

【総説】

ボツリヌスクック(12Dコンセプト)の成立過程

宮尾 宗央*

ボツリヌス菌の加熱殺菌において $F=12D$ が用いられているが、その由来は必ずしも明確でないので、その成立過程を検証した。根拠となる加熱殺菌試験は1922年EstyとMeyerが発表した 6×10^{10} のボツリヌス菌芽胞の死滅試験とそこから算出された F 値・ z 値である。1950年ごろ芽胞数が多いほど F 値が高くなるという問題点を解決するために D 値の概念が取り入れられたが、厳密に考えると F 値が決定できないという矛盾を生じてしまった。そこでNCA(National Cannery Association, 現在のGrocery Manufacturers Association)が³⁾、EstyとMeyerの実験結果に基づき $F=12D$ の関係づけを行った。当時のアメリカの缶詰生産量(10^9 缶/年以上)の1000倍近く生産しても食中毒が起こらない程度の余裕を持った殺菌効力の設定であり、かつ過剰すぎない条件なので、 $F=12D$ の考え方が広まったものと推測する。

キーワード：12Dコンセプト、ボツリヌス菌、ボツリヌスクック、NCA、Esty

緒言

ボツリヌス菌の加熱殺菌において、人命を奪う危険な食中毒菌であるという理由で $F=12D$ が一般的に用いられているが、その由来に関しては必ずしも明確でない。EstyとMeyerが初発菌数 6×10^{10} のボツリヌス菌芽胞を殺滅するのに 120°C 4分間の加熱処理が必要であったと報告したことに由来する^{1), 2)}、アメリカにおける缶詰生産量から算出された³⁾といった説がある。今回12Dコンセプトの形成過程に関して調査を行ったので、その結果を報告する。

1. EstyとMeyerによるボツリヌス菌芽胞の耐熱性研究の背景

1920年代NCAの研究所においてボツリヌス菌の耐熱性研究が集中して行われた。その背景として以下の様なことが考えられる。

①Appertが1810年にびん詰めによる食品保存法を出版後、1820年代にはアメリカで缶詰製造が行われる様になっていた⁴⁾。

当時のアメリカにおける缶詰製造においては、経験的な事実と勘に頼り沸騰水による 100°C 5, 6時間の殺菌が行われるのが一般的であった。ところが1860年アメリカ南北戦争による缶詰需要の増大に応じるため、ボルチモアの缶詰業者Solomonが塩化カルシウムを添加し、沸点上昇を利用し約 115°C の殺菌を行った。その結果殺菌時間を25~40分に短縮し、生産性を8倍に増大させたとされて

いる⁵⁾。また1875年Shriverが縦型レトルト釜(vertical retort)を開発したこともあり、 100°C を超える温度帯での殺菌が一般化してくる(圧力釜自体は1838年のAppert出版の書籍に記載あり)⁴⁾。その中で 100°C を超える温度帯での適切な殺菌条件に関する知見への要望が高まってきた。

②缶詰業者のみの手で負えなくなった場合科学者の助けを借りる事例も出てきた。1895年Albert Landreth Cannery社が豆缶詰の膨張・破裂による大量の不良品に悩まされた時、ウィスコンシン農業大学のRussellが缶詰の変敗の原因が不十分な殺菌条件による残存微生物の増殖であること、殺菌温度を高くすることを提案し、解決に至った⁵⁾。これが缶詰の変敗に関する初めての科学的な業績とされている。しかしRussellは主要な雑誌に発表しなかったため、独立して豆の缶詰の変敗に関して同様の結論に至り、1901年缶詰業者の大会で発表したUnderwoodとPrescottの方が一般的には知られている⁵⁾。

③*Bacillus botulinus*(現在は*Clostridium botulinum*だが、当時は*Bacillus*属とされていた)は、1897年にベルギーのErmengemによって最初に分離された⁶⁾。その後ボツリヌス菌に関する研究が進み、缶詰由来のボツリヌス菌食中毒による死者が多数発生していることが分かった。1921年~1967年のボツリヌス食中毒に関する資料⁷⁾よりアメリカ産缶詰によるボツリヌス菌食中毒による死者数を著者がまとめたものを表1に示す。

1920年代まではボツリヌス菌食中毒により多数の死者を出していたが、それ以後は減少している。また当初は80

*連絡先, E-mail: norio_miyao@toshoku.ac.jp

表1 アメリカにおける自国産缶詰によるボツリヌス中毒者数の推移 (1921年~1967年)

発生年	原因食品	死者
1921	Spinach,olives	10
1922	Spinach	6
1924	Olives	8
1925	Sardines,spinach,potted meat	9
1931	Milk,antipasto,sardines	2
1932	Salmon	1
1933	Crab,salmon	1
1934	Sprats	1
1938	Tuna	2
1941	Mushroom Sauce	1
1963	Tuna	2

