

食品中残留農薬試験法の改善と妥当性評価

環境局環境科学研究所 ○陣矢大助, 岩村幸美, 石橋正博, 山口新一

1 はじめに

食品中残留農薬の規制においては、平成18年度のポジティブリスト制度導入により、それまで規制対象外であった農薬にも一律基準(0.01ppm)が適用されて対象農薬数が大幅に増えたため、一斉試験法が必須となった。平成22年度には、試験法の妥当性評価ガイドラインが改正され、それまでは通知法以外の試験法を用いる場合に課されていた妥当性評価が、通知試験法を用いる際にも各機関で実施する義務が課されることとなり、膨大な作業量が生じた。このような状況に対応するため環境科学研究所では、測定機器として、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)に代えて、より妨害成分の影響を受けにくいガスクロマトグラフタンデム質量分析計(GC/MS/MS)を導入するとともに、試験法についても、妥当性評価に伴う作業量増加を踏まえ、精密さを保ちつつ、工程を見直して作業負担を軽減した新試験法を検討した。そこで本報では、新試験法の概要と、妥当性評価の実施状況について報告する。

2 方法

1) 新試験法 検体を細切りし均一化した後、10gを遠沈管に取り、アセトニトリル25mLを加えてポリトロンホモジナイザで1分間攪拌抽出した。遠心分離後、上澄みをろ過してメスフラスコに移した。残渣にアセトニトリル10mLを加えて1分間手で激しく振とうし、遠心分離して得た上澄みを合わせ、精製水で50mLに定容した。この抽出液の2mLをC18固相に通し、80%アセトニトリル/水0.5mLを通して合わせた。これに精製水2.5mLを加え、HLB固相を通して疎水性農薬を抽出した。流出液に1Mクエン酸緩衝液(pH4)1mL及び精製水30mLを加え、同じ固相を通して親水性農薬を抽出した。流出液を廃棄し、HLB固相を精製水2mLで洗浄後、高純度窒素ガスを約20分間通して乾燥させた。HLB固相下部にPSA固相を連結して、15%アセトン/ヘキサン2mLを流し、農薬類の溶出と精製を行った。溶出液を同溶媒で2mLに定容後、1mLをバイアルに分取して内標準物質及びポリエチレングリコール(PEG 300)を添加し、測定溶液とした。検量線用標準液(検討農薬298種、0.2、0.5、1、2、5ppb)とともにGC/MS/MSで測定した。

従来法 (厚労省通知試験法を一部変更)	新試験法 (埼玉県の試験法を元に一部変更)
均一化試料(20g、ブレンダーカップ)	均一化試料(10g、ポリ遠沈管)
↓	↓
ホモジナイズ抽出 (アセトニトリル50, 20mL,各5分)	ホモジナイズ抽出 (アセトニトリル25, 10mL,各1分)
↓	↓
吸引ろ過(No.5A)	遠心分離(3000rpm, 5min)
100mL定容、 <u>25mL分取</u>	↓
↓	ガラスウール栓でろ過、 50mL定容、 <u>2mL分取</u>
塩析(25mL緩衝液、NaCl)	↓
↓	C18固相(50mg)精製
C18固相(1000mg)精製(穀類)	↓
↓	HLB固相(60mg)抽出(2回)
脱水	↓
↓	固相乾燥
減圧濃縮	↓
↓	溶出/PSA固相(30mg)精製
グラファイトカーボン/NH ₂ 固相 (各500mg)精製	↓ ← 15%アセトン/ヘキサン,2mL
↓ ← アセトニトリル/トルエン(3:1),10mL	定容(2mL)
減圧濃縮、乾固	↓ ← PEG, 内標準物質
↓	GC/MS/MS-MRM
1mL定容	(<u>20μL注入</u> 、PEG共注入)
↓	
GC/MS-SCAN (<u>2μL注入</u>)	

図1 従来法と新法の試験法比較

測定溶液とした。検量線用標準液(検討農薬298種、0.2、0.5、1、2、5ppb)とともにGC/MS/MSで測定した。

2) 試験法の検討 新試験法の精製工程の諸条件(固相種類、塩析の必要性、抽出pH、溶出溶媒)を検討した。

3) 従来法との比較 従来法と新試験法の夾雑成分除去効果を比較するため、無添加試料(キュウリ、5g相当)を両試験法で処理し、GC/MS/MSのシングルMSスキャンモードで測定して、夾雑成分のピーク高さを比較した。

