

# I群に属するA型およびB型ボツリヌス菌の低温域における増殖

小林哲也, 大久保良子<sup>1</sup>, 山口敏季<sup>2</sup>

## Growth Ability of Group I *Clostridium botulinum* Types A and B at Low Temperatures

Tetsuya Kobayashi, Ryoko Okubo<sup>1</sup> and Toshiki Yamaguchi<sup>2</sup>

To confirm the importance of cold storage for preventing the growth of group I *Clostridium botulinum*, the growth ability of group I *C. botulinum* types A and B at low temperatures was evaluated. Sixteen strains were inoculated in semisolid Gifu anaerobic medium and incubated at 10, 12, 15, and 30°C for up to 90 days. No strain could grow at 10°C for 90 days. Only one strain could grow at 12°C but 15 strains could grow at temperatures above 15°C. Therefore, cold storage at temperatures below 10°C is essential for preventing the growth of group I *C. botulinum*.

**KEY-WORDS :** *Clostridium botulinum*, Growth Ability at Low Temperatures

**キーワード :** ボツリヌス菌, 低温増殖

ボツリヌス菌は、偏性嫌気性グラム陽性の芽胞形成菌で、致死性の高い毒素を産生する食中毒菌である。毒素の抗原性の違いによってAからGの7型に分類されており、主にA, BおよびE型がヒトの食中毒に関与する。また、生化学的性状によってIからIVの4群に分類されており、A型およびタンパク質分解性のB型はI群に、タンパク質非分解性のB型およびE型はII群に属する<sup>1)</sup>。

I群とII群の芽胞では耐熱性が大きく異なり、II群の芽胞を殺滅するには90°Cで10分間の加熱で十分であるのに対して、I群の芽胞を殺滅するには121°Cで3分間の加熱が必要である<sup>1)</sup>。I群の芽胞が発芽・増殖可能な製品においては、I群の芽胞が生残していると不適切な温度で保存したときに食中毒が発生する<sup>2)</sup>。そのため、厚生労働省は、I群ボツリヌス菌が増殖する恐れのある容

器包装詰低酸性食品に対しては、中心部分まで120°Cで4分間以上加熱してボツリヌス菌の芽胞を殺滅することや、十分な加熱殺菌が難しい場合には生産から消費までを冷蔵(10°C以下)で管理し、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生を防止することを求めている<sup>1)</sup>。

近年では10°C以下の冷蔵で30日以上保存性をもつ容器包装詰低酸性食品が製造されている<sup>3~5)</sup>。冷蔵保存が長期間にわたるこのような製品では、微生物の増殖を遅延・抑制するために品温管理が重要である。しかしながら、ボツリヌス菌は感染症法で所持や取り扱いに要する条件が厳しく定められており<sup>ii)</sup>、自社製品におけるI群ボツリヌス菌の増殖や毒素産生の有無を事業者が独自に試験することは極めて難しい。

本研究では、中心部分への加熱が120°C、4分を満た

<sup>1</sup>元公益社団法人日本缶詰びん詰レトルト食品協会, Formerly of Japan Canners Association

<sup>2</sup>公益社団法人日本缶詰びん詰レトルト食品協会, Japan Canners Association

事業名: 経常研究

課題名: チルド食品のロングライフ化に向けた偏性嫌気性芽胞形成菌の加熱殺菌条件の確立

さない容器包装詰低酸性食品の保存における温度管理の重要性を確認するため、I群に属するA型およびB型ボツリヌス菌の10～30℃での増殖性を明らかにした。

## 1. 実験方法

### (1) 供試菌株

公益社団法人日本缶詰びん詰レトルト食品協会が保有するI群ボツリヌス菌16菌株（A型：8菌株，B型：8菌株）を供試した。

### (2) 増殖試験用試料の調製

各菌株は、GAM半流動高層培地（日水製薬，以下GAM）に接種して35℃で1～2日間前培養した。得られた前培養液は適宜希釈した後，1mLをGAM 60mLに接種した。十分に攪拌した後，2mLずつ硬質ガラス管（内径：7mm，外径：9mm，全長：150mm）18本に分注し，直ちに酸素炎で溶封して増殖試験用試料とした。なお，溶封後の各菌株の初発菌数は表に示した。

### (3) 培養条件

増殖試験用試料は，10，12，15および30℃で最大90日間培養した。10，12および15℃での試験には各菌株5本の試料を，30℃での試験には各菌株3本の試料を用いた。

