

中国・四国地方における容器包装詰低酸性食品製造実態調査と ボツリヌス食中毒に対するリスク評価

石村 勝之 萱島 隆之 平崎 和孝* 松本 勝
荻野 武雄

容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス菌食中毒に対するリスク評価を行うため、中国・四国地方製造品の実態調査を行うとともに、当該（可能性）食品 26 品目 111 検体の理化学的および微生物学的項目試験を実施した。実態調査の結果、中国および四国地方において各種の当該食品が製造されていることが確認された。試験の結果、ボツリヌス菌が増殖可能な pH および水分活性(Aw)を示す食品が認められ、ボツリヌス菌は全検体から検出されなかったが、生菌数、好気性芽胞、嫌気性芽胞菌(クロストリジア)のいずれか、あるいは複数項目が認められる食品が 5 品目(19%)、16 検体(14.4%)みられた。これらの結果から、ボツリヌス芽胞が製造過程で混入・残存した場合、常温保管中に発芽増殖が可能な食品が存在すると考えられた。

「炒めの素 (pH5.5, Aw0.96, NaCl3.3%)」中における芽胞型および栄養型ボツリヌス菌の経時的挙動を調べた。その結果、芽胞接種の系では、発芽後、 10^7 cfu/g まで増殖し、培養 19 日目に 10^4 cfu/g に減少した。この間芽胞数は接種時の 10^4 cfu/g レベルを維持した。一方、栄養型菌を接種した系では、 10^8 cfu/g まで増殖後、19 日目以降 10^4 cfu/g 以下に減少した。この間芽胞形成は認めなかった。ボツリヌス毒素は両系とも 10^6 cfu/g 前後から検出された。これらの結果から、本品中では、接種芽胞の一部が発芽後、 $10^7 \sim 10^8$ cfu/g レベルまで増殖し、比較的短期間に接種芽胞数の 10^4 cfu/g レベル以下に減少することが示唆された。従って、接種培養試験でのボツリヌス菌の増殖性確認を菌数で評価するためには、食品の特性によっては、芽胞数、毒素産生など総合的に判定する必要があると考えられた。

キーワード： ボツリヌス菌，容器包装詰低酸性食品，リスク評価

はじめに

平成 14 年度より厚生労働科学研究の分担研究として容器包装低酸性食品のボツリヌス菌食中毒に対するリスク評価を実施している¹⁾。平成 15 年度は、中国・四国地方製造の食性危害発生の可能性を評価するため、地場産品の製造実態調査を行うとともに、その調査結果から選定した産品と、広島市内で店頭購入した中国・四国地方製造の当該（可能性）食品について、理化学的試験および微生物学試験を実施した。さらに、昨年度実施した芽胞接種試験品のうち、ガス膨張後、冷蔵保存した試験品のボツリヌス菌数が初期添加芽胞数と同様であった 1 品目(炒めの素)¹⁾について、当該食

品中でのボツリヌス菌の経時的挙動を把握することを目的とした接種培養試験を行ったので報告する。

方 法

1 中国・四国地方製造容器包装詰食品の実態調査

中国・四国地方の当該食品の製造実態調査は、中国・四国地方衛生研究所長宛に依頼文および調査表を送付し、各自治体内の調査を依頼した。回答内容を整理・集計し、その中からレトルト食品・不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（新含気調理食品）などを除き、今年度の検査対象である、3 ヶ月以上の賞味期限が設定され、加熱殺菌条件が 100 以下かつ室温保存・流通されているそう菜類

*：現 経済局中央卸売市場食肉市場

を選定し、それらについて購入可能か否かを業者照会し、購入可能であった 8 品目各 5 検体計 40 検体を理化学的・微生物学的試験に供した。

2 広島市内販売店における調査および試験対象食品

広島市内の販売店において室温販売されていた、中国・四国地方製造の容器包装詰め食品 18 品目 71 検体（1 品目あたり原則 5 検体、購入時に殺菌加熱温度、時間、pH、Aw は不明）を購入し、理化学および微生物学的試験に供した。