4) 妥当性評価 残留農薬試験法の妥当性評価ガイドラインに従い、各作物について職員2~3名が、それぞれ添加試料(0.01ppm)2検体、無添加試料1検体及び5点の検量線作成を行い、これを3日繰り返した。得られた定量値を統計処理し、試験法の選択性、真度、併行精度、室内精度などを評価した。玄米、ピーマン、カボチャ、ニンジン及びキュウリについて全行程を繰り返した。

3 結果

1) 試験法の検討結果 新試験法の検討にあたり、埼玉県が採用する試験法を参考にした。その理由は、同法の抽出条件が厚労省通知試験法に準じている点と、精製工程の抽出液分取量が適度に少量化されているため作業量の軽減が見込める点である。しかし同法は、自動処理装置を前提とした資材を用いている、検体に応じたpH調整が行われていない、溶出液の極性がやや強く妨害成分が多く溶出するなど、当研究所で導入するにあたって検討すべき課題があった。そこでこれらの課題について予備実験を行い、最終的に表1に示す条件に変更した。

表1 新試験法(精製工程)の検討項目と結果

検討項目	元にした埼玉県法	新試験法
抽出固相	GLS社PLS3 (30mg)	Waters社シリンジ型 HLB (60mg)
塩析	あり	なし
pH調整	なし	pH4.0に調整
溶出溶媒	30%アセトン/ヘキサン	15%アセトン/ヘキサン

2) 従来法との比較 一般に食品残留農薬試験で正しい試験結果を得るには、試験の妨害となりうる成分(夾雑成分)を抽出液から効果的に除去することが重要となる。従来法と新試験法で処理した試料のクロマトグラムを図2に示す。新試験法は、従来法と比べ、夾雑成分のピーク高さは明らかに低く、夾雑成分の除去効果が従来法より高いことが分かった。

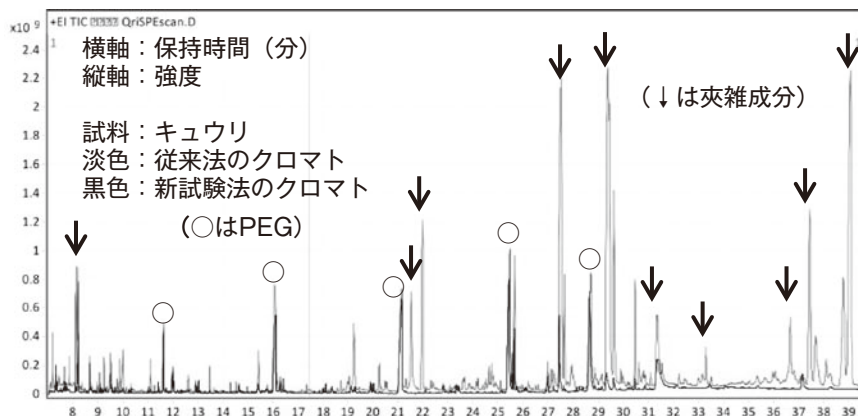


図2 従来法及び新試験法の全イオンスキャンクロマトグラム比較

3) 妥当性評価 妥当性評価ガイドラインでは、基準値濃度の添加試料を用いて評価を行うこととされているため、まずは一律基準(0.01ppm)濃度の添加試料で作業を行った。この添加濃度での評価基準は、妨害ピークがないこと(選択性)、真度(回収率)が70~120%以内、併行精度及び室内精度(RSD%)がそれぞれ<25%及び<30%である。検討農薬298種のうち、評価基準を全て満足した農薬数を表2に示す。

表2 妥当性評価結果

作物	農薬数
玄米	210
ピーマン	234
カボチャ	233
ニンジン	226
キュウリ	216

(平成25年11月末時点)

