

(案)

微生物・ウイルス評価書

豆腐の規格基準改正に係る
食品健康影響評価

2017年 ○月

食品安全委員会

微生物・ウイルス専門調査会

1	<審議の経緯>	3
2	<食品安全委員会委員名簿>	3
3	<食品安全委員会微生物・ウイルス専門調査会専門委員名簿>	3
4	要 約	4
5	I 要請の経緯	5
6	1. 背景	5
7	2. 現行の豆腐の規格基準について	6
8	3. 評価要請の内容	6
9	4. 海外における無菌充填豆腐の規制状況	8
10	II 評価の基本的考え方	9
11	III ハザードとなり得る対象病原体について	9
12	1. ボツリヌス菌 (<i>Clostridium botulinum</i>)	11
13	2. セレウス菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	13
14	IV ハザードとなり得る対象病原体による健康被害解析	15
15	1. 引き起こされる疾病の特徴	15
16	2. 無菌充填豆腐による国内外における食中毒の発生状況	22
17	V ばく露評価	22
18	1. 無菌充填豆腐の細菌検出状況	22
19	2. 製造工程ごとのハザード制御	22
20	3. 成分規格の設定について	25
21	VI リスク特性解析	27
22	VI 食品健康影響評価	28
23	<略語一覧>	29
24	<参照>	30
25	別添資料	37
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		

1
2
3
4 **<審議の経緯>**

2017 年 4 月 12 日 厚生労働大臣より豆腐の規格基準の改正に係る食品健康影
響評価について要請、関係書類の接受
2017 年 4 月 18 日 第 646 回食品安全委員会（要請事項説明）
2017 年 5 月 24 日 第 69 回微生物・ウイルス専門調査会
2017 年 7 月 24 日 第 70 回微生物・ウイルス専門調査会
2017 年 9 月 15 日 第 71 回微生物・ウイルス専門調査会

5
6
7 **<食品安全委員会委員名簿>**

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
吉田 緑
山本 茂貴
石井 克枝
堀口 逸子
村田 容常

8
9
10 **<食品安全委員会微生物・ウイルス専門調査会専門委員名簿>**

岡部 信彦（座長）	鈴木 孝子
吉川 泰弘（座長代理）	砂川 富正
浅井 鉄夫	田村 豊
安藤 匡子	豊福 肇
大西 貴弘	野崎 智義
大西 なおみ	野田 衛
小坂 健	皆川 洋子
甲斐 明美	脇田 隆字
木村 凡	
工藤 由起子	
小関 成樹	

1 要 約

2

I 要請の経緯

1. 背景

豆腐については、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号。以下、「告示」という。）において 1974 年に規格基準が定められた（参照 1）。

当時、豆腐による人の健康危害のほとんどは、製造及び保管中における食品及び器具等の不衛生な取扱いにより、腸チフスや赤痢等の病原細菌に汚染されたことが原因とされた（参照 2）。そのため、豆腐の製造工程における細菌汚染をできるだけ少なくするよう製造基準が、細菌の増殖を防ぐためできるだけ低温で管理するよう保存基準が規定された。（参照 1）

昨今、技術の進歩に伴い、豆腐の原料である豆乳を連続流動式の加熱殺菌機で殺菌した後、殺菌・除菌した凝固剤を添加し、無菌的に充填を行った豆腐（以下「無菌充填豆腐¹」という。（参照 3，別添資料．平成 29 年 5 月 24 日．食品安全委員会 微生物・ウイルス専門調査会 資料．朝倉 宏．「無菌充填豆腐中の微生物に関する試験検査」）が製造されており、現在は、保存基準に基づき、冷蔵で流通している。

厚生労働省によると、常温保存の無菌充填豆腐は、既に欧州等諸外国への輸出実績及び米国での現地製造の実績がある。欧州等諸外国へ輸出されている無菌充填豆腐は、過去 10 年間に合計約 5,995 トン 常温で流通しており、食中毒等の健康被害の報告は確認されていない。また、米国で現地製造されている無菌充填豆腐は、過去 10 年間に約 52,000 トン 常温で流通しており、食中毒等の健康被害の報告は確認されていない。（参照 4、参照 5）

なお、連続流動式の加熱殺菌機で殺菌した後、無菌的に充填する技術については、既に牛乳等の常温保存可能品等の他の食品で用いられている技術である。厚生労働省は、無菌充填豆腐の細菌汚染に関する試験検査等調査（参照 3）²を実施し、これまでの実績及び調査結果を踏まえ、豆腐の規格基準の改正について、2016 年 11 月 29 日に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において審議し、了承された。

2017 年 4 月 12 日、食品安全委員会は、厚生労働大臣から、食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 1 項第 1 号に基づき、豆腐の規格基準

¹ 厚生労働省は、連続流動式の加熱殺菌機で殺菌した後、無菌的に充填を行った豆腐を「無菌充填豆腐」（厚生労働省．食品健康影響評価について．豆腐の規格基準の改正について．厚生労働省発生食 0412 第 1 号．平成 29 年 4 月 12 日）としているが、本評価書では、重要な工程である豆乳殺菌後に凝固剤を添加する工程を定義に追加している。

² 平成 27 年度に国立医薬品食品衛生研究所が実施し、無菌充填豆腐の最終製品において、一般細菌数、大腸菌群、好気性芽胞形成細菌、嫌気性芽胞形成細菌及び発育し得る微生物（恒温試験及び細菌試験）の試験結果が陰性であった。

の改正に係る食品健康影響評価について意見を求められた。

2. 現行の豆腐の規格基準について

現行の豆腐の製造基準及び保存基準は、以下に示すとおりである(参照 1)。

(1) 豆腐の製造基準

- ① 原料用大豆は、品質が良好できょう雑物を含まないものでなければならない。(以下、「製造基準の①」という。)
- ② 原料用大豆は、十分に水洗しなければならない。(以下、「製造基準の②」という。)
- ③ 豆汁又は豆乳は、沸騰状態で 2 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法により殺菌しなければならない。
- ④ 豆汁のろ過、凝固剤の添加及び豆腐の成型は、清潔で衛生的に行わなければならない。
- ⑤ 豆腐の水さらしは、絶えず換水をしながら行わなければならない。
- ⑥ 包装豆腐(豆乳に凝固剤を添加して容器包装に充てんした後加熱凝固させたものをいう。)は、90℃で 40 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法により殺菌しなければならない。
- ⑦ 豆腐を製造する場合に使用する器具は、十分に洗浄し、かつ、殺菌したものでなければならない。(以下、「製造基準の⑦」という。)
- ⑧ 豆腐を製造する場合に使用する水は、食品製造用水でなければならない。(以下、「製造基準の⑧」という。)

(2) 豆腐の保存基準

- ① 豆腐は、冷蔵するか、又は十分に洗浄し、かつ、殺菌した水槽内において、冷水(食品製造用水に限る。)で絶えず換水をしながら保存しなければならない。ただし、移動販売に係る豆腐及び成型した後水さらしをしないで直ちに販売の用に供されることが通常である豆腐にあつては、この限りでない。
- ② 移動販売に係る豆腐は、十分に洗浄し、かつ、殺菌した器具を用いて保冷をしなければならない。

3. 評価要請の内容

(1) リスク管理機関(厚生労働省)の考え方

現在、包装豆腐の規格基準で製造され、保存基準に基づき、冷蔵で保存している、無菌充填豆腐を常温で流通するためには、主原料の大豆が土壌由来細菌に汚染されている可能性があり、特に耐熱性を示す細菌(バチルス属菌やクロストリジウム属菌)等の芽胞形成細菌の制御が可能な殺菌条件が求

められる。このため、豆乳の殺菌に関しては、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の殺菌条件である 120℃・4 分間での殺菌と同等以上の条件を規定することが必要である。

また、豆乳を固めるための凝固剤は、食品添加物として製造されているものであり、凝固剤由来の特定のハザードとなる病原体は考えられないが、豆乳の殺菌後に添加されることから、発育し得る微生物を死滅させ又は除去するのに十分な効力を有する殺菌又は除菌が必要である。凝固剤を除菌する場合は、適切なフィルターを用い、豆腐製造中には、フィルター性能を恒常的に確認する方法、又は、これと同等以上の効力を有する方法により除菌することが必要である。

そして、これらの原材料を無菌充填が可能な機器を用いて、あらかじめ殺菌された適切な容器包装に無菌的に充填されることが必要である。

最終製品に対しては、常温下で長期流通することを考慮して、安全性の確保のため、成分規格として、発育し得る微生物が陰性であることが必要である。

さらに、「食品等事業者が実施すべき管理運営基準に関する指針」（平成 26 年 10 月 14 日付け食安発 1014 第 1 号。以下、「管理運営基準指針」という。）に基づき十分な衛生管理のもと、製造することが必要不可欠である。

（２）評価要請の内容

厚生労働省からの諮問は、（１）の考え方を踏まえ、以下のとおり、豆腐の製造基準の①、②、⑦及び⑧並びに「無菌充填豆腐に必要な条件」により製造された無菌充填豆腐について、現行の冷蔵保存から常温保存とした場合のリスクの比較について食品健康影響評価を依頼するものである。

＜豆腐の製造基準＞

- ・原料用大豆は、品質が良好できょう雑物を含まないものでなければならない。（製造基準の①）

- ・原料用大豆は、十分に水洗しなければならない。（製造基準の②）

- ・豆腐を製造する場合に使用する器具は、十分に洗浄し、かつ、殺菌したものでなければならない。（製造基準の⑦）

- ・豆腐を製造する場合に使用する水は、食品製造用水でなければならない。（製造基準の⑧）

＜無菌充填豆腐に必要な条件＞

- ① 原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を死滅させ、又は除去するのに十分な効力を有する次の全てを満たす方法で殺菌又は除菌を行うこと

- ・豆乳にあつては、120℃・4 分間と同等以上で殺菌すること
- ・凝固剤にあつては、衛生度の高い凝固剤を用いた上で、殺菌又は適切なフィルターを用い、かつ、製造時にフィルター性能を恒常的に確認する方法により除菌すること、又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと
- ② 無菌充填が可能な機器を用いて、あらかじめ殺菌された適切な容器包装を用いて、無菌的に充填されていること
- ③ 最終製品に対する、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の成分規格に規定する試験の結果、発育し得る微生物が陰性であること（参照 1）

4. 海外における無菌充填豆腐の規制状況

厚生労働省からの提出資料では、無菌充填豆腐に関して規格基準等を設定している国は確認できなかった。

なお、米国で製造され流通している無菌充填豆腐は、低酸性無菌充填食品に位置づけられ、その規制に従った製造が必要となっている。具体的には、無菌充填豆腐を製造する際には、低酸性食品の製造設備登録及び製品登録の規制（21 CFR part 108.35）に基づき食品工場登録を実施し、無菌処理工程に関する情報を FDA へ提出、登録する必要がある。さらに、加熱処理された密封容器の低酸性食品の規制（21 CFR part113）に基づき、コミッショナーの研修認証を受けた者の監督下での製造（Sec113.10）、GMP の適用（Sec 113.5）、設備と手段（Sec113.40）、Scheduled Process の設定（Sec 113.83）及び記録（Sec 113.100）に関する規制に従う必要がある。（参照 6, 参照 7, 参照 8, 参照 9）

また、EU における輸入 規制は、欧州議会及び理事会指令に規定されている。EU の市場に提供される輸入食品は食品規制関連法に適合しているか、又は EU と輸出国との間で最低でも EU178/2002 に記載されている要求事項と同等とみなされる状態であることが求められている。（参照 9, 参照 10）

