。試料原液 20 ml にペプトン加食塩水を 80 ml 加え 10 倍希釈液を作成した後、ペプトン加食塩水 9 ml で 10 倍段階希釈した。希釈した試料液各 1 ml を 2 枚の滅菌シャーレに入れ、標準寒天培地 15 ml で混和し、培地が固化した後、同培地を重層して乾燥させ、35 \pm 1.0℃で 48 \pm 3 時間培養した後、コロニー数を計数し生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水 1 ml ずつを 2 枚ずつの滅菌シャーレに培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。培地の陰性対照も同様に作製した。

(b) ボツリヌス菌数の測定

一般生菌数の測定時に作成した 10 倍希釈の試料液を使用した。10 倍希釈液 10 ml を 2 枚の滅菌パウチに正確に採り、あらかじめ加温溶解し 50℃の温度に保持したクロストリジア寒天培地

(日水製菓製)約 15 ml をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却固化させた。35 ± 1.0 で 24 ± 2 時間培養した。必要があれば、30 で 5 日後まで観察した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水 10 ml を培地に混合し、試料の場合と同様に操作して培養した。培地対照も作製した。

(c) pH測定

pH メーター (HORIBA, F-23) を用い測定した。pH の測定は、(a)生菌数で作製した試料原液を用いた。

(d) 毒素の定性試験

試料原液は毒素試験に供するまで、-30 で保存した。解凍後、3000 rpm, 4 で 20 分間遠心分離し、上清を 0.5 ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。マウスの生死は 5 日間観察した。

5 芽胞接種試料の試験法

(1) 一般生菌数の測定

食品 No.1 ~ No.5 のうち、ガス膨張した食品および 90 日間外観変化の認められなかった食品は、無菌的に開封し、各試料全量をストマフィルターに移し換えた。それを滅菌蒸留水で 2 倍に希釈し、1 分間ストマッキングしたものを試料原液とした。試料原液 20 ml にペプトン加食塩水を 80 ml 加え 10 倍希釈液を作成した後、ペプトン加食塩水 9 ml で 10 倍階段希釈した。希釈した試料液各 1 ml を 2 枚の滅菌シャーレに入れ、標準寒天培地 15 ml で混釈した。培地が固化した後、同培地を重層して乾燥させ、35 ± 1.0 で 48 ± 3 時間培養した後、コロニー数を計数し生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水 1 ml ずつを 2 枚のシャーレに分注し、15ml ずつの培地と混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。培地対照も作製した。

(2) ボツリヌス菌数の測定

一般生菌数の測定時に作製した 10 倍階段希釈した試料液を使用した。適宜希釈した試料液各 1 ml を 2 枚の滅菌パウチに正確に採り、あらかじめ加温溶解し 50 の温度に保持した CCA 約 20 ml をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、固化させた。培地が凝固した後、35 で 24 ± 2 時間培養した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水 1 ml ずつを 2 枚のパウチに入れ、培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。培地対照も作製した。

(3) pH測定

pH の測定は(1)一般生菌数で作製した試料原液を用いた。

(4) ボツリヌス毒素・毒素型の定性試験

試料原液は毒素試験に供するまで、-20 で保存した。解凍後、3000 rpm, 4 で 20 分間遠心分離し、上清を 0.5 ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に注射した。マウスは 5 日間観察した。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抗 A 型抗毒素および抗 B 型抗毒素を用いて中和試験を行い、毒素型の確認を行った。試料はゼラチン緩衝液で、血清は滅菌生理食塩水で希釈した。

6 倫理面への配慮・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、広島市衛生研究所安全管理規程に基づいて実施した。芽胞接種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、0.1%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬し、実験後すみやかにオートクレーブ (121 , 30 分間) した後、廃棄した。

結 果

1 供試試料の Aw および pH

表 3, 4, 5 (No. 21 ~ 23) に供試試料の Aw および pH を示した。食品 L (魚照焼) は Aw 0.97, pH 6.0, 食品 M (汁の具) は Aw 0.98 以上, pH 6.1 ~ 6.2, 食品 N (炒めの素) は Aw 0.96, pH 5.4 ~ 5.5 であった。

2 熱伝達測定

供試試料の熱伝達測定結果より、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、食品 L (魚照焼) は 57 分、食品 M (汁の具) は 25 分、食品 N (炒めの素) は 32 分とした。