4 考察

- 1) 夾雑成分除去効果の改善 上述のように、新試験法の夾雑成分除去効果は従来法より良好であった。この理由としては、(1)従来法では、C18固相を主に脂質除去用として穀類に用いたが、新試験法では抽出液のアセトニトリル比率を下げることで、着色成分の除去も可能とした。(2)従来法の精製工程では、夾雑成分を保持して除去するクリーンアップ手法として固相を用いたが、新試験法では同手法に加えて、農薬をHLB固相に保持して夾雑成分を素通りさせる、いわゆる濃縮手法としても用いるため、夾雑成分の除去効果が高まった、の2点が挙げられる。
- 2) 作業量及び溶媒使用量の削減 装置感度の向上や機材/工程の見直しにより、新試験法では、吸引ろ過、分液漏斗での塩析、無水硫酸ナトリウムによる脱水、減圧濃縮装置での2回の濃縮工程や、その際に使用する器具の準備(アセトンでの予備洗浄や使用後の洗浄)などに要する作業を省くことができた。このため有機溶媒の使用量を従来法の約220mLから新試験法の約80mLに削減でき、作業時間も短縮できた。
- 3) 妥当性評価について 新試験法で妥当性評価基準を満たした農薬数は210~234種であり、従来法の検査対象農薬180種の大半を包含しているため、新試験法の性能は従来法と比較して同等以上であると考えられる。

5 まとめ

妥当性評価作業(例: 1作物1基準値当り3検体×2人×3日、又は3検体×1人×5日など)は、今後も継続実施する必要がある。このため、試験の精確さを保ちつつ作業量や溶媒使用量を削減できる新試験法を採用することは、有意義である。

ATP法およびLAMP法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の簡易迅速スクリーニング法の検討

○藤田景清・*久保田勉・**寺西泰司・齊藤寛

(北九州市環境科学研究所・*保健福祉局動物愛護センター・**門司区役所保健福祉課)

1 はじめに

レジオネラ感染症は冷却塔水や浴槽水を原因として起こる呼吸器感染症であり、本市においても平成17年度より冷却塔水、翌18年度より浴槽水を検査している。浴槽水は残留塩素濃度0.2ないし0.4ppmと国のレジオネラ対策指針で示されている。しかし本市の過去の検査では高濃度残留塩素の浴槽水からも度々レジオネラ属生菌を分離している。本菌の培養法は判定までに一週間以上の日数を要し、施設への迅速な対応を行うには培養法以外の検査法が必要と考えられる。従来、残留塩素濃度測定後に迅速法として遺伝子検査を実施しているが、菌の生死が判別できない欠点があり、最近生菌判別できるEMA法の有効性が報告されている。また、浴槽水の汚れ具合からレジオネラ属菌の汚染を推測するATP法の活用を国が報告している。しかし、ATP法と遺伝子検査法を併用した事例の報告は少なく、今回ATP法およびPCR法に比べて手技が簡易で一時間程度で菌の汚染状況を判定できるLAMP法さらに菌の生死判別できるEMA-LAMP法を用いた併用法の有効性を検討したので報告する。

2 検討方法

平成24年7月～12月および平成25年7～8月に行政検査として保健所が市内公衆浴場で採水した21施設205検体の浴槽水のレジオネラ属菌検査を行った。検査法は「第3版レジオネラ症防止指針」に準じて図1《従来法》のとおり行った。また今回図1《スクリーニング法》として検体のATP濃度測定後、ろ過濃縮法による100倍濃縮液でLAMP法遺伝子検査を行った。得られた結果から残留塩素濃度、ATP濃度とレジオネラ属菌遺伝子の相関について検討した。また分離した菌株の菌種・血清型およびEMA-LAMP法を用いた菌の生死判別法の有効性についても検討した。

(1) 残留塩素濃度とレジオネラ属菌遺伝子の比較

検体は採水時にDPD法による残留塩素濃度測定後、中和冷蔵保管にて当所に搬入された。レジオネラ属菌遺伝子の検出は100倍濃縮液2mlを検体として「Loopampレジオネラ検出キットE」(栄研化学)によるLAMP法を行った。

(2) ATP測定値とレジオネラ属菌遺伝子の比較

食品加工工程のふき取り検査で活用しているハンディタイプのATP測定装置 ルミテスター PD-10N (キッコーマン社製)を用いて検体搬入後、直ちに200μLを測定した。ATP値(RLU・相対発光量)は2回測定後、平均値を用いた。