3 当該(可能性)食品の理化学的・微生物学的試験

無菌的に開封した製品内容物全量を用い pH および Aw の理化学項目および一般生菌数、好気性芽胞数、クロストリジウム数、ボツリヌス菌(毒素定性試験)の微生物学的項目を昨年度の試験方法¹⁾により試験した。検出されたクロストリジア菌および好気性芽胞菌は、アピケンキおよびアピ CH50B (日本バイオメリュー) を用いて同定した。

4 食品へのボツリヌス菌芽胞および栄養型菌の接種培養試験

「炒めの素」(豚肉、みそ、野菜等を主体としたもの、pH5.5, Aw0.96, 塩分:食品 100g あたり 3.3g 相当)におけるボツリヌス菌の経時的挙動を以下の方法で検討した。

今年度購入製品(賞味期限:2004 年 4 月 16 日)を用いてボツリヌス菌接種培養試験を行った。

試験方法は、無菌的に開封した同一ロット品 3 袋の内容物約 300g を滅菌ストマッカー袋に移し、昨年度の接種実験に使用した A 型・B 型ボツリヌス菌芽胞混合液(A 型菌 4 株(62A, 90A, B1G4, 62A(NFPA 株)), B 型菌 1 株(213B): 7.9×10^5 cfu/20 μ l) を 80℃, 20 分間加熱した液を少量の蒸留水に希釈懸濁後、食品 1g あたり 10^4 cfu になるように接種し、均一化した後、30℃ で嫌気培養した。それらから経時的に検体を一部採取し、クロストリジア数(ボツリヌス菌数)、マウス試験によるボツリヌス毒素産生性、嫌気性芽胞数を測定した。嫌気性芽胞数は、80℃, 20 分間加熱後のクロストリジア数を計数した。同様の試験を栄養型ボツリヌス菌混合液を 10^2 cfu/g 接種した本年度品について試験した。

結 果

1 中国・四国地方製造容器包装詰め食品の実態調

表1 中国・四国地方製造品の実態調査結果

自治体	食品分類	品目数
岡山県	総菜	17
	調味料	5
	総菜半製品	3
	菓子	2
	その他	6
広島県	生菓子	7
	総菜	5
	調味料	3
	総菜半製品	1
徳島県	調味料	6
	総菜	2
香川県	総菜	5
	総菜(要冷蔵)	3
	調味料	1
	その他	1
愛媛県	総菜	3
	総菜半製品	1
	調味料	1
高知県	調味料	5
	総菜	4
	生菓子	1
	総菜半製品	1
	総菜(レトルト)	4
広島市	漬物	4
	調味料	1
計		92

査結果

調査は容器包装詰め食品のうち 3 ヶ月以上常温可能かつ pH4.6 以上水分活性 0.94 以上の食品で、規格基準が定められていない食品を対象とした。その結果、中国・四国 9 県のうち 6 県から 92 品目について回答があった(表 1)。その内訳はそう菜 52 品目、醤油、ソース、つゆ等の調味料 17 品目、菓子類 10 品目、そう菜半製品 5 品目、漬物 4 品目、その他 4 品目であった。いずれも合成樹脂袋、びん等の包装が主であったが、そう菜のうち 15 品目は新含気調理食品であった。約 8 割の食品は Aw について不明であった。今年度はこれらの中から加熱殺菌条件が 100℃ 以下または加熱殺菌工程がない 27 品目(29%)について検討し、取り寄せが可能であったそう菜 8 品目(表 2)各 5 検体計 40 検体を試験品とした。

また、広島市内の販売店にて常温販売され、購入した中国・四国地方製造の容器包装詰め食品 18 品目(pH, Aw 不明)の内訳は、そう菜 6 品目、調味料 5 品目、半製品 4 品目、漬物 2 品目、その他 1 品目であった。これらの店頭で常温販売されていた食品は、表示から中国・四国地方域内の製造と

表2 中国・四国地方製造容器包装詰食品の供試品

品目No.	食品名	賞味期限	加熱殺菌条件	製造所所在地
1	川魚甘露煮	11月29日	100 , 15分	岡山県
2	しめじ煮物	12月6日	96 , 50分	岡山県
3	しめじ煮物	12月6日	96 , 50分	岡山県
4	しいたけ煮物	12月6日	96 , 50分	岡山県
5	川魚甘露煮	不明	60-80 , 30分	広島県
6	栗甘露煮	不明	98 , 70分	愛媛県
7	栗甘露煮	不明	98 , 70分	愛媛県
8	きくらげ佃煮	不明	不明	愛媛県