### (4) 増殖の判定

増殖の有無は，試料を目視観察したときの培地の混濁もしくはガス発生の有無で判定した。90日間培養した後培地の混濁やガス発生が認められなかった試料は，開

封してpHを測定し，培養前（pH6.9）と比較してpHに変化がなかった場合を非増殖と判定した。

## 2. 実験結果

A型およびB型それぞれ8菌株のボツリヌス菌を10，12，15および30℃で最長90日間培養したときの増殖結果を表に示した。10℃では，90日の培養期間中全ての菌株が増殖しなかった。12℃では，A型の33Aのみが増殖した。33Aは5本の試料全てで増殖したが，増殖に要する日数は7～41日とばらついた。15℃では，全ての菌株が増殖したが，増殖に要する日数には各菌株に差が見られた。B型の407は供試菌株の中で最も早く，培養6日で増殖を確認した。A型の6菌株（62A，12885A，No.26-6，33A，36AおよびCB21）とB型のOkraは培養7日，B型の4菌株（213B，9B，Gingerおよび326）は8日で増殖を確認した。A型の2菌株（CB38およびRenkon）は16菌株の中で最も遅く，増殖の確認に12日を要した。30℃では，B型の213Bを除く15菌株が1日で増殖し，2日目には全ての菌株で増殖を確認した。

また，B型の407および41Bは初発菌数が異なる条件でも試験を行った。407は，12℃で培養したときには初発菌数が5.9 log CFU/mLでは増殖しなかったのに対して，初発菌数が6.0 log CFU/mL以上では培養28日で増殖した。41Bは，15℃で培養したときには初発菌数が5.3 log CFU/mLでは培養10日で増殖したが，初発菌数が1.5

表 種々の培養温度におけるI群ボツリヌス菌の増殖

血清型	菌株	菌株番号 <sup>a</sup>	初発菌数 (log CFU/mL)	増殖試料本数/培養日数			
				10℃	12℃	15℃	30℃
A	62A	5108	4.1	0 / 90	0 / 90	5 / 7	3 / 1
	12885A	5114	4.8	0 / 90	0 / 90	5 / 7	3 / 1
	CB38	5116	3.8	0 / 90	0 / 90	5 / 12	3 / 1
	No. 26-6	5140	3.9	0 / 90	0 / 90	5 / 7	3 / 1
	33A	5143	3.5	0 / 90	2 / 7	5 / 7	3 / 1
					3 / 14		
					4 / 34		
					5 / 41		
		36A	5144	3.3	0 / 90	0 / 90	5 / 7
B	Renkon	5145	4.9	0 / 90	0 / 90	5 / 12	3 / 1
	CB21	5146	5.2	0 / 90	0 / 90	5 / 7	3 / 1
	213B	5106	3.2	0 / 90	0 / 90	5 / 8	3 / 2
	9B	5120	4.4	0 / 90	0 / 90	5 / 8	3 / 1
	41B	5122	5.3	0 / 90	0 / 90	5 / 10	3 / 1
	Okra	5147	4.9	0 / 90	0 / 90	5 / 7	3 / 1
	67B	5148	3.5	0 / 90	0 / 90	2 / 8	3 / 1
						5 / 10	
		407	5149	5.9	0 / 90	0 / 90	5 / 6
	Ginger	5150	4.8	0 / 90	0 / 90	5 / 8	3 / 1
	326	5151	4.7	0 / 90	0 / 90	5 / 8	3 / 1