(3) LAMP法Tt値(濁度到達時間)とレジオネラ属生菌数の比較

LAMP法Tt値(秒)の測定にはリアルタイム濁度測定装置LA-320C(栄研化学)を用いた。

また、一部検体については2倍時間(7200秒)増幅後、LAMP産物を電気泳動して特徴的なラダー状バンドパターンを確認したのち、レジオネラ属菌遺伝子と確定した。

(4) レジオネラ属生菌数および菌種、血清型の比較

生菌数はWYO α寒天培地(栄研化学)およびGVPC α寒天培地(日研生物医学研究所)をそれぞれ2枚ずつ使い、7～10日間37℃の恒温室で培養後測定した。L-システイン要求性、グラム染色性状等からレジオネラ属菌と同定後、レジオネラニューモフィラに特異的なmip遺伝子を標的としたPCR、レジオネララッセステスト(OXOID)およびレジオネラ免疫血清(デンカ生研)による血清型別を行い、それらの結果からレジオネラ菌種を同定した。

(5) レジオネラ属生菌数とEMA-LAMP法による遺伝子検出の比較

生菌が分離された検体濃縮液2mlを用いて「Viable Legionella Selection Kit for PCR」(タカラ)で処理後、生菌に由来するレジオネラ属菌遺伝子をEMA-LAMP法で検出した。

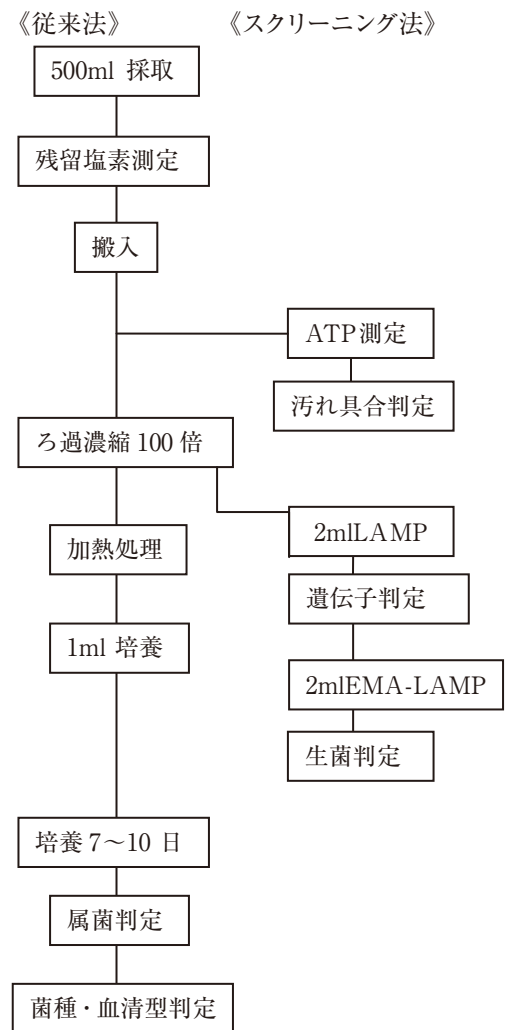


図1 レジオネラ属菌検査手順

3 検討結果および考察

浴槽水205検体について検討した結果は、以下のとおりである。

(1) 浴槽水の残留塩素濃度とレジオネラ属菌遺伝子の検出検体数

表1 LAMP法と残留塩素濃度結果

	n < 0.2ppm	0.2 ≤ n < 0.4	0.4 ≤ n < 1.0	1.0 ≤ n
LAMP陽性	40(21)	15(8)	24(12)	16(1)
LAMP陰性	18(0)	9(0)	18(0)	65(0)

()はレジオネラ属菌の生菌検出検体数

n=205

205検体の浴槽水中42検体(20.5%)よりレジオネラ属菌を検出した。LAMP法による生菌の見逃しは認めなかった。残留塩素濃度別では、LAMP法陽性検体(95検体)は0.2ppm未満(40検体)で最も多いものの濃度に関係なく検出している。また、生菌検出した残留塩素濃度別では、0.2ppm未満(21検体)で検出の最も多いものの、指針とされている0.4ppm以上(13検体)でも検出した。今回の測定でも過去の事例同様に残留塩素濃度を指標とした場合、スクリーニングで生菌の存在を見逃す可能性が示唆された。

(2) 浴槽水のATP濃度とレジオネラ属菌遺伝子の検出検体数

表2 LAMP法とATP濃度結果

	n < 8.0RLU	8.0 ≤ n < 25.0	25.0 ≤ n < 50.0	50.0 ≤ n
LAMP陽性	0(0)	7(0)	18(4)	70(38)
LAMP陰性	37(0)	33(0)	20(0)	20(0)