Ⅱ 評価の基本的考え方

対象食品を厚生労働省から諮問された規格基準の改正内容に基づいて製造された無菌充填豆腐、対象者を日本に在住する全ての人とする。

評価に当たっては、無菌充填豆腐が常温下で長時間保存、流通されることを想定し、原料及び製造工程に由来し、人に健康被害を引き起こす可能性のあるハザードについて特定する。そして、それらのハザードについて、厚生労働省から諮問された改正内容に基づく殺菌、除菌等の工程におけるリスク低減効果、管理運営基準指針に基づき十分に衛生管理されること及び最終製品に対する安全確保のために成分規格（発育し得る微生物が陰性）が規定されることを踏まえ、現在、包装豆腐の規格基準に基づき冷蔵で保存されている無菌充填豆腐について、冷蔵保存から常温保存に変更した場合のリスクについて評価することとする。

Ⅲ ハザードとなり得る対象病原体について

現在、無菌充填豆腐は、豆腐の規格基準の包装豆腐として、サルモネラ属菌等の細菌を殺菌するため、90℃ 40 分間の条件で殺菌し、冷蔵保存で流通することにより安全性を担保している。

一方、今回の規格基準の改正内容は、充填後に常温で長期間保存することを前提としていることから、原料の大豆に存在する可能性があり耐熱性を示す芽胞形成細菌に対応するため、豆乳の殺菌について、「120℃・4 分間と同等以上」で殺菌すること、凝固剤については、衛生度の高い凝固剤を用いた上で、発育し得る微生物を死滅させ又は除去するのに十分な効力を有する殺菌又は除菌すること等を条件としている。無菌充填豆腐を現行の冷蔵保存から常温保存に変更した場合のリスクを評価するにあたり、ハザードとなり得る対象病原体について、以下のとおり整理した。

- ・ 耐熱性を示す芽胞形成細菌には、クロストリジウム属菌及びバチルス属菌等があるが、本評価では、以下の考えにより、その代表として、ボツリヌス菌及びセレウス菌を対象病原体として特定することとした。

クロストリジウム属菌については、耐熱性の高い細菌として、*Clostridium thermoaceticum* (参照 11, 参照 12) *Clostridium sporogenes* (参照 13) 等があるが、食中毒細菌としては、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) 及びウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が代表的である。ボツリヌス菌を死滅させる加熱条件にてウエルシュ菌の芽胞も死滅することから、ボツリヌス菌をハザードとなり得る対象病原体の代表と考えた。(参照 14)

1 バチルス属菌については、耐熱性の高い細菌として、*Bacillus circulans*、
2 *Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus coagulans* 等があり、このような
3 耐熱性の高い細菌は、缶・瓶詰め食品及び加熱包装食品の腐敗細菌として
4 重要（参照 15、参照 16）ではあるが、食中毒細菌としては、セレウス菌
5 （*Bacillus cereus*）をハザードとなり得る対象病原体の代表と考えた。

- 6 ・ サルモネラ属菌等については、今回の規格基準の改正内容の条件である
7 「120℃・4 分間と同等以上」による豆乳の殺菌並びに凝固剤の殺菌又は除
8 菌方法により、殺菌又は除菌できると考えられるため、ハザードとなり得
9 る対象病原体として特定しなかった。

- 10 ・ なお、耐熱性が高い毒素産生細菌は、加熱により菌が死滅しても、食品中
11 に残存した毒素が原因となって食中毒を起こすことがある。耐熱性が高い
12 毒素としては、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）の産生するエン
13 テロトキシン及びセレウス菌の産生するおう吐毒（セレウリド）がある。

14 2000 年～2016 年までの厚生労働省の食中毒統計に基づき、食中毒発生
15 事例を調査した結果、豆腐の喫食に伴って生じた黄色ブドウ球菌による健
16 康被害情報は報告されていない（参照 17）。また、公表されている文献・
17 データベース検索を通じ、1990 年～2016 年 2 月までの食中毒情報を調査
18 した結果、豆腐の喫食に伴って生じたセレウス菌による健康被害情報は報
19 告されていない（参照 18）。

20 これらのことを考慮すると、これまでの豆腐の衛生管理と同様に、製造
21 基準の①及び②並びに管理運営基準指針に基づき、適切に管理することで
22 毒素産生に必要とされる菌数まで増殖させないよう管理できると考えら
23 れる。そのため、耐熱性の高い毒素は、ハザードとして特定しなかった。

- 24 ・ ノロウイルス等のウイルスについては、今回の規格基準の改正における、
25 無菌充填豆腐の豆乳の殺菌条件「120℃・4 分間と同等以上」の処理により、
26 完全に不活化されると考えられる。

27 また、豆乳殺菌後の製造過程においては、適切な衛生管理が行われてい
28 る限り、ウイルスに汚染する可能性は容器の破損等の事故を除き、ほとん
29 どないと考えられる。

30 上記のことから、ウイルスについては、ハザードとなり得る対象病原体
31 として特定しなかった。

32 なお、食品添加物として製造された衛生的な凝固剤がウイルスに汚染さ
33 れている可能性はないと考えられるが、凝固剤の除菌にあつては、ろ過膜
34 の孔径サイズより小さいウイルスは、完全に除去できるとは限らないこと
35 に留意すべきである（参照 19）。

1. ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)

(1) 特徴

グラム陽性、偏性嫌気性、芽胞形成桿菌で、土壌、河川及び海洋に広く存在する(参照 20), 参照 21) {ICMSF, 1996, '#20'}{花岡正季, 1991, '#21'}。菌体の大きさは $0.3\sim0.7\times3.4\sim7.5\mu\text{m}$ とされている。ボツリヌス毒素には、抗原性が異なる A, B, C, D, E, F, G の 7 つの型が存在する。そのうちの A, B, E, F 型は、主にヒトのボツリヌス症と関連している。血清学的には 8 つの神経毒素が同定されている。(参照 20)

食品媒介性としてのボツリヌス症には、以下に示すものが知られている。(参照 22, 参照 23)

- ・ボツリヌス毒素に汚染された食品を摂取することにより発症するボツリヌス食中毒(食餌性ボツリヌス症)
- ・生後 1 年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス毒素の作用により発症する乳児ボツリヌス症
- ・成人及び 1 歳以上の小児が、乳児ボツリヌス症と同様の病態で、ボツリヌス毒素産生細菌が消化管内で増殖し産生されたボツリヌス毒素により発症する(消化管に器質的又は機能的異常があるか、抗菌薬を使用している場合が多いとされる)成人腸管定着ボツリヌス症

なお、近年、乳児ボツリヌス症の患者から分離された菌株から H 型の毒素の産生が認められたとする報告がある。(参照 24)

(2) 増殖条件

発育許容温度は $10\sim45^{\circ}\text{C}$ で、A 型菌と B 型菌の至適発育温度は 37°C とされている(参照 25)。 3°C 未満では菌は増殖及び毒素を産生することはできない(参照 26)。真空包装辛子蓮根に A 型菌を接種した試験では、 10°C 、 15°C 保存では菌数の増加が見られなかったのに対し、 25°C 保存では最初の接種菌数に関係なく、保存 7 日後より菌が増殖 し毒素産生が見られ、15 日後では大量の毒素産生が見られた(参照 25)。

ボツリヌス菌は、低 pH 又は低水分活性のものを除くほとんどの食品で発育し得る。ボツリヌス菌のうち、第 I 群菌に属するタンパク分解性の A, B, F 型菌のグループ(以下、「第 I 群菌」という。)では、pH が 4.6 未満、第 II 群菌に属するタンパク非分解性の B, E, F 型菌のグループ(以下、「第 II 群菌」という。)では、pH が 5.0 未満の条件では発育できないとされている。水分活性については、第 I 群菌では、水分活性 a_w 値として 0.94 未満、第 II 群菌では、 a_w 値として 0.97 未満の条件では発育できないとさ

れている。(参照 14)

微生物の増殖に影響を与える環境因子は、培地の構成、pH、水分活性、酸化還元電位、温度及び大気等様々であり、ボツリヌス菌のような芽胞形成細菌に関連したハザードを理解する上で、個々の芽胞の増殖能を予測することは重要である。ボツリヌス菌の芽胞が増殖を開始する時期(ラグタイム)は、発芽する間の芽胞の処理及び増殖条件に依存し、芽胞により多様であるとされている。(参照○Stringer SC et al. 2011)

(3) 失活条件(加熱条件)

ボツリヌス菌の芽胞のうち、第Ⅰ群菌は、耐熱性が高く、最も強い加熱条件を必要とし、低酸性缶詰食品の加熱条件(121℃ 3分)が適用される。この条件は、ボツリヌス菌の生存菌数を1/10に減少させる(90%を死滅させる)のに要する時間である D 値³の12倍である $12D$ 値⁴の条件であり、この過程によりウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)の芽胞も死滅させられるとしている。

ボツリヌス菌の芽胞の耐熱性については、第Ⅰ群菌が高いことが知られており、缶詰のハザードとして、第Ⅰ群菌が対象となっている。

第Ⅰ群菌の芽胞の121℃の D 値は0.1~0.2分と報告されている(参照 20)。缶詰産業において、芽胞数 10^{12} 個を1個に減少させる $12D$ の過程は、低酸性缶詰食品の最小加熱条件として使用され、第Ⅰ群菌の菌株では、121℃で $12 \times 0.2 = 2.4$ 分となる。食品内に残存したボツリヌス菌は食品内で致死性の神経毒を産生する可能性があることから、ボツリヌス菌は重要な懸念事項として挙げられている。(参照 27)

なお、市販の豆乳(pH 7.0、加熱殺菌済みの紙容器詰製品)を材料とし、豆乳中におけるボツリヌス菌芽胞(62A: ATCC7948の3株及びA90のA型計4株、BIG4、BLamanna及び213BのB型計3株、合計7株を用いた)の耐熱性を測定した結果に基づき、ボツリヌス菌の芽胞を死滅させるには、少なくとも121℃ 2分間の殺菌値(F 値⁵)が必要と予測さ

³ D 値：生存菌数を1/10に減少させる(つまり90%を死滅させる)のに要する加熱時間を時間単位で表したもの(D -value: Decimal reduction time)(参照. 食品安全委員会. 微生物・ウイルス評価書. 生食用食肉(牛肉)における腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌. 2011年8月)。

⁴ $12D$ 値： D 値の12倍の時間。芽胞数 10^{12} 個を1個に減少させ得る殺菌値。(参照. 一般社団法人日本医療機器学会. 医療現場における滅菌保証のガイドライン 2015. 2015年5月25日, 松田典彦 他. 1980. 食衛誌. 21(5): 398-404)

⁵ F 値：加熱(高圧蒸気又は乾熱)滅菌処理における微生物致死量であって、定められた z 値(D 値を10分の1に低減あるいは10倍に増大させるのに必要な温度)を持つ微生物に関して、規定された参照温度での等価な加熱時間(参照. 一般社団法人日本医療機器学

れ、また、常温下で流通販売される容器詰豆乳には、加熱温度 100～103℃では、121℃の F 値が 2 分間（120℃では 2.6 分間）に相当する加熱殺菌を施せばボツリヌス菌芽胞を死滅させることができると予測した報告がある。（参照 28）

一方、第Ⅱ群菌は、耐熱性が低く、90℃ 10 分又はこれと同等の加熱条件で失活する。（参照 14, 参照 29, 参照 30）

なお、ボツリヌスの毒素は、いずれも易熱性タンパクであり、80℃ 20 分又は 100℃ 1～2 分の加熱で失活する（参照 21）。

2. セレウス菌 (*Bacillus cereus*)

（１）特徴

グラム陽性、通性嫌気性、芽胞形成桿菌で、土壌、空気及び河川水等の自然環境をはじめ、農産物、水産物、畜産物等の食料、飼料等に広く分布する（参照 21, 参照 31）。菌体の大きさは 1.0～1.2×3～5 μm とされている（参照 32）。セレウス食中毒の主な原因食品はおう吐型では米飯類、麺類等による事例が多い。下痢型では肉類、野菜類、乳製品等、原因食品の種類は多様である。おう吐型食中毒の原因毒素はセレウリドであり、下痢型食中毒の原因毒素は、下痢原性毒素（エンテロトキシン）である。（参照 31, 参照 32）