判断されるものであったが、その多くは、広島県および広島市内において製造されたと思われる食品が主体であった。それらの包装資材、形態、表示の記載内容から、殺菌方法、殺菌温度等を明確に把握することはできず、レトルト殺菌食品との区別は難しかった。

2 当該（可能性）食品の理化学的・微生物学的試験

取り寄せ食品 8 品目 40 検体の検査結果を表 3 に示した。pH および Aw の理化学的特性が 5 検体すべて pH4.6 を超え、Aw0.94 以上であった食品は 8 品目中 2 品目であった。その他の 6 品目中 5 品目は、pH が 4.9~6.2、Aw は 0.93~0.94 を示し、群ボツリヌス菌の発育限界 Aw0.94 付近のものが多かった。これら 8 品目 40 検体の微生物学的試験の結果、ボツリヌス菌、生菌数、クロストリジア数、あるいは好気性芽胞数は認められなかった。

一方、市内スーパー店頭にて室温販売されていた容器包装詰め食品 18 品目 71 検体について同様に試験した（表 4）。これらの食品 71 検体からもボツリヌス菌は検出されなかった。その他の試験項目に関しては、13 品目 55 検体からは検出されなかったが、5 品目 16 検体から検出された。クロストリジアは 1 品目 2 検体から検出された（表 4、品目 No.12）が、Aw は 0.92~0.93 を示し、汚染菌量は 1 cfu/g であった。検出菌は 2 検体とも Clostridium clostridioforme に同定された。

生菌数は 4 品目 14 検体に認められた。そのうち 3 品目（調理みそ、生うどん、そう菜(表 4:品目 No.13, 17, 21)は Aw0.94 以下であったが、1 品目（煮豆（五目豆））2 検体（表 4:品目 No.18）は Aw0.97 および 0.98 を示し、その生菌数も 10⁴/g ならびに 10⁵/g であった。

好気性芽胞菌は、1 品目（調理みそ）5 検体からのみ検出されすべて Bacillus subtilis に同定された。（表 4、品目 No. 13）。本品目の Aw 値は 0.90 で、生菌数および好気性芽胞数はともに 10²/g であった。

3 ボツリヌス菌芽胞および栄養型菌の接種培養試験

「炒めの素」は、昨年度試験品および今年度購入品ともに pH5.5、Aw0.96 であった。本品にボツリヌス菌芽胞および栄養型菌を添加し 30 培養した試験結果を、図 1、図 2 および図 3 に示した。

本年度品における芽胞接種試験では、接種芽胞数 10⁴cfu/g レベルを超え、発芽・増殖が確認されるまでの日数は、培養 5 日目以降であった。その後対数増殖を示し、11 日目に 10⁷cfu/g で増殖のピークを示した。その後定常期で推移した後、19 日目には 10⁴cfu/g に減少し、接種芽胞数レベルとなった。ボツリヌス毒素は 10⁶cfu/g に達した時点で検出され、以後検出された。芽胞数は、培養期間を通じ接種芽胞数の 10⁴cfu/g レベルで推移した（図 1）。ボツリヌス毒素は 10⁶cfu/g に達した時点で検出され、以後検出された。芽胞数は、培養期間を通じて接種芽胞数の 10⁴cfu/g レベルで推移した（図 1）。

本年度購入品に栄養型菌を接種した系では、10²cfu/g に接種された菌が一端 10¹cfu/g に減少した後、増殖し、培養 8 日目に 10⁷cfu/g レベルに達した。その後減少し、18 日以降に 10⁴cfu/g レベルに減少した。ボツリヌス毒素は 8.0 × 10⁵cfu/g で