()はレジオネラ属菌の生菌検出検体数

n=205

ATP濃度別では、LAMP法陽性検体は50.0RLU以上(70検体)で最も多く8.0RLU未満では検出しなかった。また生菌検出したATP濃度別では、50.0RLU(38検体)で検出が最も多く、25.0RLU未満では検出しなかった。陰性対照として測定した水道水は2.0～3.0RLUで推移した。25～30RLUは厚生労働省の報告でも基準とされており、今回の結果でもATP濃度25.0RLU未満では生菌が分離されず再現性が確認され、レジオネラ属菌の生死を25.0RLUとして浴槽水の汚れ具合の目安と考えることができた。浴槽水のATP濃度は遺伝子や生菌と相関が認められスクリーニングに適用でき、また、測定機器も小型軽量であり、検体の前処理も必要ないため現場での採水直後の測定が可能である。

(3) LAMP法Tt値とレジオネラ属生菌数の相関

培養法で陽性となった42検体のLAMP法Tt値と生菌数の相関は認められなかった。LAMP法陽性検体95検体はTt値798～5628秒(2倍時間LAMP法)、うち培養法陽性検体42検体はTt値798秒(35cfu/100ml)～5628秒(10cfu/100ml)であった。最大生菌数6600cfu/100mlのTt値は1974秒であった。

LAMP法Tt値とレジオネラ属生菌数の相関については、比較的的生菌数の多い場合は相関が認められると定量性の可能性を報告しているが、今回は菌株分離検体の生菌数のばらつきが大きく相関は認められなかった。原因としてLAMP法阻害物質の影響によるTt値のばらつきの可能性もあり、今後、反応阻害防止剤の活用や遺伝子DNAの精製を行う必要も考えられた。

また、通常のLAMP法では3600秒を増幅時間としているが、今回LAMP法陰性・培養法陽性検体について2倍増幅時間すなわち7200秒で行ったところLAMP法の結果が陽転した。今後、LAMP法を実施する場合、陰性検体でも増幅時間の延長を考慮する必要があると考えられた。

(4) 分離菌株の詳細

表1 LAMP法と残留塩素濃度結果

施設	1回目		2回目		3回目		4回目		5回目		6回目	
	H24/7採水		H24/8採水		H24/11採水		H25/7採水		H25/8採水		H24/12採水	
	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型	菌数	菌種血清型
A-1	35	L.p UT	10	L.p UT	0		*220	L.p UT/6	25	L.p UT/3	*10	L.p 6
A-2	880	L.p UT/6	35	L.p UT/6	0		*40	L.p UT/1/6				
A-3	0				10	L.p 6						
A-4	0		0		160	L.p 6	*330	L.p 6				
A-5									940	L.p UT		
A-6											*20	L.p 7
B-1	15	L.p UT/3	70	L.p UT/3								
C-1	20	L.p UT/1/5	10	L.p 5							*130	L.p 1
C-2	60	L.p UT/5	0								110	L.p UT
C-3									5	L.p 3	*1500	L.p 6
C-4											*10	L.p 1
D-1	30	L.p UT/1	0						40	L.p UT	20	L.p UT
D-2											60	L.p UT
E-1									5	L.p UT		
F-1					140	L.p 5/6	*6600	L.p 5/6	2735	L.p 5		
F-2									10	L.p 5		
F-3											*100	L.p UT
G-1					*50	L.p 3						
G-2					*30	L.p 3	0					
H-1					0		10	L.p 6	95	L.p UT/5	*10	L.p UT
H-2									10	L.p 6	10	L.p UT
I-1					0		10	L.p 1/5				
J-2											*50	L.p UT/6

血清型はレジオネラ免疫血清レジオネラニューモフィラ血清型1～7に該当しないものを型別不能(UT)とする。
L.p: Legionella pneumophila 菌数はCFU/100ml を示す。*: EMA-LAMP法陽性

表3に示したとおり、全21施設中10施設でレジオネラ属菌を検出した(検出率48%)。レジオネラ属菌の菌種は全てレジオネラニューモフィラと同定された。血清型別では、型別不能のものが23菌株(39.0%)と多いものの他は血清型6型(14菌株 23.7%)・5型(9菌株 15.3%)・1型(6菌株 10.2%)・3型(6菌株 10.2%)と全国的に浴槽水からの分離報告が多い血清型が分離された。今回得られた42菌株の遺伝子解析は行っていないが、同一施設浴槽水で複数回にわたり同一菌種血清型が分離されたことにより同一汚染源から経時的に暴露を受けていた可能性が示唆された。