3 加熱処理直後試料の分析結果

加熱処理後の芽胞接種試料および無接種試料各 3 検体ずつの分析結果を表 7, 表 8 および表 9 の区分 A および E に示した。

好気性の一般生菌数 (細菌数) はいずれの試料からも検出されなかった。また、Clostridium 属細菌は無接種対照試料からは検出されなかったが、接種試料からは食品 L (魚照焼) が $3.0 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^4$ CFU/g, 食品 M (汁の具) が $1.3 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$ CFU/g, 食品 N (炒めの素) が $1.1 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^4$ CFU/g 検出された。このコロニーを以下ボツリヌス菌数として計数した。

4 保存試験結果

表2 食品L(魚照焼)のボツリヌス芽胞接種試験結果

区分	検体処理内訳				理化学・細菌試験結果						
	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
無処理		3	1	理化学試験	0日	NT	6.0	0.97	NT	NT	NT
			2				6.0	0.97			
			3				6.0	0.97			
無処理		3	4	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			5						10未満	10未満	陰性
			6						10未満	10未満	陰性
無処理		3	7	保存試験 (未開封)	90日		NT	NT	10未満	10未満	陰性
			8						10未満	10未満	陰性
			9						10未満	10未満	陰性
開封芽胞非接種		3	10	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	NT
			11						10未満	10未満	
			12						10未満	10未満	
開封芽胞非接種		3	13	保存試験 (開封)	90日	無 無 無	NT	NT	10未満	10未満	NT
			14						10未満	10未満	
			15						10未満	10未満	
開封芽胞接種		3	16	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	3.0×10 ⁴	NT
			17						10未満	3.6×10 ⁴	
			18						10未満	3.5×10 ⁴	
開封芽胞接種		5	19	細菌試験	10日	有	6.2	NT	10未満	2.3×10 ⁸	AB
			20		11日	有	6.2		10未満	2.5×10 ⁸	AB
			21		10日	有	6.3		10未満	1.3×10 ⁸	AB
			22		11日	有	6.1		10未満	1.4×10 ⁷	AB
			23		11日	有	6.1		10未満	1.2×10 ⁷	AB

SPC (一般生菌数), Clf (クロストリジア菌数), NT(実施せず)

表3 食品M(汁の具)のボツリヌス芽胞接種試験結果

区分	検体処理内訳				理化学・細菌試験結果						
	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
無処理		3	1	理化学試験	0日	NT	6.1	0.98以上	NT	NT	NT
			2				6.1	0.98以上			
			3				6.2	0.98以上			
無処理		3	4	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			5						10未満	10未満	陰性
			6						10未満	10未満	陰性
無処理		3	7	保存試験 (未開封)	90日		NT	NT	10未満	10未満	陰性
			8						10未満	10未満	陰性
			9						10未満	10未満	陰性
開封芽胞非接種		3	10	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	NT
			11						10未満	10未満	
			12						10未満	10未満	
開封芽胞非接種		3	13	保存試験 (開封)	90日	無 無 無	NT	NT	10未満	10未満	NT
			14						10未満	10未満	
			15						10未満	10未満	
開封芽胞接種		3	16	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1.3×10 ⁴	NT
			17						10未満	1.4×10 ⁴	
			18						10未満	1.3×10 ⁴	
開封芽胞接種		5	19	細菌試験	63日	有	5.8	NT	10未満	7.0×10 ⁸	A
			20		61日	有	6.2		10未満	4.9×10 ⁸	A
			21		90日	無	5.7		10未満	2.5×10 ³	陰性
			22		24日	有	6.4		10未満	5.8×10 ⁷	A
			23		90日	無	5.8		10未満	1.5×10 ³	陰性

SPC (一般生菌数), Clf (クロストリジア菌数), NT(実施せず)

(1) 食品L(魚照焼)の分析結果(表2)

食品L(魚照焼)の保存培養開始時の陰性確認試験結果は、生菌数およびボツリヌス菌数ともに10未満CFU/gであった(表2, 区分)。芽胞接種試

料は、培養10日および11日後に5検体すべてにガス発生による膨張が認められた。膨張品の生菌数はすべて10未満CFU/gであったが、ボツリヌス菌数は10⁷~10⁸CFU/gオーダーを示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5試料すべてA・B型両毒素の産生が認められた。培養後