表3 中国・四国地方製造取り寄せ食品の試験結果

品目No.	検体数	袋膨張	pH	Aw	生菌数/g	Clst数/g	好芽数/g	ボツリヌス毒素
1	5	無	5.4-5.5	0.93-0.95	10未満	1未満	10未満	陰性
2	5	無	5.1	0.95-0.96	10未満	1未満	10未満	陰性
3	5	無	5.1	0.96	10未満	1未満	10未満	陰性
4	5	無	4.9	0.94-0.95	10未満	1未満	10未満	陰性
5	5	無	5.5-5.6	0.93	10未満	1未満	10未満	陰性
6	5	無	5.7	0.93	10未満	1未満	10未満	陰性
7	5	無	6.2	0.93-0.94	10未満	1未満	10未満	陰性
8	5	無	4.5	0.80-0.81	10未満	1未満	10未満	陰性

Clst数：クロストリジア数

好芽数：好気性芽胞数

が、表示内に殺菌の有無、殺菌内容等を判断できる記載はみられず、みられるものでも、容器包装資材・形態等からレトルト食品との区別について、消費者の判断しづらい食品が多くあった。これらのことから、この食品群に関する消費者の正確な理解・判断を可能とする表示方法・表示内容に関する検討課題があると考えられた。

取り寄せ食品 8 品目 40 検体を試験した結果、pH4.6 を超え、かつ Aw0.94 を超えた品目は 8 品目中 2 品目(25%)であった。その他の 6 品目は 0.94 以下ではあったが、5 品目は 群ボツリヌス菌の発育限界とされる Aw0.94 付近の製品であった。これら 8 品目 40 検体の微生物学的試験の結果は、ボツリヌス菌、生菌数、クロストリジウム数、好気性芽胞数のいずれも検出されなかった。一方、市内スーパー店頭にて室温販売されていた容器包装詰め食品 18 品目 71 検体についてもボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、その他の微生物学的試験項目に関しては、5 品目 16 検体からいずれかの項目あるいは複数項目が検出され、その内訳をみると、クロストリジウムに関しては、調理みそ 1 品目 2 検体から検出された。この食品は、80 以上で 10 分間保持する殺菌方法が行われており、食品中の芽胞は死滅していなかったと考えられるが、菌量は 1 cfu/g と少量であり、同定された Clostridium clostridioforme は、土壌等に生息し、マウス毒性のないことが Bergey's manual に記載されている。この殺菌温度では、ボツリヌス菌芽胞が混入した場合、加熱後も生残する可能性が想定されるが、Aw が 0.92~0.93 であることから、ボツリヌス 群菌芽胞の発芽・増殖限界内であり、増殖はできない食品と考えられた。

生菌数が認められた 4 品目 14 検体は、3 品目が Aw0.94 以下であり、ボツリヌス菌に関しては発芽・増殖限界内にある食品特性であった。しかし、煮豆(五目豆) 1 品目 2 検体は、Aw0.94 以上であり、生菌数が $10^4/g$ ならびに $10^5/g$ であったことから、菌の増殖が示唆される結果であった。この製品は包装後加熱されており、製造元への照会では加熱殺菌温度は 118 20 分との回答であった。しかし、検出菌は芽胞形成菌ではなく、同一ロットと考えられる 3 検体の生菌数が $10^4/g$ 未満であったことから、明確な汚染経路・汚染原因の特定はできないが、加熱時の製品間の温度ムラ等により生残した菌が殺菌工程後に増殖した、あるいは加熱後何らかの原因により包装内を汚染した菌

が増殖した、などの可能性が考えられ、ボツリヌス芽胞が残存した場合、注意を要する状態にある食品と考えられた。

好気性芽胞菌(Bacillus 属菌)芽胞が加熱殺菌後にも生残し増殖した場合、その酸化還元電位を低減させることにより、ボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖を促進させることが知られている。今回、調理みそ 1 品目からのみ Bacillus subtilis が検出されたが、Aw が 0.90 であることから、本菌が増殖できた場合も、ボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖はできない食品と考えられた。

以上、中国・四国地方製造容器包装詰食品 26 品目 111 検体(100 以上加熱殺菌の市販食品を含む)からはボツリヌス菌の汚染は確認できなかったが、加熱工程に課題がみられる食品がみられるなど、潜在的なボツリヌス食中毒発生の可能性を懸念する試験結果例もみられた。このことから、製造加工段階の加熱殺菌条件や流通段階における冷蔵による保管管理方法の具体的設定の議論が望まれる。