(5) レジオネラ属生菌数とEMA-LAMP法によるレジオネラ属生菌遺伝子の比較

3回目・4回目・6回目の培養法陽性の23検体を用いてEMA-LAMP法を実施した結果、14検体が陽性となった(正誤率61%)。培養法陽性であるもののEMA-LAMP法にて陰性と誤って判定した9検体の生菌数は10～160cfu/100ml、陽性と正しく判定した14検体の生菌数は10～6600cfu/100mlであった。6回目検査で培養法陰性・EMA-LAMP法陽性の偽陽性となった2検体は死菌DNAが多いためEMA処理で完全に処理されずLAMP反応にDNAがキャリアオーバーされた可能性が考えられ、また、スクリーニング法としてはあってはならない事例ではあるが培養法陽性・EMA-LAMP法陰性となった4検体はEMA反応の反応阻害物質等の影響が考えられ死菌DNAの精製が必要と考えられた。

4 まとめ

北九州市内21施設205検体の浴槽水のレジオネラ属菌の汚染調査を行ったところ、10施設42検体より生菌を検出した。生菌を検出した浴槽水のATP濃度は全て25.0RLU以上で生菌とATP濃度には相関を認めた。また、生菌を検出した浴槽水は全てLAMP法陽性であり、ATP・LAMP併用法はレジオネラ属菌のスクリーニング法として有効であると考えられた。ATP法の測定機器は小型軽量であり、浴槽水の汚れを把握することでレジオネラ属菌の繁殖しやすい環境を現場で確認し、引き続きLAMP法・EMA-LAMP法を実施することで当日中に生菌の存在を確定し迅速対応につながるものと考えられる。

謝辞

最後に、ATP測定装置を貸与していただきました(社)北九州市食品衛生協会に謝辞を申し上げます。

トッピングにも気をつけて ～海苔でもおこる食中毒～

環境局環境科学研究所 藤田景清

1 はじめに

黄色ブドウ球菌が原因の食中毒は本市では平成24年度には2件、平成25年度には1件発生している。本菌による食中毒の発生は食品中に増加したエンテロトキシンが原因で起きる食品内毒素産生型食中毒である。今回、市内イベント会場の仮設店舗で調理された瓦そばを原因食品とする食中毒を検査し若干の知見を得たので報告する。原因食品の調理済み瓦そばから黄色ブドウ球菌が検出されたのみならず、調理工程で使用される肉そぼろ(味付け牛肉)用ステンレスバットや調理従事者の手指のほか、トッピング具材のきざみ海苔(乾きのり)・肉そぼろ(味付け牛肉)・きざみネギからも同一菌を検出した。食中毒検査において原因食品の特定は困難なことであるが、今回トッピング具材からも原因菌を検出したことで本食中毒の事件発生までの原因菌および原因菌エンテロトキシンの増加推移を検証した。

2 いきさつ

本食中毒は平成23年6月に若松ポートイベントで仮設営業テントが調理販売した瓦そばに由来する。複数の患者便や検食、拭き取りの細菌検査から黄色ブドウ球菌(以下 ブ菌)コアグラゼⅦ型・エンテロトキシンA型による食中毒事件と断定した。トッピング具材からはきざみ海苔(乾きのり)・肉そぼろ(味付け牛肉)・きざみネギで同一ブ菌を検出し、錦糸卵・紅ショウガでは検出しなかった。調理工程ではトッピング直前に肉そぼろを再過熱していることから肉そぼろによるブ菌二次汚染はないと考えた。

保健所の食中毒調査から以下のことが判明した。

- (1) 肉そぼろは調理後常温で4時間程度放冷後に凍結し、イベント当日クーラーボックスで解凍しながら会場に運搬した。瓦そば調理前に再加熱している。
- (2) きざみ海苔は常温保存している。100g大袋のまま使用している。
- (3) 客からの注文後の調理ではなく、あらかじめ調理した瓦そばを店頭に並べて常温販売している。
- (4) 調理は素手では行っていない。(しかし細菌検査した結果、調理従事者の手指や肉そぼろ調理用バットのふき取りからも同一のブ菌を検出している。)