（２）増殖条件

10～50℃で増殖し、至適増殖温度は 28～35℃とされている。7℃以下の低温で増殖する菌株の存在も報告されている。（参照 32）

セレウス菌の増殖及び生残性は菌株により異なる。至適増殖温度は、30～40℃とされている。同様に最低増殖 pH についても菌株によって様々であり、酸性度に依存する。一般的に、塩酸により酸性化させた pH4.8 の培地又は乳酸により酸性化させた pH5.6 の培地では増殖しない。食中毒菌株の増殖における水分活性の影響については報告が少ないが、水分活性 a_w 値として 0.92～0.93 の以下の条件下では増殖できないとされている。（参照 33）

微生物の増殖挙動におけるラグタイムは、その細胞の履歴及び初期菌数等、複合要因が影響するとされ、完全には解明されていないが、セレウス菌のラグタイムの予測モデルを示した報告がある。食塩濃度 0.5%、pH6.0 で温度を 10℃、15℃、20℃とした際のセレウス菌の増殖挙動を調

べた結果、ラグタイムは温度により変化し、温度が低いほどラグタイムは長くなることが示された。(参照○Koseki and Nonaka 2012)

(3) 失活条件 (加熱条件)

セレウス菌の芽胞は高い耐熱性を示し、90℃ 60 分の加熱に抵抗性を示す。0.067M のリン酸緩衝液 (pH 7.0) で懸濁した芽胞の 121.1℃の *D* 値は培養株の違いにより 0.03~2.37 分であったとする報告がある (参照 33, 参照 34)。オイル中の芽胞は熱抵抗性が 10 倍以上高くなるとされ、使用する懸濁液の種類により *D* 値は大きく異なり (参照 32)、大豆油中における 121.1℃の *D* 値が 30 分、オリーブオイル中の 121.1℃の *D* 値は 17.5 分であったとする報告がある。(参照 33, 参照 35)

2005 年の EFSA の意見書 (以下、「EFSA (2005 年)」という。) では、加熱はセレウス菌の芽胞の制御に最も効果的な方法であり、105℃ 3 時間の加熱により、加熱耐性の高い菌株を 5 log 減少させることができるとされ、105℃より高い温度での加熱は、ほとんどの場合において、セレウス菌の危害から食品を守ることができるとしている。また、缶詰製造に用いられる加熱条件のみがセレウス菌の芽胞を完全に殺滅できるとしている。(参照 36)

別の研究結果として、豚肉ランチョンミートを 70℃2 分間加熱調理した結果、セレウス菌の栄養細胞では菌数の 6 log 減少が認められたが、芽胞の不活化には 105℃で 36 秒間の加熱が必要であったとしている。(参照 37)

なお、セレウリドは 126℃ 90 分の加熱処理でも失活しない一方で、下痢型のエンテロトキシンは熱に感受性があり、56℃ 5 分の加熱処理により不活化される (参照 33)。

IV ハザードとなり得る対象病原体による健康被害解析

1. 引き起こされる疾病の特徴

(1) ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) による食中毒

ボツリヌス中毒は本菌が食品の保存中に産生する菌体外毒素を摂取することによって起こる。原材料の芽胞汚染の機会が多いため、嫌気性下で長期保存された食品中における毒素産生が食中毒発生の必要条件とされる。主な原因食品は、野菜及び果実の缶詰・瓶詰、食肉及び食肉加工製品、魚及び魚製品（日本では、魚を用いた発酵食品のいずし⁶等）がある。（参照 20, 参照 21, 参照 38, 参照 39）

近年では、2012 年 3 月に鳥取県で発生した岩手県の業者が製造したあずきぱっとう⁷による食中毒事例がある。全国各地でしばしばボツリヌス食中毒の発生が確認され、1951 年以降、2012 年 4 月までに 120 事例の報告がある（患者数 542 名、死者数は 113 名）。（参照 23, 参照 38, 参照 40, 参照 41, 参照 42, 参照 43）

ボツリヌス中毒の潜伏期間は、病型・ばく露毒素量・個体によって異なるが、一般的には 8～36 時間とされている。神経症状の発現の前におう吐、下痢の胃腸炎症状がみられることもある。ボツリヌス中毒の特異症状としては、倦怠感、眼瞼下垂などの視神経麻痺、嚥下困難などの咽頭喉麻痺があり、筋麻痺から呼吸困難となり死に至ることがある。（参照 21）

なお、米国における 31 の食中毒関連病原体について、病原体ごとに致死率を推定した結果では、ボツリヌス菌の致死率は 17.3%と推定されている（参照 52）。

国内で発生したボツリヌス中毒の主な事例を、以下の表 1 に示した。

⁶ いずし：生魚と米飯と麴を交互に重ねて樽につめ、3～4 週間自然に発酵させたすしの原型というべきもの（参照. 阪口玄二, 「ボツリヌスと私」, 食品と微生物, 1990, 7(1): 43-46）。

⁷ あずきぱっとう：ぜんざいの餅の代わりに平打ちのうどんが入った食品。

（参照.厚生労働省, 「ボツリヌス食中毒の発生について」平成 24 年 3 月 26 日）

1 表 1. 国内で発生したボツリヌス菌による食中毒の主な事例

事例発生年月	発生場所	原因食品	毒素型	患者数/ 喫食者数	死者数	食品中の菌数又は毒素量
1951 年 5 月	北海道	ニシンの いずし	E 型	14/24	4	
1953 年 10 月	秋田県	小鯛のい ずし	E 型	4/6	2	
1955 年 9 月	青森県	サンマの いずし	E 型	7/12	3	
1969 年 8 月	宮崎県	瓶入り輸 入キャビ ア	B 型	21/65	3	
1973 年 7 月	滋賀県	ハス（淡 水魚）の いずし	E 型	3/3	2	
1976 年 8 月	東京都	さつまあ げ	A 型	2/4	1	
1981 年 3 月	福島県	アユのい ずし	E 型	2/3	0	
1984 年 6 月	熊本県 *	カラシレ ンコン (真空包 装)	A 型	36/不明	11	食品中の毒素 量：原因食品 1 g あたり 24 ～ 21,844**マウス LD ₅₀ ⁸ (ip)
1984 年 12 月	北海道	ハタハ タ・サケ のいずし	E 型	6/34	0	
1993 年 1 月	秋田県	里芋の缶 詰	A 型	4/4	0	
1995 年	北海道	サケのい	E 型	6/8	0	

⁸ マウス LD₅₀: ボツリヌス毒素の最も感度が高くかつ確実な毒素検出法はマウスバイオアッセイであるとされている。毒素の定量試験については、試料を 10 倍及び 2 倍段階希釈してマウスに注射して最小致死量を決める方法、マウスの尾静脈内に毒素を注射し、マウスが死亡する時間を測定することによって毒素の LD₅₀ を算定する方法等が用いられている。毒素濃度が高い場合には、マウス尾静脈内に試料 0.1 ml を注射し、致死に至る時間を求め、用量 - 致死曲線から毒素濃度を算出し、試料 g あたりに換算する。(参照 社団法人日本食品衛生協会, 厚生労働省 監修, 食品衛生検査指針 微生物編 2004 年, 2015 年)

<u>10 月</u>		<u>ずし</u>				
<u>1997 年</u> <u>2 月</u>	<u>福島県</u>	<u>いわなの</u> <u>いずし</u>	<u>E 型</u>	<u>1/1</u>	<u>0</u>	
<u>1998 年</u> <u>7 月</u>	<u>東京都</u>	<u>輸入グリ</u> <u>ーンオリ</u> <u>ーブ(瓶</u> <u>詰)</u>	<u>B 型</u>	<u>18/50</u>	<u>0</u>	
<u>2012 年</u> <u>3 月</u>	<u>鳥取県</u>	<u>あずきば</u> <u>っとう</u>	<u>A 型</u>	<u>2/2</u>	<u>0</u>	<u>食品中の毒素量:</u> <u>原因食品 1 g あ</u> <u>たり 約 75,000</u> <u>マ ウ ス LD₅₀</u> <u>(iv)***</u>

*1984 年の熊本県の事例では、患者の発生は 14 都府県にまで広がった。

**検体の毒素量（マウス LD₅₀）は、製造日及び検査検体の部位（中央部又は端部）によ
って幅がある。本検査の毒素量（マウス LD₅₀）は、毒素をマウス腹腔内に投与した算定
方法である。

***本検査の食品中の毒素量（マウス LD₅₀）は、毒素をマウス静脈内に投与した算定方法
である。

****菌量又は毒素量について参照中に情報の無いものは記載していない。

（参照 23、参照 40、参照 41、参照 42、参照 43、参照 44、参照 45、参照 46、参照 47、参照
48、参照 49、参照 50、参照 51）から引用、作成。

発症に必要なボツリヌス菌数は 10⁴以上とされ（参照 53）、一般的に毒
素を産生する菌数は食品 1 g あたり 10⁴～10⁵個とされている（参照 38）。
また、少なくとも 30 ng の毒素の摂取により、ヒトが発症及び致死とな
るとされている（参照 54）。別の報告では、ヒトにおける A 型毒素の致
死量は、0.1～1.0 µg と推定されている（参照 20）。あずきばっとうの事
例では食品中の毒素量（マウス LD₅₀）の推定結果 として、あずきばっ
とう 1 gあたり約 75,000 マウス LD₅₀の毒素が検出された（参照 40、参
照 55）。

（2）セレウス菌（*Bacillus cereus*）による食中毒

セレウス菌は環境に広く分布しているため、食品への汚染の機会が多
く、食料・食材・調理加工食品の衛生的な取扱いがなされなかった場合、
腐敗・変敗、食中毒をもたらすことがあり、食品衛生上重要視される（参
照 56）。

セレウス菌を原因とする食中毒事件数は年間 20 件未満と少ないが、患者数は多い年では 700 人を超えている。原因食品としては米飯類、スパゲッティ等が多い。(参照 57)

セレウス菌食中毒は食中毒の臨床症状から、以下に示すような①おう吐型又は②下痢型の 2 つの異なる発症様式に分けられる (参照 32)。

①おう吐型食中毒

おう吐型食中毒の場合には、*B. cereus* が増殖する際に食品中で生成されたセレウリドを摂取した後、潜伏期間 0.5～6 時間を経て悪心、おう吐を主症状として発症する。まれに下痢を併発することもあるが、発熱はほとんどない。症状持続時間は 6～24 時間とされている。ごくまれな例として、おう吐型食中毒では、劇症肝不全と脳浮腫による死亡事例、代謝性アシドーシス⁹及び肝不全を併発して喫食後 13 時間で急死した事例、急性脳症の事例などがある (参照 32)。

セレウス菌のおう吐型食中毒は、国内で頻繁にみられている (参照 56)。国内で発生したおう吐型食中毒の主な事例を、以下の表 2 に示した。

表 2. 国内で発生したセレウス菌によるおう吐型食中毒の主な事例

事例発生 年月	発生 場所	原因食品	患者数/ 喫食者数	死者 数	食品中の菌数又は毒 素量
1977 年 9 月	大阪 府	給食弁当	9/ 13	0	食品中の菌数: 2.0×10^6 CFU / g 及び 2.6×10^7 CFU / g
1977 年 10 月	大阪 府	パック弁 当	211/ 1,809	0	食品中の菌数: おにぎり弁当 (5 検体) $7.5 \times 10^7 \sim 9.0 \times 10^8$ CFU/ g 巻ずし弁当 (2 検 体) 8.0×10^3 CFU/ g 及 び 1.7×10^4 CFU/ g