の pH は 6.1~6.3 であった (表 2, 区分)。対照として行った芽胞未接種試料 (開封品および未開封品) は 90 日後まで膨張が認められなかった。その生菌数およびボツリヌス菌数は 10 未満 CFU/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった (表 2, 区分)。

(2) 食品 M (汁の具) の分析結果 (表 3)

食品 M (汁の具) の保存培養開始時の陰性確認試験結果は、生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10 未満 CFU/g であった (表 3, 区分)。芽胞接種試料では、培養 24 日後に 1 検体に膨張が認められた。この試料は生菌数 10 未満 CFU/g、ボツリヌス菌数 5.8×10^7 CFU/g を示し、A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その後、61 日および 63 日後に 2 検体が膨張し、生菌数 10 未満 CFU/g、ボツリヌス菌数 10^8 CFU/g、A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。残りの接種試料 2 検体は 90 日後まで膨張が認められず、生菌数 10 未満 CFU/g、ボツリヌス菌数 10^4 CFU/g、ボツリヌス毒素不検出であった (表 3, 区分)。対照品は 90 日後においても、生菌数、ボツリヌス菌数ともに 10 未満 CFU/g、ボツリヌス毒素不検出であった (表 3, 区分)。

(3) 食品 N (炒めの素) の分析結果 (表 4)

食品 N の保存培養開始時の陰性確認試験結果は、

培養 11 日後に 1 検体膨張が認められた。この試料は、生菌数 10 未満 CFU/g、ボツリヌス菌数 10^8 CFU/g を示し、A 型毒素の産生が認められた。一方、他の 4 検体は 18 日および 20 日後に膨張が認められ、A 型毒素 (3 試料) または A・B 型毒素 (1 試料) の産生が認められたが、これらの検体のボツリヌス菌数は 10^4 CFU/g を示し、最初の接種芽胞数と差異が認められなかった (表 4, 区分)。対照品については 90 日後まですべて膨張が認められず、生菌数、ボツリヌス菌数ともに <10 CFU/g、ボツリヌス毒素不検出であった (表 4, 区分)。

考 察

近年のわが国のボツリヌス関連事件および食中毒の発生をみると、平成 9 年 7 月に輸入オイスターソースからボツリヌス A 型菌が検出され、全国的なリコールが行われた事例、平成 10 年 8 月にはイタリア産オリーブ塩水漬けが原因食品と推定されたボツリヌス B 型菌による食中毒事例、そして平成 11 年 8 月にはハヤシライス (ルー) を推定原因食品とするボツリヌス A 型菌食中毒の発生など、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に置かれたためにボツリヌス菌が増殖した

表 4 食品 N (炒めの素) のボツリヌス芽胞接種試験結果

区分	検体処理内訳				理化学・細菌試験結果						
	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (cfu/g)	Clit (cfu/g)	毒素型
無処理		3	1	理化学試験	0日	NT	5.5	0.96	NT	NT	NT
			2				5.5	0.96			
			3				5.4	0.96			
無処理		3	4	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			5						10未満	10未満	陰性
			6						10未満	10未満	陰性
無処理		3	7	保存試験 (未開封)	90日		NT	NT	10未満	10未満	陰性
			8						10未満	10未満	陰性
			9						10未満	10未満	陰性
開封芽胞非接種		3	10	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	NT
			11						10未満	10未満	
			12						10未満	10未満	
開封芽胞非接種		3	13	保存試験 (開封)	90日	無 無 無	NT	NT	10未満	10未満	NT
			14						10未満	10未満	
			15						10未満	10未満	
開封芽胞接種		3	16	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1.1×10^4	NT
			17						10未満	1.3×10^4	
			18						10未満	1.3×10^4	
開封芽胞接種		5	19	細菌試験	20日	有	5.7	NT	10未満	2.3×10^4	A
			20		有	5.8	10未満		4.3×10^4	A	
			21		有	5.7	10未満		2.4×10^4	A	
			22		有	5.8	10未満		2.4×10^8	A	
			23		有	5.7	10未満		2.5×10^4	AB	

SPC (一般生菌数), Clit (クロストリジウム菌数), NT (実施せず)

生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10 未満 CFU/g であった (表 4, 区分)。芽胞接種試料では、