<sup>a</sup>公益社団法人日本缶詰びん詰レトルト食品協会の整理番号

log CFU/mLでは増殖が4日遅延した（データ非掲載）。

### 3. 考察

本研究で供試した16菌株のうち、10菌株（A型：62A, 33A, 36A, Renkon, CB21；B型：Okra, 67B, 407, Ginger, 326）は5～52℃で30日間培養した場合の増殖性が既に報告されており<sup>6)</sup>、本研究の結果と若干の相違はあるが、供試菌株が10℃で増殖しないことは同様であった。また、微生物の増殖に関するデータベース（Microbial Responses Viewer：MRV）において、I群に属するA型およびB型ボツリヌス菌が含まれるタンパク質分解性ボツリヌス菌は、培地中で14℃では10～20日で増殖するが、10℃および12℃では培養期間が100日以上の場合にわたっても増殖した例はない<sup>iii)</sup>。本研究で新たに評価した6菌株（A型：12885A, CB38, No.26-6；B型：213B, 9B, 41B）もこれらの報告と類似した傾向を示し、90日間培養しても12℃以下では増殖しなかった。しかし、供試菌株のうち1菌株（33A）は12℃での増殖が認められた。以上より、I群に属するA型およびB型ボツリヌス菌のうち、15℃では増殖可能な菌株が多く、12℃では多くの菌株の増殖は抑制されるものの増殖可能な菌株も存在し、10℃ではI群ボツリヌス菌が増殖する可能性は低いと推察された。

これまでの研究では、ボツリヌス菌の初発菌数が増殖下限温度や増殖に要する日数に影響することが知られている。駒木らは、初発菌数が5.8 log spores/mL前後では、3.9 log spores/mL前後と比較して増殖下限温度が0.6～1.9℃低下することや、I群ボツリヌス菌を接種した無菌包装米飯を30℃で3ヶ月間保存したところ、接種菌数が4.1 log spores/gでは増殖したが、2.4 log spores/gでは増殖しなかったことを報告している<sup>6,7)</sup>。本研究においても、B型の407や41Bでは、初発菌数の多少によって増殖温度や増殖に要する期間に差が観察された。このようなことから、I群ボツリヌス菌の増殖には、菌株毎の特性だけでなく、初期菌数も重要であると推察された。

以上より、中心部分への加熱が120℃、4分に満たない容器包装詰低酸性食品においてI群ボツリヌス菌の増殖を抑制するには、10℃以下での保存が必須であることが示唆された。また、初発菌数の低減がI群ボツリヌス菌の増殖抑制における低温保存の効果を高めることを示唆する結果も得られた。

### 4. 要約

I群ボツリヌス菌の増殖抑制における低温保存の効果

を確認するため、10～30℃におけるI群ボツリヌス菌16菌株（A型：8菌株、B型：8菌株）の増殖を評価した。10℃では90日間培養しても増殖する菌株はなく、12℃でA型の1菌株（33A）が増殖したのに対して、15℃および30℃では全ての菌株が増殖した。これらの結果から、10℃以下の冷蔵保存がI群ボツリヌス菌の増殖抑制に必須であることが示唆された。また、初発菌数の低減が増殖抑制における低温保存の効果を高めることを示唆する結果も得られた。

### 文献

- 1) European Food Safety Authority (2005). Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to Clostridium spp in foodstuffs. *The EFSA Journal*, **199**, 1-65.
- 2) 内村眞佐子, 小岩井健司 (2000). 千葉県で発生したハヤシライスの具によるボツリヌス食中毒について. 千葉衛研報告, (24), 35-37.
- 3) 増田敏郎 (2014). 惣菜類のロングライフ化技術. 食品と開発, **49** (9), 20-24.
- 4) 茶木貴光 (2017). “ロングライフチルド”技術による新規事業への挑戦. 食品と開発, **52** (8), 6-8.
- 5) 竹村好正 (2017). 加熱調理殺菌システム「Micvac」導入・活用による地方企業の挑戦. 食品と開発, **52** (8), 9-11.
- 6) 駒木 勝 (2005). ボツリヌス菌芽胞の性状の検討：培地および異なる容器包装詰食品における発芽・増殖性について. 厚生労働科学研究費補助金「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」平成16年度総括・分担研究報告書, 99-123.
- 7) 駒木 勝, 武士甲一, 林 賢一 (2005). 無菌化包装米飯へのボツリヌス菌接種試験. 厚生労働科学研究費補助金「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」平成16年度総括・分担研究報告書, 169-178.

### 引用URL

- i) 厚生労働省 真空パック詰食品（容器包装詰低酸性食品）のボツリヌス食中毒対策食品製造業者用リーフレット [https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/dl/leaflet\\_241105\\_02.pdf](https://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/dl/leaflet_241105_02.pdf) (2021.7.9)
- ii) 厚生労働省 二種病原体等の所持等にお

ける必要な手続き [https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/3\\_1\\_01\\_150121.pdf](https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/3_1_01_150121.pdf) (2021.9.10)

iii) 微生物の増殖データベース Microbial Responses Viewer <http://mrviewer.info/#> (2021.7.28)