⁹ 代謝性アシドーシス：酸塩基平衡を酸性側にしようとする状態をアシドーシスという。代謝性アシドーシスは、固定酸（生体内で生じる酸のうち炭酸以外の酸）が増加する乳酸アシドーシス、糖尿病性ケトアシドーシス、腎不全、サリチル酸中毒等及び重炭酸イオン (HCO_3^-) が過剰に排泄されて生じる下痢、腎尿細管アシドーシス等がある。(参照. 日本救急医学会. 医学用語解説集)

					いなりずし弁当（3 検体） $1.1 \times 10^3 \sim 9.5 \times 10^4$ CFU/ g
1981 年 7 月	千葉 県	豆腐のお から	172/338	0	食品中の菌数： 4.5×10^9 CFU/ g
1987 年 9 月	東京 都	幕の内弁 当	318/1,666 (喫食者数 は推定)	0	食品中の菌数： 詳細不明。
1997 年 4 月	北海 道	豚しゃぶ サラダ (ゆでた 豚肉と野 菜のサラ ダ)	36/98	0	食品中の菌数： 詳細不明。
1998 年 10 月	愛媛 県	米飯（推 定）	516/1,092	0	食品中の菌数： 詳細不明。
2001 年 12 月	熊本 県	あん入り 餅	346/441	0	食品中の菌数： $4.4 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^6$ CFU/ g 食品中のセレウリド 量: 160 ng/ g
2009 年 6 月	福岡 県	学生寮で 提供され た炒飯	8/11	0	食品中の菌数: 実際に 喫食された食品は保 存されておらず、検査 は実施できなかった。 炒飯の具材（加熱済 み）から検出された菌 数： 4.2×10^3 CFU/ g

1 *寒天培地で菌数を計数しているものには CFU と記載のないものにも CFU を付記した。

2 **菌量又は毒素量について参照中に情報の無いものは記載していない。

3 参照 58, 参照 59, 参照 60, 参照 61, 参照 62, 参照 63, 参照 64 から引用、作成。

4

②下痢型食中毒

下痢型食中毒の場合には、食品中で増殖した *B. cereus* を摂取し、腸管内で増殖して毒素が産生される（参照 18）。潜伏期間 8～16 時間を経て腹痛、水様下痢を発症するが、おう吐、発熱はほとんどないとされ、症状持続期間は 12～24 時間、まれに数日とされている。（参照 32）

ごくまれな例として、下痢型食中毒では、血性下痢を発症した死亡事例がある（参照 32）。

セレウス菌による臨床症状としては、まれな例として、免疫能が未熟あるいは低下した状態、神経形成術、脳内シャント¹⁰施行などの生体バリアの低下した状態にあるヒトにおけるセレウス菌敗血症、急性の髄膜脳炎などの症例発生の報告がある（参照 65, 参照 66, 参照 67, 参照 68）。

なお、米国における 31 の食中毒関連病原体について、病原体ごとに致死率を推定した結果では、セレウス菌の致死率は 0 %と推定されている（参照 52）。

発症に必要なセレウス菌数として、諸外国のリスク管理機関及び評価機関では、セレウス菌食中毒については、多くの事例の情報から、ほとんどの事例におけるセレウス菌の菌数は、食品 1 g あたり $10^5 \sim 10^8$ 個の細胞又は芽胞であるとしている（参照 18, 参照 36, 参照 69, 参照 70）。香港の食物安全中心（Centre for food Safety）の食品中の微生物のガイドラインでも同様に、ヒトへの健康影響を引き起こすと考えられる食品中のセレウス菌数は、食品 1 g あたり 10^6 個の細胞又は芽胞より多いと位置づけ、ヒトの疾病に関連するような菌数は、大部分は食品 1 g あたり $10^5 \sim 10^8$ 個の細胞又は芽胞であるとしている（参照 71）。

一方、ニュージーランドの Ministry for Primary Industries (MPI) による乳製品中のセレウス菌に係るリスクプロファイル（2016 年）では、ほとんどの事例におけるセレウス菌の菌数は、食品 1 g あたり $10^5 \sim 10^8$ 個の細胞又は芽胞であるとする EFSA（2005 年）に対して、以下の理由によりその解釈は単純ではないとしている。

¹⁰ シャント: シャント手術は、たまってしまう脳脊髄液を体内の他の場所へ逃がす手術で、脳脊髄液の流れ道を新たに作る、いわゆるバイパスのようなもの。（参照. 一般社団法人 日本脳神経外科学会. 「シャント手術」脳神経外科疾患情報ページ）

①毒素産生量は菌株により異なり、同じ毒素量でもいくつかの菌株では、大量の菌数が必要となること。

②セレウリドは耐熱性が高いため、加熱処理された食品中セレウス菌自体は存在しない、又はわずかしかなかった場合であってもヒトに健康影響を引き起こすレベルのセレウリドが存在しうることを挙げている。(参照 72)

発症に必要な毒素量については、菌株、食品及び条件に依存するとされている。様々な論文の情報に基づいたまとめとして、セレウリドの摂取量が 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重であると例示している報告がある (参照 73)。

また、セレウリドによる食中毒事例の原因食品とされたパスタ料理に含まれていたセレウリド量を、*in vitro* の精子運動抑制試験¹¹及び液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) により測定、分析した結果からは、事例の原因食品中には、約 1.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ のセレウリドが含まれていたとされ、患者が喫食したパスタの量を 300 g と推定した場合、400～500 μg のセレウリドを摂取したことになり、体重を 60 kg と仮定すると、ヒトの発症に必要な毒素量は 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重以下であるとされた (参照 74)。

国内では、1974 年～1999 年に日本で発生したおう吐型食中毒とみなされた 14 の事例の原因食品中のセレウリド量を調べた報告がある。本報告では、ヒトの上皮細胞 HEP-2 細胞 (ヒト喉頭がん由来細胞株) を用いて、セレウリドによる細胞の空胞化活性を指標としてセレウリド量を測定している。その結果、事例の原因とされた焼き飯、焼きそば、カレーライス、スパゲッティ、麺類及びご飯といった食品 1 g あたりに含まれていたセレウリド量は、0.01～1.28 μg であった (参照 75)。

また、別の報告では、上記報告とも重複していると考えられるが、9 つのおう吐型食中毒事例の原因食品中のセレウリド量は、食品 1 g あたり 0.02～1.28 μg であったとする結果をもとに、一般的な喫食量からヒトにおけるセレウリドの最少発症毒素量を、およそ 1 μg 程度と推定している (参照 76, 参照 77)。

¹¹ 精子運動抑制試験 : Andersson らが 1998 年に発表した、ブタの精子をセレウス菌株又はセレウス菌に汚染された食品の抽出物に 24 時間ばく露させ、精子運動の抑制を調べる方法。精製セレウリドを用いた試験において、50%影響濃度は、ブタの精子 1 ml あたり 0.5 ng のセレウリドとされている。(参照. Andersson MA et al. A Novel Sensitive Bioassay for Detection of Bacillus cereus Emetic Toxin and Related Depsipeptide Ionophores. Applied And Environmental Microbiology. 1998. 64(4): 1338-1343)

本研究では、Andersson らの方法を改変した方法を用いている。

2. 無菌充填豆腐による国内外における食中毒の発生状況

既に欧州等諸外国へ輸出されている無菌充填豆腐は、過去 10 年間に合計約 5,995 トン常温で流通しているが、食中毒等の健康被害の報告は確認されていない。また、米国で現地製造されている無菌充填豆腐は、過去 10 年間で約 52,000 トン常温で流通しているが、食中毒等の健康被害の報告は確認されていない。(参照 4、参照 5)

V ばく露評価

1. 無菌充填豆腐の細菌検出状況

厚生労働省から提出された国内で製造されている無菌充填豆腐 2 製品 240 検体についての細菌検出状況の調査結果では、一般細菌数、大腸菌群、好気性芽胞形成細菌、嫌気性芽胞形成細菌が全て陰性及び容器包装詰加圧加熱殺菌食品の成分規格である発育し得る微生物の試験が全て陰性であったと報告されている(別添資料)。

なお、豆類加工品及び豆腐におけるセレウス菌の汚染状況については、以下のような報告がある。

- ・1998 年～2006 年に東京都内の市場に流通する各種食材、加工食品、調理食品等を対象に、セレウリド産生性セレウス菌の汚染状況を調査した結果の中で、豆類の加工品として、豆乳 1 検体からセレウリド産生株が検出され、その菌数は 50 CFU/g であった(参照 57)。
- ・種々の食品からのセレウス菌の検出状況を調べた報告の中で、野菜、果実及びその加工品(豆腐、果実、ナッツ、野菜)からは 51～56%の率で検出され、特に豆腐の汚染率が高かった(参照 56)。
- ・豆腐は一般的にセレウス菌の汚染率が高いと考えられているが、細菌の増殖は製品によって異なり、毒素の産生性は低いとされ、研究に用いられた大部分の製品は陰性であった(参照 75)。

2. 製造工程ごとのハザード制御

(1) 豆乳製造工程

①原料大豆の選別、洗浄、浸漬工程

これまでの包装豆腐と同様に、原料大豆について、品質が良好できょう雑物を含まないものを使用し、十分に水洗いすることにより、土壌由来細菌による汚染が低減されることが考えられる。

さらに、ボツリヌス菌及びセレウス菌の増殖についての既往の科学的知見に照らし合わせて考えると、浸漬工程においても、管理運営基準指針に基づき、適切に管理されることにより、偏性嫌気性細菌であるボツリヌス菌の

増殖は考えにくい。また、セレウス菌の増殖の程度は、浸漬工程におけるセレウス菌にとっての培地は低栄養成分とみなせる水であること及び芽胞が発芽し、増殖を開始するまでに一定の時間を要することから、限られると考えられる。なお、加熱処理（ヒートショック）により芽胞の発芽誘導を行うことなしに培地の代わりに水中でセレウス菌の芽胞の挙動をみた結果では、3 時間経過してもほとんど芽胞の発芽はみられなかった（参照○Lovdal et al. 2011）。

②豆乳の殺菌工程

豆乳の殺菌については、発育し得る微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法として、厚生労働省は、豆乳の殺菌条件を 120℃・4 分間での殺菌又は同等以上としている。

a. ボツリヌス菌の失活条件（加熱条件）

ボツリヌス菌を加熱殺菌の対象とする場合の失活条件は、芽胞数 10^{12} 個を 1 個に減少させ得る殺菌値に相当する加熱処理であるとされている。なお、A 及び B 型ボツリヌス菌 8 株の芽胞を用いてリン酸緩衝液（pH7.0）中におけるボツリヌス菌の芽胞の耐熱性を調べ、得られた耐熱性値に基づき、120℃における 12D 値を算出した結果は、1.2～2.7 分であり、4 分を超えるものはなかったとする報告がある。（参照 78）

b. セレウス菌の失活条件（加熱条件）

セレウス菌芽胞の加熱耐性については、ばらつきが報告されている。EFSA（2005 年）では、セレウス菌の加熱耐性の幅は広いとされている（参照 36）。EFSA（2005 年）のパネルでは、低酸性食品の缶詰に用いられるボツリヌス菌を不活化する加熱処理 121℃ 3 分という条件は、セレウス菌の芽胞も死滅させることができるとした（参照 36）。そして、2016 年の EFSA の意見書においても、2005 年のパネルの意見を支持している。（参照 69）

EFSA（2005 年）に引用されているセレウス菌株の失活条件（加熱条件）についての情報は以下のとおりである。

(a) 種々の起源の菌株の芽胞を用いて、pH 7.0 のリン酸緩衝液中の 90℃における D 値は、4.6 分～200 分未満と幅があり、中央値は 9.2 分であった（参照 79）。