文献10) を元に、自国産缶詰のみを抜き出し、著者が作表したもの

℃ 1時間の加熱でボツリヌス菌芽胞を効果的に破壊すると間違っ報告されていたが⁸⁾、その後の研究の成果でボツリヌス菌の耐熱性が高いことも分かってきた。Estyによると⁹⁾、1919年Burkeが121.3℃ 10分の加熱でもボツリヌス菌を死滅させるには不十分であること、1921年Weissらが100℃ 5時間、105℃ 40分以内、120℃ 6分でボツリヌス菌を死滅できること、1922年Dicksonらがボツリヌス菌の種類により100℃における耐熱性が30分~6時間と異なることなど、研究者により様々な結果が発表されていた。この様な状況の中、缶詰業界としてボツリヌス菌の耐熱性に関して結論をつける必要が生じ、NCAによる集中的な研究がなされることとなった。

2. EstyとMeyerによるボツリヌス菌芽胞の耐熱性研究

表2に1907年NCA設立以後の加熱殺菌に関する研究成果を簡単にまとめた。

表2 NCA設立後の加熱殺菌の進歩

年	事項	参考文献
1907	National Cannery Association(NCA)が設立	5)
1913	W. D. Bigelow, A. W. Bittingをメンバーとする研究所が設立	5)
1917	Bigelowが熱電対を温度測定に使用を始めた	5)
1919	BigelowがNCA研究所所長となる	5)
1920	BigelowらがGeneral Method発表	10)
1921	BigelowがTDTカーブが片対数曲線に載せると直線となることを観察	11), 12)
1922	Esty, Meyerボツリヌス菌の耐熱性に関する研究上記Estyの実験結果はF=2.78, z=18.0とされた	1), 9)
1928	Formula method発表(Ball)	12)
1938	Nomogram method発表(Olson, Stevens)	12)
1938	TownsendらがEstyの実験結果を再計算しF=2.45, z=17.6	13)

現在の加熱殺菌研究同様、熱電対を用いた温度研究が開始されたのは1917年で、それ以来加熱殺菌に関する研究が急速に進み、ボツリヌス菌芽胞の耐熱性に関して明らかになる。

EstyとMeyerが1922年にボツリヌス菌芽胞の耐熱性研究を行ったことは有名だが、この研究に関連して2種の文献が報告されている^{1), 9)}。

EstyとMeyerは、*B. botulinum* 109株を含む9種の嫌気性菌の耐熱性を評価し*B. botulinum*の耐熱性が最大だったことを示している。また1804の*B. botulinum*芽胞懸濁液の耐熱性試験の結果、耐熱性の最も高かった株番号19, 23, 97の600億個の耐熱性試験結果を元に“ideal destruction curve”として120℃ 4分, 115℃ 10分, 110℃ 33分, 105℃ 100分, 100℃ 330分と示している¹⁾。Estyはその後、詳細なデータをアメリカ微生物学会の年次大会で発表し、別文献としてまとめている⁹⁾。Estyは、まず耐熱性の強い芽胞を選択するため、耐熱性が強い12株に関して芽胞量を 1×10^8 個以下~ 2×10^9 個以上の7段階に振り、105℃での耐熱性を測定し、その結果より最も耐熱性の高い3株(19,23,97)を選択した。次にそれらの株を用いて 7×10^9 個~ 6×10^{10} 個の芽胞の耐熱性試験を行い、それらの結果を元に、生残時の最長加熱時間、死滅時の最短加熱時間を記している⁹⁾。文献記載の耐熱性試験データと2種の文献における芽胞死滅条件を表3にまとめておく。

表3をみると、耐熱性試験データと芽胞死滅条件に整合性が取れていない(120℃ 4分では死滅したとの結果が得られていない)部分もある⁹⁾。またこれらの文献は「この報告書は要約であり、最終報告書が別途ある」¹⁾「アメリカ微生物学会の年次大会で議論される内容である」⁹⁾といった記載がされており、いずれも最終報告書では無いが、ボツリヌス菌の耐熱性を示す貴重な文献である。

EstyとMeyerの実験結果が後に12Dコンセプトの確立の根拠とされるのだが、1922年時点ではD値の概念がなく、F値・z値なども計算されておらず、生残・死滅時間のみで判断しているため、12Dコンセプトはまだ確立されていないと考えられる。

表3 耐熱性試験データとEstyが示した芽胞死滅条件

温度(℃)	芽胞死滅条件		耐熱性試験データ ⁹⁾	
	maximum resistance ¹⁾	completely destroy ⁹⁾	生残時の最長加熱時間	死滅時の最短加熱時間
100	330	360	320	330
105	100	120	100	110
110	33	36	30	33
115	10	12	10	11
120	4	4	4	5