3 検査内容および結果・考察

(1) ブ菌生菌数およびブ菌エンテロトキシン含有量について

表1 ブ菌およびブ菌エンテロトキシン汚染状況

検査対象	ブ菌生菌数(cfu/g)	ブ菌エンテロトキシン含有量 (ng/100g)	1食あたりのブ菌エンテロトキシン含有量(ng/食)
きざみ海苔	240 (*1)	<25	
肉そぼろ	15800	50	20
きざみネギ	<30 (*1)	<25	
6月9日調理残品	22600	100	200
6月10日調理残品	50000	50	100

(*1) 生菌数は最確数法(MPN法)で測定

6/9および6/10残品のブ菌エンテロトキシン含有量は1食あたり200ng/100ngと食中毒を発症させるエンテロトキシン最小量に近い[参考文献1]。また、トッピング具材で生菌数およびエンテロトキシン量ともに多かった肉そぼろも調理時に再加熱しているため、菌は死滅していると推測された。この時点でどの食材が食中毒の直接的な原因となったかは具体的には不明であった。このことから本食中毒事件の発生機序を検証するため以下の検査を行った。

(2) きざみ海苔単体での生菌数の変化

きざみ海苔5gをそのまま36℃恒温槽で24時間培養したところブ菌の増加は認めなかった。これは本きざみ海苔の水分活性値をコンウェイ水分活性計で測定したところAw0.3であり、またブ菌が増殖するための最低水分活性値がAw0.86以上必要なことから菌増殖は起こらないとの結果と一致した^[参考文献1]。また、4℃冷蔵や-20℃冷凍保存においてもブ菌の増殖死滅は認めなかった。

(3) ブ菌添加による食品中での生菌数の変化

高圧蒸気滅菌した検食の瓦そば麺に既定数のブ菌を添加し36℃恒温槽で4時間および6時間培養したところ、4時間後には2.98倍、6時間後には7.53倍に生菌数は増加した。

(4) きざみ海苔培養液でのブ菌エンテロトキシン量の変化

検食のきざみ海苔5gを増菌ブイオンTSB（トリプトソイブイオン）45mlに浮遊し、36℃恒温槽で4時間振とう培養した。開始前きざみ海苔のブ菌エンテロトキシン含有量は100gあたり25ng未満であったが、振とう培養後には100gあたり100ngに増加した。

4 考察

ブ菌の増殖温度は5～47℃、ブ菌エンテロトキシンの産生温度は10～46℃と非常に幅広い。また、ブ菌が増殖するための最低水分活性値はAw0.86以上が必要であり、A型エンテロトキシンの産生にはAw0.92以上が必要とされている^{〔参考文献1〕}。

本食中毒におけるブ菌エンテロトキシンは以下の要因により増加したと推測した。

- (1) 肉そぼろをクーラーボックスで解凍中および運搬中に6月の初夏の外気温に長時間さらされていたため、ブ菌生菌数とブ菌エンテロトキシン量も表1の検査値より増加した。
- (2) 肉そぼろが調理前に再加熱されていることからブ菌生菌が死滅し、2日間とも残品の生菌数は爆発的な増加はしなかったが、ブ菌エンテロトキシンは耐熱性があり失活されないため調理済み瓦そば内で肉そぼろ由来のブ菌エンテロトキシン含有量が増加した。
- (3) 気密性の高い使い捨て発泡トレイ容器に調理した瓦そばを詰めトッピング具材のきざみ海苔をふりかけた後、高い外気温の店頭に陳列保管している間に、ブ菌増殖の最適な環境となりブ菌エンテロトキシン量が増加した。

5 まとめ

今回のブ菌食中毒では店頭販売した瓦そばを喫食した患者の残食や解凍後直前加熱された肉そぼろ残品がないためトッピング具材の原因を断定できなかったが、少なくともきざみ海苔の中でブ菌は生存しており本食中毒発生当時の状況では、発症量に達するまでのブ菌エンテロトキシン含有量の増加を引き起こす危険性を示唆させた。

本菌による食中毒予防は「食品に菌をつけない。」「食品についた菌をふやさない。」「食品についた菌をやっつける。」の3原則が非常に大切であると改めて再考すべき結果となった。

6 参考文献

- 1 (社)日本食品衛生協会編：食中毒予防必携 第2版, 63～71 (2007)