(b) 米国（菌株の分離源は不明）、ロシア（菌株の分離源は不明）、ベルギー（菌株の分離源は不明）、ベルギー（豆のスープから分離された菌株）、英国（調理米から分離された菌株）、米国（缶詰のスープから分離された菌株）といった種々のセレウス菌株を pH8.3 のイオン交換水に入れて加熱した試験の結果では、これらの菌株の 100℃の D 値は、0.6～27

分であった。一番高い耐熱性を示した菌株は、米国（缶詰のスープから分離された菌株）の Bradshaw らの分離した菌株 (Brad 2 株) であり、115℃の *D* 値は 1.8 分であった。（参照 80）

(c) 腐敗した野菜の缶詰(缶詰のスープ)から分離された菌株の 130℃の *D* 値はおよそ 0.3 分であった（参照 36）。分離した菌株の中で耐熱性の高い菌株（Culture 2, 上記 Brad 2 株と同じ）について、0.067 M のリン酸緩衝液に懸濁して加熱した試験では、115.6℃の *D* 値は 11.44 分、121.1℃における *D* 値は 2.37 分、129.4℃における *D* 値は 0.28 分であった。（参照 34）

(d) 調理済みチルド食品に含まれていた野菜から分離された菌株の芽胞の 105℃の *D* 値は 0.63 分であったと報告されている（参照 81）。

(e) セレウス菌の芽胞の加熱耐性は pH により変化し、95℃におけるセレウス菌の芽胞の生残性は、pH を 6.2 から 4.7 に減少させると、3 倍減少するという報告（参照 82）及び pH7 から pH4 に酸性化させた場合には、103℃の *D* 値が 5 倍減少したという報告（参照 83）がある。

本調査会では、以下の理由から、2017 年時点で再現可能な科学的知見に基づいて考えると、殺菌前の製造工程が適切に管理された豆乳を「120℃・4 分間」で加熱殺菌することにより、セレウス菌についても死滅させることができる判断した。

・(c)は、1975 年の Bradshaw らの報告であり、極めて高い耐熱性が報告されているが（参照 34）{Bradshaw JG, 1975, #34}、この報告以降、近年の水系（aw=0.999）における報告では、最大でも、115℃の *D* 値が 0.25 分であり、121℃の *D* 値が 0.44 分の報告もあるが、これは高食塩水濃度環境下（aw=0.750）の特異な環境下であり、それ以外の報告は確認できなかった。

・また、(b)は 1987 年の報告であり、(c)で、Bradshaw らが分離した菌株 (Brad 2 株) を用いて 0.067 M のリン酸緩衝液に懸濁して加熱した知見も含まれている。一番高い耐熱性を示した菌株は、米国（缶詰のスープから分離された菌株）の Brad 2 株であり、115℃の *D* 値は 1.8 分と、(c)で報告された耐熱性より低かった。（参照 79）

・セレウス菌の耐熱性は、菌株間の差異のほか、調整方法によっても大きく異なるとされ、芽胞形成（実験的調整）時の温度や、芽胞のコア¹²の構成

¹² 芽胞のコア：芽胞の中心部分のコア（core）は細胞質に相当し、核酸及び種々の酵素等が含まれている（参照. 渡部一仁. 細菌芽胞（孢子）－その特徴と調製法, 抵抗性試験法, 第 14 改正日本薬局方での関連記載項目および芽胞形成菌管理の意義. PDA Journal of

イオン量 (Ca^{2+} 、 K^{+} 等) も耐熱性の影響因子として重要であると報告されている。さらに、他の環境因子も耐熱性に関連していると考えられる。

(参照 84, 参照 85)

・種々の菌株のセレウス菌を用いた上述の(a)及び(d)並びに(e)のような失活条件 (加熱条件) の報告があり、これらの結果から、 $120^{\circ}\text{C} \cdot 4$ 分間の加熱処理で豆乳中に残存しうるセレウス菌を死滅させることが可能である。

(参照 79、参照 81、参照 82, 参照 83)

(2) 凝固剤の添加工程

豆乳の殺菌後に添加する凝固剤については、無菌充填豆腐に必要な条件 (参照 3)にある、発育し得る微生物を死滅させ又は除去するのに十分な効力を有する方法により適切な殺菌又は除菌が行われることが確保されることを前提とすれば、凝固剤の添加工程でハザードが混入することは考えにくい。

(3) 無菌充填工程

殺菌された豆乳に殺菌又は除菌された凝固剤を添加し、容器包装に無菌的に充填する工程については、既に牛乳等の常温保存可能品等の他の食品で多くの使用実態のある技術であり、厚生労働省が諮問内で規定する、無菌充填が可能な機器を用いて、あらかじめ殺菌された適切な容器包装を用いて、無菌的に充填されることが確保されることを前提にすれば、無菌充填工程において、ハザードが混入することは考えにくい。

充填後、無菌充填技術を用いて製造され常温保存で長期間流通している牛乳等の常温保存可能品等の他の食品と同様に、流通販売過程等における荷積等の運搬に伴う外圧等の種々の物理的影響に耐え、破損等による微生物の汚染を防止できる容器包装を用いることを前提にすれば、無菌充填工程後の保管、流通、小売、さらに消費者の保管中に、ハザードが混入することは考えにくい。

3. 成分規格の設定について

厚生労働省が示す、無菌充填豆腐に必要な条件では、最終製品に対して、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の成分規格に規定する試験の結果、発育し得る微生物が陰性であることとされている。(参照 3)

容器包装詰加圧加熱食品の規格基準が規定された際の通知 (昭和 52 年 3 月

23 日付け環食第 52 号) では、成分規格について、常温下で長期流通する食品であることを考慮して定められたものであるとし、「発育し得る微生物が陰性」であることとは、恒温試験を 14 日間行った結果、容器包装の膨張又は漏えいを認めず、かつ、その検体について細菌試験を行った結果、培養基のいずれにも菌の増殖を認めないこととしている (参照 86)。

本評価において、ハザードとなり得る対象病原体として特定した、ボツリヌス菌及びセレウス菌は、当該試験において検出されることから、発育し得る微生物が陰性の成分規格を規定し、最終製品が成分規格に適合しているかを確認することにより、適切な管理の下に製造されたことを検証することができる。

VI リスク特性解析

厚生労働省が示す無菌充填豆腐の条件によって製造された無菌充填豆腐について、現行の冷蔵保存から常温保存にした場合のリスクについて推定する。

無菌充填豆腐が常温下で長期間保存、流通することを推定すると、ハザードとなり得る対象病原体として特定したボツリヌス菌及びセレウス菌が当該食品の最終製品に残存した場合、人に健康被害を引き起こすリスクとなる。

そのため管理運営基準指針に基づき十分に衛生管理されることを前提として、厚生労働省が条件として示す無菌充填豆腐の製造工程及び最終製品に対する成分規格による、ボツリヌス菌及びセレウス菌が残存するリスクを取り除く効果について検討する。

無菌充填豆腐の豆乳の殺菌後にボツリヌス菌及びセレウス菌が残存するリスクについては、以下の知見等により製造工程において、十分にリスクを取り除くことができると判断する。

- ・原料大豆は、品質が良好できょう雑物を含まないものが使われること。
- ・原料大豆は、十分に水洗いされること。
- ・ボツリヌス菌及びセレウス菌の増殖について、既往の科学的知見に照らし合わせて考えると、浸漬工程において、管理運営基準指針に基づき適切に管理されることにより、偏性嫌気性細菌であるボツリヌス菌の増殖は考えにくく、また、セレウス菌の増殖の程度は限られると考えられること。
- ・ボツリヌス菌は、豆乳の殺菌条件（120℃・4 分間と同等以上）により、死滅すること。
- ・セレウス菌は、豆乳の殺菌条件（120℃・4 分間と同等以上）により、死滅すること。
- ・既に常温で流通している、欧州等諸外国へ輸出又は米国で現地製造されている無菌充填豆腐による、食中毒等の健康被害の報告はこれまで確認されていないこと（参照 4、参照 5）。

豆乳殺菌後の凝固剤の添加及び無菌充填工程については、厚生労働省が規定する規格基準及び管理運営基準指針に基づき適切に管理されていることを前提とした場合、ハザードとなり得る対象病原体であるボツリヌス菌及びセレウス菌に汚染されるリスクが高まるとは考えにくい。

1	VI	食品健康影響評估
2		

1 <略語一覧>

略語	名称
EFSA	European Food Safety Authority (欧州食品安全機関)
EU	European Union (欧州連合)
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (液体クロマトグラフ質量分析)
LD ₅₀	Lethal Dose ₅₀ (半数致死量)
MPI	Ministry for Primary Industries (ニュージーランド第一次産業省)
食物安全中心	Centre for food Safety (香港食品安全センター)

2

1 <参照>

- 2 1. 厚生省. 食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号)
- 3 2. 中岡愛子. 中岡愛子. 店頭露出飲食品の細菌学的研究 第一報 特に「豆腐漬
- 4 水」の細菌学的考察. 食物学会誌. 1958. 5: 50-59
- 5 3. 厚生労働大臣通知 平成 29 年 4 月 12 日付け 厚生労働省発生食 0412 第 1 号
- 6 食品健康影響評価について. 別添 豆腐の規格基準の改正について
- 7 4. 厚生労働省提出資料. 海外輸出品出荷実績について. 2017 年 7 月 14 日
- 8 5. 厚生労働省提出資料. 無菌充填豆腐に係る施設からの報告事項. 2017 年 7 月
- 9 11 日
- 10 6. FDA CFR-Code of Federal Regulations Title 21. PART 108. EMERGENCY
- 11 PERMIT CONTROL
- 12 7. FDA CFR-Code of Federal Regulations Title 21. PART 113. THERMALLY
- 13 PROCESSED LOW-ACID FOODS PACKAGED IN HERMETICALLY
- 14 SEALED CONTAINERS
- 15 8. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug
- 16 Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- 17 Submitting Form FDA 2541 (Food Canning Establishment Registration)
- 18 and Forms FDA 2541d, FDA 2541e, FDA 2541f, and FDA 2541g (Food
- 19 Process Filing Forms) to FDA in Electronic or Paper Format: Guidance
- 20 for Industry. 2016
- 21 9. 厚生労働省提出資料. 欧州への輸出及び米国での生産に関する無菌充填豆腐
- 22 の規制状況. 2017 年 5 月 19 日
- 23 10. REGULATION (EC) No 178/2002 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT
- 24 AND OF THE COUNCIL. 28 January 2002. laying down the general
- 25 principles and requirements of food law, establishing the European Food
- 26 Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety
- 27 11. 山本和則, 神谷隆久, 小室道彦, 掛札しげ子, 村上りつ子, 高井勝美. フラ
- 28 ットサワー変敗しるこ缶詰から分離した好熱性, 偏性嫌気性有芽胞細菌の性
- 29 状について. 食衛誌. 1984. 25(3): 233-240
- 30 12. 山本和則, 神谷隆久, 小室道彦, 掛札しげ子, 村上りつ子, 一条悟朗. フラ
- 31 ットサワー変敗原因クロストリジウムの亜硫酸塩及び熱に対する耐性につ
- 32 いて. 食衛誌. 1988. 29(4): 256-261
- 33 13. 蜂須賀養悦. 芽胞 (細菌孢子) の耐熱性の機構. 化学と生物. 18(11): 731-739
- 34 14. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the
- 35 request from the Commission related to Clostridium spp in foodstuffs.
- 36 The EFSA Journal. 2005. 199: 1-65