昨年度の添加試験品のうち、ガス膨張後、試験に供するまで冷蔵保存(9日)したところ、ボツリヌス毒素陽性であるが、そのボツリヌス菌数が初発添加芽胞量($10^4 cfu/g$)と同等であった食品(炒めの素)がみられた。この結果が冷蔵保存を行ったためなのか否か等、原因を明らかにしておくことは、今後、食品中でのボツリヌス菌の菌増殖と毒素産生によるリスク評価のための接種試験条件を精緻にしていく上でも重要と考え、本品中での増殖態度を再度検討した。「炒めの素」は、豚肉、みそ、野菜、その他多くの成分からなる食品で、pH は 5.5、Aw は 0.96 である。また、塩分は食塩相当量で 3.3%含まれていると表示されている。今回使用した接種菌は、A 型菌 4 株(62A, 90A, B1G4, 62A(NFPA 株)), B 型菌 1 株(213B)を用いたが、駒木ら²⁾により発芽・増殖限界 pH は、A 型菌の 62A 株は pH 5.5~5.6、B 型菌の 213B 株は pH 5.2 と測定されており、発芽・増殖限界に近い状態の食品と考えられる。この食品中で $10^4 cfu/g$ の接種芽胞は、発芽・増殖を示し、 $10^7 cfu/g$ レベルまで対数増殖を示し、以後減少して培養開始 19 日目以降には接種芽胞の $10^4 cfu/g$ レベルとなる動きを示した。その間、芽胞数は接種菌数の $10^4 cfu/g$ レベルを維持しており、栄養型菌の系も増殖後、同様に 19 日目には $10^4 cfu/g$ レベルに減少した。その間芽胞の形成は認められなかった。一方、ボツリ

ヌス毒素は両接種系とも 10^6 cfu/g 前後で検出された。これらの経時的結果から、昨年度の結果は、接種ポツリヌス菌芽胞が発芽増殖してポツリヌス毒素を産生し、その後菌数減少したが、測定では 10^4 cfu/g レベルに維持された非発芽の芽胞を測定したと推測された。このことは、接種試験の結果評価には、ガス膨張の観察やポツリヌス菌数測定結果（ポツリヌス生菌数および芽胞数）の評価およびポツリヌス毒素の検出結果などの総合的な評価が必要な場合のあることを示唆した。

温度、pH、 A_w や各種の成分濃度(NaCl など)の違いにより、ポツリヌス菌芽胞の発芽率は大きく異なる³⁾。BHI 液体培地においては、pH5.5、4% NaCl、30 の条件で約 10%以下の発芽率とする文献⁴⁾がある。また、pH5.5 付近は発芽において特に影響があるが、その後の増殖段階にあまり影響しない⁵⁾ことが報告されている。今回の食品も本食品中で芽胞が形成されないことから、接種した芽胞の一部、増殖曲線の外挿から推定するとおそらく 1%未満の芽胞のみが発芽し、増殖したものと推測される。このように、接種芽胞の発芽率も試験結果へ影響すると考えられ、この点についても留意しておく必要がある。

本研究は平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金による分担研究として実施した。

謝 辞

中国・四国地方の実態調査に際し、多大なご協力をいただいた各県衛生主管課ならびに衛生研究所の関係各位に対し深謝いたします。

文 献

- 1) 小熊恵二：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 容器包装詰低酸性食品のポツリヌス食中毒に対するリスク評価 平成 14 年度総括・分担研究報告書(2002)
- 2) 小熊恵二：厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業 容器包装詰低酸性食品のポツリヌス食中毒に対するリスク評価 平成 15 年度総括・分担研究報告書(2003)
- 3) Billon CMP et al: The effect of temperature on the germination of single spores of Clostridium botulinum 62A, J Appl Microbiol, 82, 48 ~ 56(1997)
- 4) Chea FP et al: Modeling of the germination kinetics of Clostridium botulinum 56A spores as affected by temperature, pH, and sodium chloride, J Food Protect, 63, 1071 ~ 1079(2000)
- 5) Blocher JC et al : Multiple modes of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate, J Appl Bacteriol, 59, 469 ~ 478(1985)