と考えられる食中毒事例やボツリヌス食中毒発生の要因となり得る食品の流通が明らかにされた事

例が注目された²⁾。このような状況下、わが国では、多種多様な輸入食品や国内製造食品が流通しているが、それらの食品の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こなかった。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、本菌食中毒の重篤性から考えて急務である。

今回検討した食品は、食味・風味・食感、色調を損なわない調理法としてその応用が拡大しつつある、ガス充填後加熱調理法により製造された食品群であり、今回、リスク評価が必要な食品のひとつとして取り上げられた。

接種試験方法は、できる限り製造品に近い状態で評価を行うため、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 $10^4/g$ を接種し、培養温度 30°C で評価した。その結果、接種した5試料すべてが比較的短い日数(約10日)でボツリヌス菌の増殖と毒素産生が認められた食品L(魚照焼)と、増殖までの期間に差がみられた食品M(汁の具)、食品N(炒めの素)に分けられた。

食品L(魚照焼)は魚肉(切り身)を照焼した後、加熱調理処理したものである。毒素型から考えて接種したA型およびB型両菌とも増殖・毒素産生が速やかになされたと考えられ、本品はボツリヌス菌増殖に適した食品(環境にある)と考えられた。一方、食品M(汁の具)は、野菜を主にした汁の素であるが、ボツリヌス菌の増殖を認めるまでに1ヶ月および2ヶ月を要した試料と試験期間である3ヵ月後も増殖がみられない試料があり、増殖が認められた試料もA型毒素のみが検出されるなど、接種試料間で芽胞の発芽・増殖、産生される毒素型の挙動に差異が認められた。この食品はpH6.1, Aw0.98以上であり、これらのパラメーターではボツリヌス菌の増殖は十分可能な値を示していることから、食品中の成分あるいは物理的要因が発芽・増殖および毒素型ごとの発芽・増殖の差にも影響しているものと考えられる。しかし、その詳細は今回不明である。

食品N(炒めの素)は、豚肉を主とした試料であり、5試料とも毒素の産生が確認されたが、11日後にガス膨張した1試料のボツリヌス菌数が 10^8 CFU/gを示したのに対し、18日および20日後

に膨張が認められた4試料は、接種菌量と同等の 10^4 CFU/gであった。また、産生毒素型もA型が主体であったが、1検体はA・B型であった。ただし、この後者の食品N4検体はガス膨張確認後、8日および10日間冷蔵保存した後に検査に供す条件となったため、培養中における増殖後の菌数減少の可能性と冷蔵保存中に菌数低下を起こした可能性を考える必要があり、この結果の解釈については今後の課題、反省としたい。

以上の結果から、今回検討した食品3品目は、接種芽胞の発芽・増殖にいたる期間および頻度、さらに産生毒素型がそれぞれ異なるものの、いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素の産生が可能であったことから、食品製造過程においてボツリヌス菌芽胞が残存した場合、条件によっては毒素産生が起こりうると考えられた。従って、今後、加熱殺菌条件の妥当性の評価や保存・流通条件の検討などが肝要と考えられるが、一方、今回の試験条件においても増殖にばらつきがみられたことは、各種食品の評価に必要な試験品数や試験方法、安全性レベルの設定など、関連する課題があることを示すと考えられた。

なお、本厚生労働科学研究の成果等を勘案し、厚生労働省は、120分、4分の殺菌もしくは10以下の冷蔵流通を盛り込んだレトルト食品以外の加圧加熱食品に対する暫定的な行政指導通知を、平成15年6月30日付けで発行した。また、平成14年度に中国・四国地域における容器包装詰低酸性食品の製造実態調査を各県衛生研究所を通じて各県へ依頼調査を行った。調査された一部食品を平成15年度の研究試料に供する予定である。

本研究は、平成14年度厚生労働省科学研究補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)における分担研究として実施した。

謝 辞

芽胞接種試料の作製ならびに食品試料検査法等多岐にわたるご指導をいただいた(社)日本缶詰協会研究所駒木勝次長に対し深謝いたします。

文 献

- 1) 小久保弥太郎: 包装食品における嫌気性菌検査の必要性, 食品と微生物, 3, 19~26(1986)
- 2) 国立感染症研究所細菌血液製剤部・地方衛生研究所: ボツリヌス症の手引き・資料(2001)