15. 宮本敬久. 食品における耐熱性芽胞形成菌の生育特性と制御. 日本食品微生物学会雑誌. 2009. 26(2): 92-97
16. 中條均紀, 森山裕子. *Bacillus coagulans* 選択培地ならびに耐熱性孢子検出法の開発. 日本食品工業学会誌. 1994. 41(4): 281-286
17. 厚生労働省 食中毒統計資料 平成 12 年 (2000 年) ~平成 28 年 (2016 年) http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-2
18. FOOD STANDARDS Australia New Zealand (FSANZ). Imported food risk atatement. Bean curd and *Bacillus cereus*. 2016. 1-4
19. WHO. Annex 6. WHO good manufacturing practices for sterile pharmaceutical products. WHO Technical Report Series. 2011. No. 961: 261-284
20. ICMSE. MICROORGANISMS IN FOODS 5. 1996.5. *Clostridium botulinum*
21. 花岡正季. 細菌性食中毒とその予防 (2) . 生活衛生. 1991. 35(4): 301-307
22. 国立感染症研究所. ボツリヌス症をひきおこす細菌について. 2017 年 5 月 19 日 改訂
23. 国立感染症研究所 レファレンス委員会 地方衛生研究所全国協議会. ボツリヌス症. 2012 年 12 月 07 日
24. Barash JR, Arnon SS. A Novel Strain of *Clostridium botulinum* That Produces Type B and Type H Botulinum Toxins. The Journal of infectious Diseases. 2014. 209: 183-191
25. 伊藤 武, 坂井千三. 主な食中毒起因細菌の食品中における増殖について. 食衛誌. 1989. 30(2): 123-137
26. CODEX STAN 311-2013. Standard for Smoked Fish, Smoke-Flavoured Fish and Smoke-Dried Fish. P. 8-9
27. FAO. Assessment and management of seafood safety and quality. 2014. 1-432
28. 松田典彦, 駒木 勝, 市川良子. 豆乳中における A 及び B 型ボツリヌス菌芽胞の耐熱性. 食品衛生学雑誌. 1988. 29(2): 151-155
29. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Report on Vacuum Packaging and Associated Processes. 1992. 1-69
30. 阪口玄二. ボツリヌス症 ー病因、病形、発病機構、診断と治療 - IASR. 2008. 29: 37-38
31. 熊谷 進 編集代表, 小久保彌太郎, 小沼博隆, 豊田正武 編集. HACCP:衛生管理計画の作成と実践. 改訂データ編. 中央法規.8. セレウス菌. P. 122-

- 141
32. 仲西寿夫, 丸山 務 監修. 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規
33. ICMSF. MICROORGANISMS IN FOODS 5. 1996. 2. *Bacillus cereus*
34. Bradshaw JG, Peeler JT, Twedt RM. Heat Resistance of Ileal Loop
Reactive *Bacillus cereus* Strains Isolated from Commercially Canned
Food. *Applied Microbiology*. 1975. 30(6): 943-945
35. Molin N, Snygg BG. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial
spores. *Applied Microbiology*. 1967. 15(6): 1422-1426
36. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus*
cereus and other *Bacillus spp* in foodstuffs. *The EFSA Journal*. 2005.
175:1-48
37. Byrne B, Dunne G, Bolton DJ. Thermal inactivation of *Bacillus cereus*
and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork lucheon
roll. *Food Microbiology*. 2006. 23: 803-808
38. 熊谷 進 編集代表, 小久保彌太郎, 小沼博隆, 豊田正武 編集. HACCP:
衛生管理計画の作成と実践. 改訂データ編. 中央法規. 6. ボツリヌス菌. P.
100-111
39. 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針. 微生物編. 2015
40. 鳥取県衛生環境研究所 上田裕, 花原悠太郎, 独立行政法人国立病院機構
米子医療センター 阪本智宏, 鳥取県西部総合事務所生活環境局 松村
毅, 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 北村勝, 百瀬愛佳 他. 鳥
取県で発生した国内 5 年ぶりとなる食餌性ボツリヌス症. *IASR* 2012. vol.
33: 218-219
41. 阪口玄二. ボツリヌスと私. *食品と微生物*. 1990. 7(1): 43-46
42. 北海道立衛生研究所. 三田村 弘, 小笠原和夫, 砂川紘之, 中根正行, 衛生部
環境衛生課. 竹村恒男. 16 昭和 42 年北海道に発生した「いずし」による
ボツリヌス E 型の食中毒例について. *北海道立衛生研究所報* 1968. 第 18
集. 104-107
43. 大友良光, 豊川安延. 1991 年青森県内で発生した 2 事例の E 型ボツリヌス
食中毒. 1992. *食品と微生物*. 1992. 9(3): 177-181
44. 東京都立衛生研究所 坂井千三. 東京都内に発生したボツリヌス A 型菌に
よる食中毒 (昭和 51 年). *食衛誌*. 1982. 23(2): 204-205
45. 福島県衛生公害研究所 宇寿山満. 福島県におけるボツリヌス菌食中毒と
その疫学背景の考察(昭和 56 年). *食衛誌*. 1982. 23(6): 497-498
46. 国立感染症研究所感染症情報センター, 熊本県衛生公害研究所 道家 直,
熊本市保健衛生研究所 竹田哲郎 他. からしれんこんによるボツリヌス

- 1 中毒事件の概要. IASR. 1984. 5: 1-3
- 2 47. 熊本県衛生公害研究所 道家 直. からし蓮根を原因食とするボツリヌス中
3 毒. 食衛誌. 1985. 26(5): 536-537
- 4 48. 北海道立衛生研究所. 相川孝史, 三田村弘, 武士甲一, 亀山邦男: 北海道衛
5 生部食品衛生課: 北海道釧路保健所. いずしによるボツリヌス中毒. 食衛
6 誌. 1985. 26(5): 545-546
- 7 49. 秋田県湯沢保健所. 白井 一. 缶詰の里芋による A 型ボツリヌス食中毒.
8 食衛誌. 1994. 35(5): 551-552
- 9 50. 北海道保健環境部食品衛生課 高橋俊幸. サケのいずしによるボツリヌス
10 菌中毒. 食衛誌. 1996. 37(5): 246
- 11 51. 渡部勝彦. 3. いわなのいずしによるボツリヌス中毒. 食衛誌. 1998. 39(2):
12 196-197
- 13 52. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL,
14 Jones JL, Griffin PM. Foodborne Illness Acquired in the United States-
15 Major Pathogens. Emerging Infectious Diseases. 2011. 17(1): 7-15
- 16 53. 伊藤 武. 厨房をおびやかす病原菌ー食品から施設までー. 生活衛生. 2001.
17 45(1): 3-13
- 18 54. Peck MW. Clostridium botulinum and the safety of minimally heated,
19 chilled foods: an emerging issue? Journal of Applied Microbiology. 2006.
20 101:556-570
- 21 55. 飯島義雄, 坂本裕美子, 綿引正則, 大西貴弘, 五十君静信. 事例に学ぶ細菌
22 学. 日本細菌学雑誌. 2014. 69(2): 349-355
- 23 56. 上田成子. 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 12 セレウス菌.
24 Bokin Bobai 2007. Vol. 35(11): 761-777
- 25 57. 新井輝義, 千葉隆司, 秋場哲哉, 門間千枝, 仲間晶子, 甲斐明美. 各種食品
26 のセレウス菌汚染状況と分離菌株の嘔吐毒産生性. 東京都健康安全研究セ
27 ンター年報. 2012. 63: 173-179
- 28 58. 安川 章, 岡田陽一, 宮本三郎, 吉村 陽, 福島 猛, 種村昌城 他. 大阪
29 市内で発生した *Bacillus cereus* によると推定される嘔吐型食中毒例につい
30 て. 食品衛生学雑誌. 1979. 20(8): 186-191
- 31 59. Shinagawa K, Matsusaka N, Konnuma H, Kurata H. The Relation
32 Between the Diarrheal and other Biological Activities of *Bacillus cereus*
33 Involved in Food Poisoning Outbreaks. Jpn. J. Vet. Sci. 1985. 47(4): 557-
34 565
- 35 60. 小野功二. 観劇幕の内弁当によるセレウス菌食中毒. 食品衛生学雑誌. 1988.
36 29(5): 356-357

61. 引木 満. 6. 給食によるセレウス菌食中毒. 食品衛生学雑誌. 1998. 39(2): 200-201
62. 三好喜代. 9. 昼食弁当によるセレウス菌食中毒. 食品衛生学雑誌. 1999. 40(5): 387-388
63. 熊本市環境総合研究所 松岡由美子, 新屋拓郎, 藤井幸三. あん入り餅を原因とする嘔吐型セレウス菌による食中毒事例-熊本市 - 初めての健康機器管理対策部設置-. IASR. 2
64. 麻生嶋七美, 吉澤千尋, 江渕寿美, 宮基良子, 樋脇 弘. 学生寮で発生したセレウス菌食中毒. 平成 21 年度 福岡市保健環境研究所所報. 35: 69-71
65. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. Clinical Microbiology reviews. 2010. 23 (2): 382-398
66. Jang J-W, Jun JS, Park YH, Kim JE, Kim SY. A case of fulminant *Bacillus cereus* meningoencephalitis after neuroplasty with white matter change. Neurology Asia. 2013. 18 (3): 315-317
67. Stevens MP, Elam K, Bearman G. Meningitis due to *Bacillus cereus*: A case report and review of the literature. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2012. 23 (1): 16-18
68. Rhee C, Klompas M, Tamburini FB, Fremin BJ, Chea N, Espstein L et al. Epidemiologic Investigation of a Cluster of Neuroinvasive *Bacillus cereus* Infections in 5 patients With Acute Myelogenous Leukemia. Open Forum Infectious Diseases. 2015.
69. EFSA. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. The EFSA Journal. 2016. 14(7):4524
70. BfR. *Bacillus cereus*. 2017
71. 食物安全中心 Centre for Food Safety. Microbiological Guidelines for Food, For ready-to-eat food in general and specific food items. 2014. 1-38
72. New Zealand Government.Ministry for Primary Industries. RISK PROFILE: BACILLUS CEREUS IN DAIRY PRODUCTS. MPI Technical Paper. 2016. No. 2016/58: 1-93
73. Rajkovic A. Microbial toxins and low level of foodborne exposure. Trends in Food Science & Technology. 2014. 38: 149-157
74. Jääskeläinen EL, Teplova V, Andersson MA, Andersson LC, Tammela P, Andersson MC et al. In vitro assay for human toxicity of cereulide, the emetic mitochondrial toxin produced by food poisoning *Bacillus cereus*.

- Toxicology in Vitro. 2003. 17(5-6): 737-744
75. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. Int J Food Microbiol. 2002.73(1):23-27
63. Naranjo M, Denayer S, Botteldoorn N, Delbrassinne L, Veys J, Waegenaere J, Sirtaine N, Driesen RB, Sipido KR, Mahillon J, Dierick K. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. Journal of Clinical Microbiology. 2011. 49(12): 4379-4381
76. 安形則雄, 太田美智男. *Bacillus cereus* の食中毒毒素. 日本細菌学雑誌. 1996. 51(4): 993-1002
77. 梶田弘子, 岩渕香織, 藤井伸一郎, 畠山えり子. LC/MS/MS による嘔吐毒セレウリドの分析. 岩手県環境保健研究センター 年報. 2007. 7: 75-78
78. 松田典彦, 駒木勝, 松縄桂子. A および B 型ボツリヌス標準菌株の芽胞の耐熱性. 食衛誌. 1980. 21(5): 398-404
79. Dufrenne J, Soentoro P, Tatini S, Day T, Notermans S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. International Journal of Food Microbiology. 1994. 23: 99-109
80. Rajkowski KT, Mikolajcik EM. Characteristics of selected strains of *Bacillus cereus*. Journal of Food Protection. 1987. 50(3): 199-205
81. Fernández A, Ocio MJ, Fernández PS, Rodrigo M, Martínez A. Application of non-linear regression analysis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenic strains of *Bacillus cereus* spores. Food Microbiology. 1999. 16: 607-613
82. Fernández A, Collado J, Cunha LM, Ocio MJ, Martínez A. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate. Int J Food Microbiol. 2002. 77(1-2): 147-153
83. Mazas M, Lopez M, Gonzalez I, Gonzalez J, Bernardo A, Martin R. Effects of the heating medium pH on heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Journal of Food Safety. 1998. 18: 25-36
84. González I, López M, Martínez S, Bernardo A, González J. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. International Journal of Food Microbiology. 1999. 51: 81-84
85. Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. Journal of Applied Microbiology. 2006. 101: 514-525
86. 厚生省. 環食第 52 号 厚生省環境衛生局長通知 食品衛生法施行規則及び食

品、添加物等の規格基準の一部改正について 昭和 52 年 3 月 23 日

- . Stringer SC, Webb MD, Peck MW. Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. Food Microbiology. 2011. 28: 228-235
- . Koseki S, Nonaka J. Alternative Approach To Modeling Bacterial Lag Time, Using Logistic Regression as a Function of Time, Temperature, pH, and Sodium Chloride Concentration. Applied and Environmental Microbiology. 2012. 78(17): 6103-6112
- . Løvdal IS, Hovda MB, Granum PE, Rosnes JT. Promoting *Bacillus cereus* Spore Germination for Subsequent Inactivation by Mild Heat Treatment. Journal of Food Protection. 2011. 74(12): 2079-2089

- 1 別添資料
- 2 平成 29 年 5 月 24 日． 食品安全委員会 微生物・ウイルス専門調査会 資料.
- 3 朝倉 宏. 「無菌充填豆腐中の微生物に関する試験検査」
- 4

無菌充填豆腐中の微生物に関する 試験検査

国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
朝倉 宏

豆腐の種類(1)

・木綿豆腐

純木綿または普通豆腐と呼ばれていたもので、日本古来の豆腐を指す。原料に対し、約10倍量の水を加え、豆乳濃度6~8%、塩化マグネシウム(にがり)の凝固剤、硫酸カリウム(すまし粉)等を使用して凝固熟成後、荒し(崩し)と湯取りを行い成形、水切り、カット、水晒し、冷却したもので、製造設備が十分整備されていなかった時代には理想的な加工方法とされた。現在は、凝固後の湯取りをせず、成型、水切り、カット、水晒し、冷却したものが主体となっている。

・絹ごし豆腐

グルコノデルタラクトンの使用と同時に普及した豆腐で硫酸カルシウムを併用し製造されていた。豆乳濃度10%以上の豆乳と凝固剤を同時に容器内で短時間に凝固させ、熟成後、カット、水晒し、包装したもの。

豆腐の種類(2)

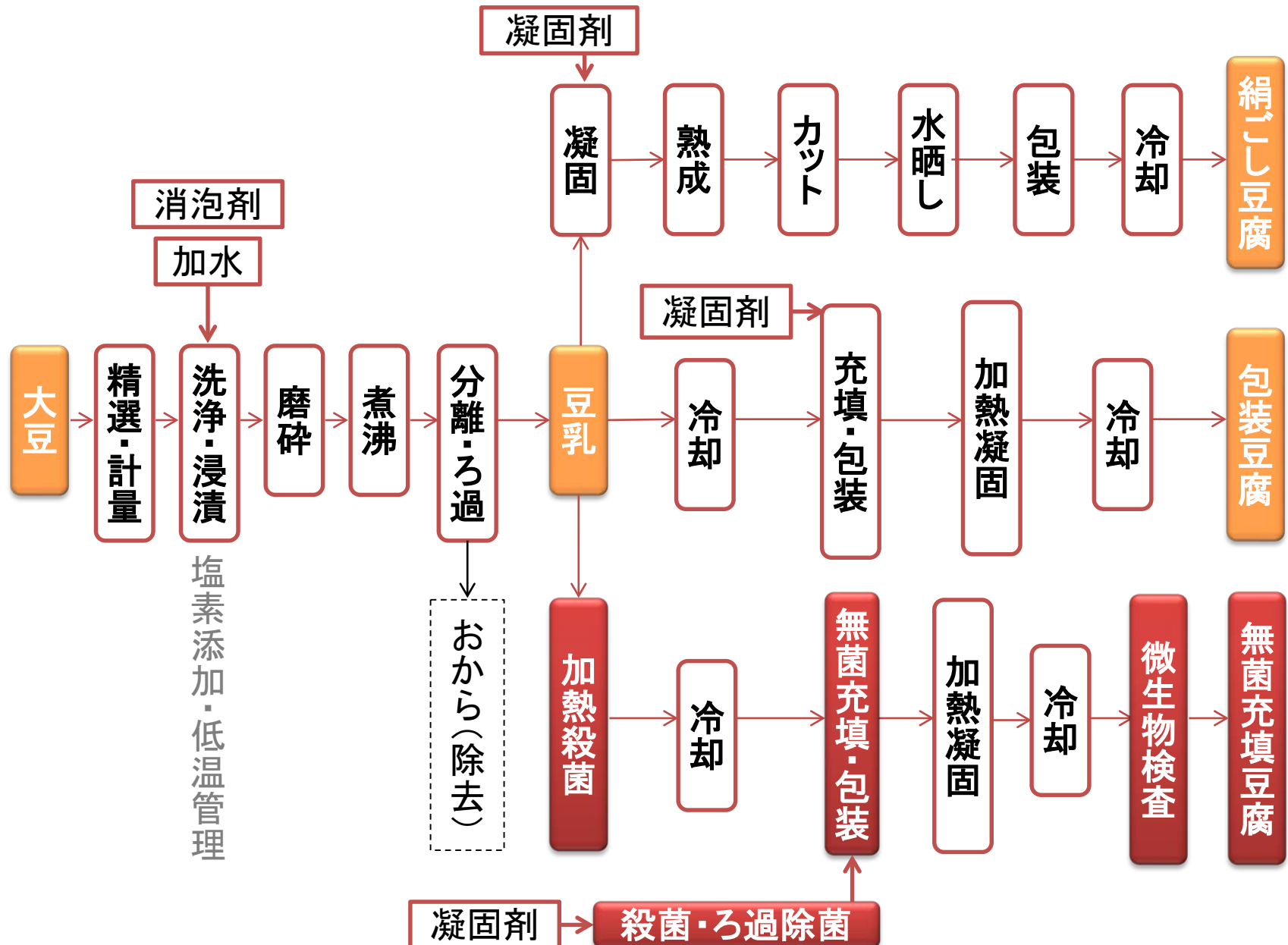
- 包装豆腐

豆乳に凝固剤を添加して、容器包装に充填した後加熱凝固させたもの(殺菌方法は90℃・40分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法)。

- 無菌充填豆腐

120℃・4分と同等以上の加熱殺菌条件にて製造した豆乳を冷却し、殺菌又はろ過除菌した凝固剤を無菌充填装置を用いて充填した後、凝固させることで無菌性を担保したもの。

豆腐の製造工程概要



豆腐製品の細菌検出状況

絹ごし豆腐製品(8製品・24検体)

- 一般細菌数は、平均 2.5×10^3 CFU/g (7製品・15検体で陽性)
- 大腸菌群は、1検体から検出 (1.0×10^3 CFU/g)

包装豆腐製品(8製品・24検体)

- 一般細菌数は、平均 3.4×10^{-1} CFU/g (5製品・13検体で陽性)
- 大腸菌群は検出されず
- バチルス属菌が5製品13検体より検出(特に*B. licheniformis*)

無菌充填豆腐(2製品・240検体)

- 一般細菌数、大腸菌群、好気性芽胞形成菌、嫌気性芽胞形成菌(全て陰性)
- 発育し得る微生物(恒温試験・細菌試験)(全て陰性)

無菌充填豆腐の製造工程(例)

<仕込み工程>

大豆の選別

前処理（粗選・研磨・石抜等）

洗殻・水浸漬

塩素添加・低温管理

摩砕・蒸煮・分離脱水

<豆乳製造・殺菌工程>

ヒートショック

加熱殺菌

120℃・4分間と同等以上

脱気冷却

凝固剤：受入れ検査+ろ過性能確認+従業員指導及び健康管理等によりハザードを除外

<無菌充填工程>

凝固剤の
殺菌・ろ過除菌

圧力による性能確認

包材殺菌

（過酸化水素水）

HEPA

無菌充填・シール・容器成型

アルミ層を含む合成樹脂加工紙

<加熱凝固工程>

加熱凝固

冷却

<貯蔵・出荷工程>

金属探知機

外包装

貯蔵・出荷

発育し得る微生物が陰性

無菌充填豆腐に必要な条件

＜仕込工程＞

- 原料用大豆は、品質が良好できょう雑物を含まないものでなければならない。
- 原料用大豆は、十分に水洗しなければならない。

＜豆乳製造・殺菌工程＞

- 原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を死滅させ、又は除去するのに十分な効力を有する、次の全てを満たす方法で殺菌又は除菌を行うこと。
 - ・豆乳にあっては、120℃で4分間と同等以上で殺菌すること
 - ・凝固剤にあっては、衛生度の高い凝固剤を用いた上で、殺菌又は適切なフィルターを用い、かつ、製造時にフィルター性能を恒常的に確認する方法により除菌すること又はこれと同等以上の効力を有する方法で行うこと。

＜無菌充填工程＞

- 無菌充填が可能な機器を用いて、あらかじめ殺菌した適切な容器包装を用いて、無菌的に充填されていること

＜貯蔵・出荷工程＞

- 最終製品に対する、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の成分規格に規定する試験の結果、発育し得る微生物が陰性であること

＜工程全体＞

- ・豆腐を製造する場合に使用する器具は、十分に洗浄し、かつ、殺菌したもの。
- ・豆腐を製造する場合に使用する水は、食品製造用水でなければならない。

現行の製造基準も重要な事項と考えられる。(黄色ブドウ球菌等の汚染リスクの除外に有効)

無菌充填豆腐の製造工程で想定される 微生物危害要因

- 仕込み工程（原材料及びその取扱い時）
耐熱性芽胞形成菌（ボツリヌス菌等）の混入
黄色ブドウ球菌等の混入
- 豆乳製造、加熱凝固、充填、貯蔵・出荷工程
耐熱性芽胞菌（ボツリヌス菌等）の生残
ろ過不備等による微生物汚染

無菌充填豆腐の製造工程を通じた細菌汚染動態

衛生指標菌数（平均値・CFU/g）						
施設	検体	検体数	一般細菌	大腸菌群	好気性芽胞形成菌	嫌気性芽胞形成菌
A	原料大豆	3	7.9E+03	ND	3.5E+03	ND
	浸漬大豆	3	4.3E+06	ND	3.4E+05	ND
	加熱殺菌後凝固剤添加前の豆乳	3	ND	ND	ND	ND
	最終製品	63	ND	ND	ND	ND
B	原料大豆	4	8.2E+03	3.8E+03	9.1E+03	ND
	浸漬大豆	4	7.3E+04	2.5E+04	4.9E+04	ND
	加熱殺菌前凝固剤添加前の豆乳	4	1.25E-01	ND	1.25E-01	ND
	加熱殺菌後凝固剤添加前の豆乳	4	ND	ND	ND	ND
	最終製品	64	ND	ND	ND	ND

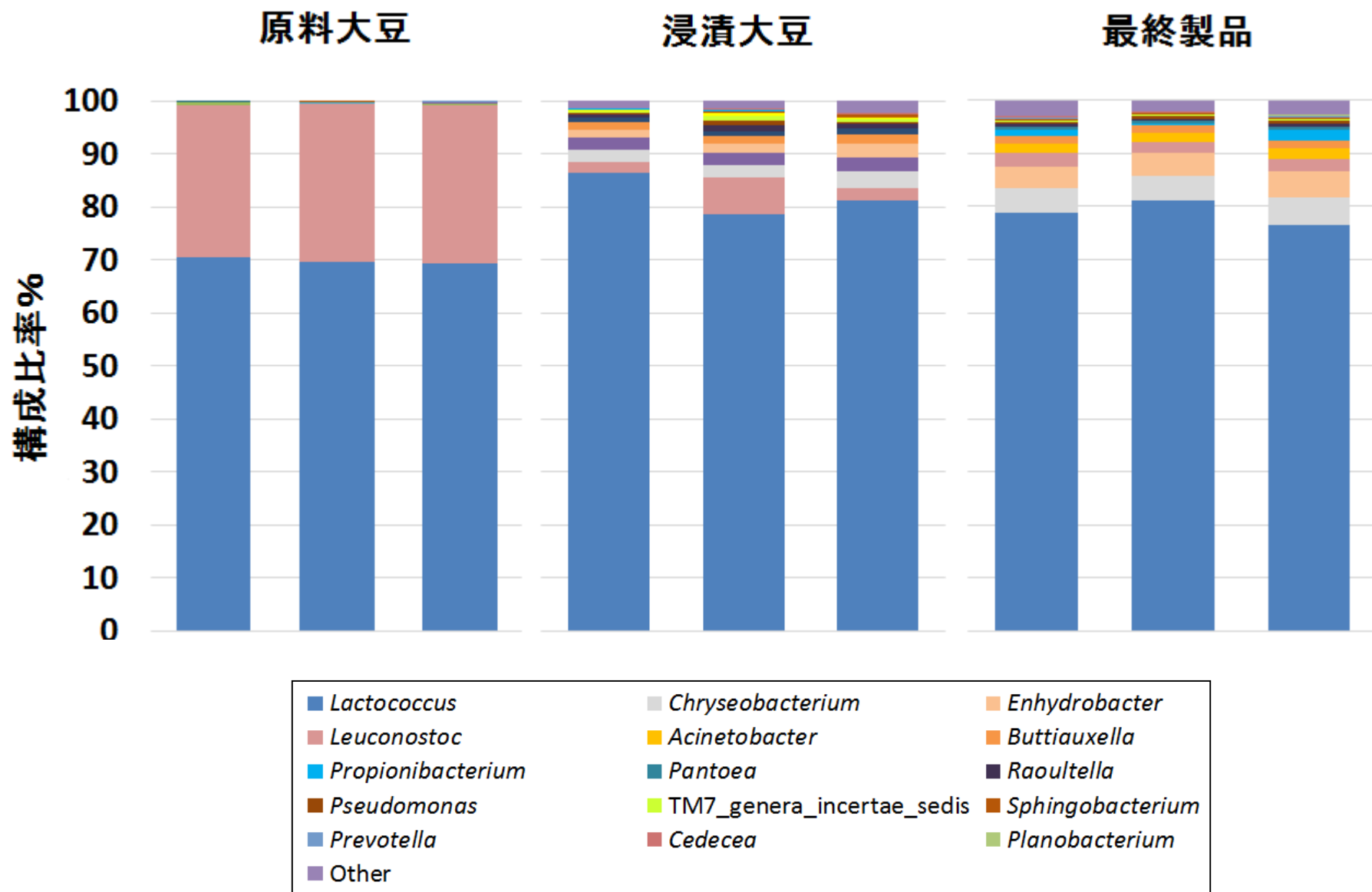
（ND, 検出されず）

無菌充填豆腐の製造環境における細菌検出状況

施設	検体	検体数	衛生指標菌数（平均値・CFU/g）			
			一般細菌	大腸菌群	好気性芽胞形成菌	嫌気性芽胞形成菌
A	大豆秤量槽内壁	4	9.8E+01	ND	ND	ND
	大豆浸漬槽内壁	4	3.9E+05	4.0E+01	3.8E+05	1.5E+03
	床（豆乳製造殺菌）	2	1.0E+05	ND	1.8E+05	ND
	床（充填）	2	1.2E+02	ND	6.0E+02	ND
B	大豆秤量槽内壁	4	7.0E+02	ND	2.0E+02	2.5E+00
	大豆浸漬槽内壁	4	2.7E+07	5.0E+05	9.4E+06	2.9E+04
	床（豆乳製造・殺菌）	2	1.1E+04	2.5E+01	5.2E+03	ND
	床（充填）	4	8.8E+03	5.0E+01	1.8E+03	ND

（ND, 検出されず）

無菌充填豆腐の製造工程(A社)における構成菌叢動態



Staphylococcus属菌の検出状況

単位(%)

区分	工程	Staphylococcus	Escherichia/Shigella
環境	大豆秤量槽内部	2.4028	0.5222
		3.7045	0.0219
		1.0865	0.0873
	大豆浸漬槽内部	0.0000	0.0021
		0.0064	0.0000
		0.0000	0.0000
製品	原料大豆	0.0000	0.0000
		0.0000	0.0000
		0.0000	0.0000
	浸漬大豆	0.0000	0.0000
		0.0000	0.0044
		0.0000	0.0052
	加熱凝固前	0.0000	0.0000
		0.0000	0.0000
		0.0000	0.0000
	最終製品	0.0000	0.0000
		0.0000	0.0000
		0.0000	0.0000

原材料取扱い時の汚染は想定されるが、その後の洗浄等で十分に低減可能

容器包装詰加圧加熱殺菌食品の微生物規格基準

～危害要因、保存流通形態等の共通性を踏まえて～

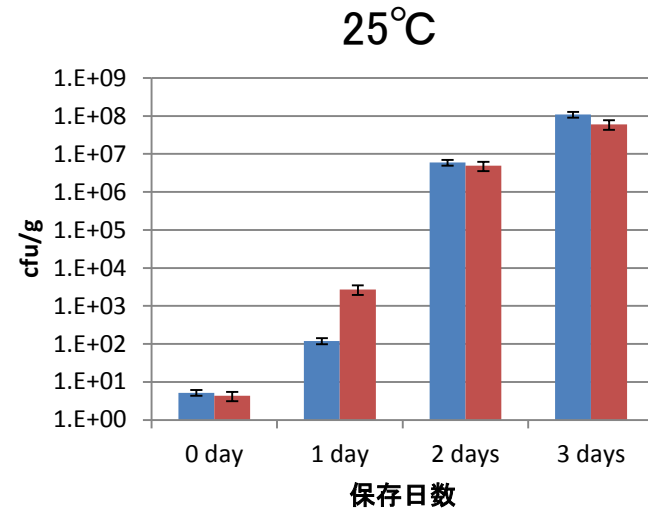
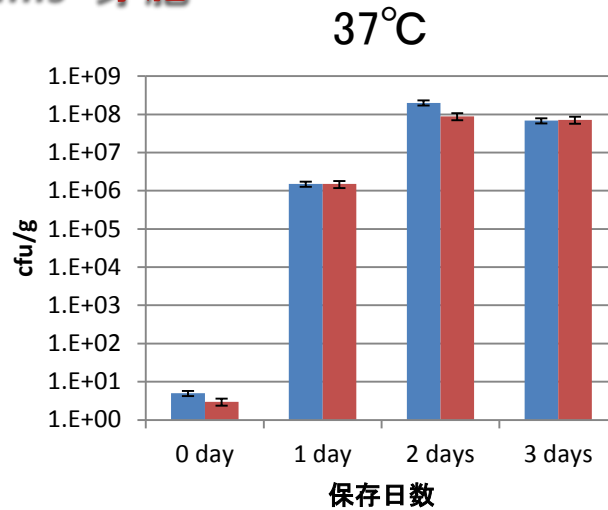
- 加熱殺菌基準：ボツリヌス菌を5D減少させることのできる工程管理基準（例：120℃・4分間）
- 成分規格：発育し得る微生物が検出されないこと

試験項目	操作概要	確認事項	対応
恒温試験	35℃で14日間保持	容器包装の膨張、内容物の漏えいの有無を確認	陰性の場合、細菌試験を実施
細菌試験	10倍乳剤をチオグリコール酸塩培養基にて、35℃で48時間培養	培養基の肉眼観察により、細菌増殖の有無を確認	培養基の何れかに細菌の増殖を認めたものを陽性とする

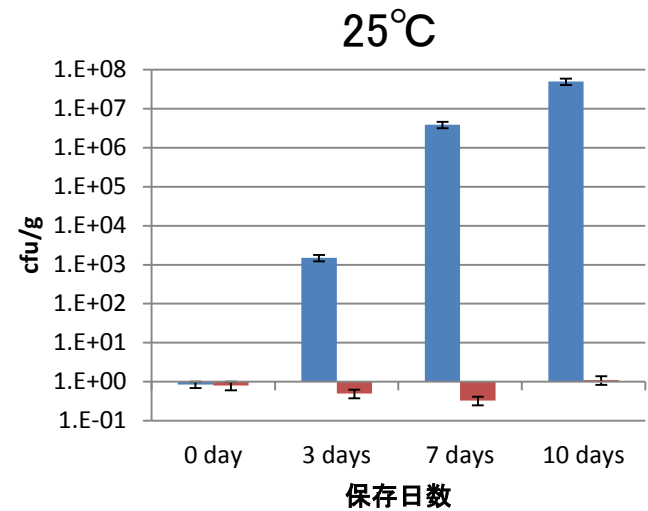
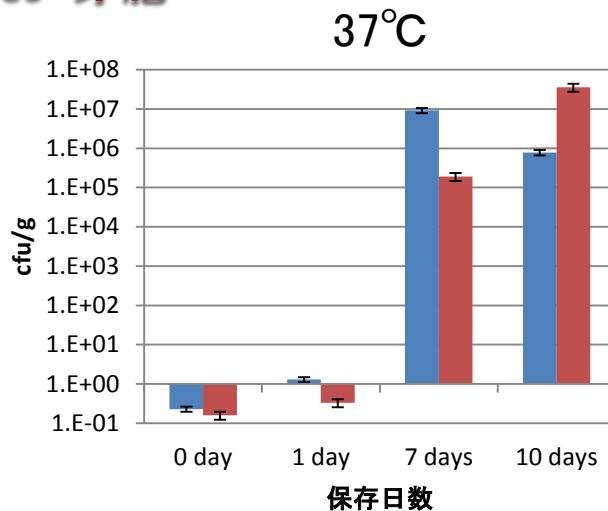
- 製造施設では、一般細菌を対象とした自主検査を実施
- 各製品につき、計120検体を供試
 - 一般細菌は検出されず（混釈法、60検体）
 - 上記無菌試験において、発育し得る微生物は陰性（60検体）
（好気性・嫌気性細菌の両者を含む）

添加回収試験による無菌充填豆腐中での芽胞の増殖挙動

B. licheniformis 芽胞



C. sporogenes 芽胞



製品によらず、工程管理の不備により当該食品中で増殖する恐れがありうる

豆乳中での耐熱性試験等より

無菌充填豆腐の殺菌工程は、容器包装詰加圧加熱殺菌食品と同等のボツリヌス菌制御効果を有することが示された。

無菌充填豆腐の長期保存試験

- 2製品 x 60検体 x 2ロット
 - ※賞味期限の各1.1～1.2倍の期間、25℃下で保存
 - ⇒ 一般細菌の検出試験（混釈法による）
 - ⇒ 容器包装詰加圧加熱殺菌食品の成分規格
- 上記2法において、陽性検体は認められず
- 保存後の理化学性状にも顕変は認められず
（pHおよび酸化還元電位）

ま と め

- 今般、厚生労働省から諮問した豆腐の規格基準の改正に記載のある、「無菌充填豆腐に必要な条件」の遵守により製造される豆腐について、**微生物学的安全性は確保されることが示された。**
- 又、食品取扱設備等の衛生管理として、各施設で実施する一般衛生管理の適切な実施（管理運営基準の遵守）により、**十分な衛生管理が必要不可欠**である。
- なお、最終製品において、微生物的危害を適切に除去されていることの検証として、**成分規格を設定することが有効**であると考えられる。