単位:分

*文献1), 9) で異なる表現がとられているため、英文のまま示した。

3. 加熱殺菌の評価方法とD値の確立

1920年General method (Bigelowら), 1928年Formula method (Ball), 1938年Nomogram method (Olson, Stevens) と加熱殺菌を数式で評価する方法が徐々に確立される中¹²⁾, EstyとMeyerの実験の z 値・ F 値が計算され($z=18.0^{\circ}\text{F}$, $F_0=2.78$ 分), さらに1938年Townsendらにより, 伝熱遅れを考慮して再計算される($z=17.6^{\circ}\text{F}$, $F_0=2.45$ 分)¹⁴⁾.

D値の概念が出てくるのは F 値・ z 値より遅く, 1943年にBallにより5種の微生物の Z 値(大文字であることに注意, 現在のD値)算出結果が示されている¹⁵⁾. この文献によると Z 値自体はBaseltの提案とされている.

その後1948年Stumboが U の概念($U=Z(\log a - \log b)$) U は現在の F 値, Z 値は現在のD値, a は殺菌前の菌数, b は殺菌後の菌数)を示し, 1922年のEstyとMeyerの実験で, 他の研究よりも高い耐熱性が見られたのは, 恐らく使用した菌数が高かったからだとして述べている¹⁰⁾. また U の概念を用いてEstyとMeyerが示した $F_0=2.45$ 分と1938年Townsendが示した $F_0=1.90$ 分は初菌数の差異を考慮すれば同等であることから, Z 値(現在のD値)の有用性を示した¹⁴⁾.

Z 値と z 値との間の混乱を避けるため, Z 値がD値(decimal reduction timeの略)と呼びなおされ, これが1950年には研究者間の共通認識として受け入れられていく^{16), 17)}. この様に1943~1950年の間にD値の概念が確立するが, 調査した中にはボツリヌス菌と12Dコンセプトの関連を示す文献は見つからなかった.

4. 12Dコンセプトの確立

D値の概念が確立するにつれ, 従来「微生物を死滅するために必要な時間」を定義とした“thermal death time”の概念を変更する必要があるが出てきた. 1955年BallはD値の概念を採用する限り, 殺菌時間を長くしても, 微生物は低確率ながらも生残し, ゼロにはならないことを示し, 従来の“thermal death time”の概念を維持したままでは, F 値を決めることが困難になったと述べている¹⁸⁾.

このような状況の中, 1956年NCAは, 理論的に完全に死滅する点を見つけるのは不可能であるため, ボツリヌス菌の場合 1×10^{12} 個の芽胞が1個まで減るのにかかる加熱時間(12D)を F 値として受け入れざるをえないとした. その根拠として1922年にEstyとMeyerが得た最大値(maximum valueまたはclassical value)を, 初菌数 6×10^{10} から完全に死滅したものと考え, それを慣習的に 10^{12} 減少したと想定し $F=12D$ とした($6 \times 10^{10} \rightarrow 0.06$)¹⁹⁾. そして $F=12D$ の関係からTownsendの $F_0=2.45$ 分より $D=0.204$ 分を算出し, これまで独立して得られた数値と考えられていた F 値とD値が関係づけられることとなる.

1965年Stumboは「12Dコンセプトは独断で決められた値であり, 一見 10^{12} 個の缶詰中で1芽胞しか残存しない程度

まで生存率を下げることは極端すぎる様に思えるが, アメリカだけでも毎年低酸性缶詰を毎年数十億個(10^9 以上)製造していることを考慮すると正当化される」としている²⁰⁾. 年間生産量の1000倍近く生産しても食中毒が起こらない程度の余裕を持った殺菌効力の設定であり, かつ過剰すぎない条件なので受け入れやすかったと思われる.

ヨーロッパのILSIによると, 1965年以来, 12Dコンセプト(「ボツリヌスクック」とも呼ばれる. $F_0=2.45$ 分を切り上げて $F_0=3$ 分)が低酸性食品のための基準として使用されている²¹⁾.

5. ボツリヌス菌以外を対象とする場合の扱い

Stumboは, 多数の食品製造者は変敗率が $1/1000$ を超える」と問題と考えていることから, ボツリヌス菌以上の耐熱性を持つ中温性芽胞に関しては, 芽胞数を元の 10^5 まで減少させること(5D)で達成できるとしている²⁰⁾. またNCAはボツリヌス菌に12Dを提案すると共に, 他の菌株に関して5Dを提案している¹⁹⁾.

現在ボツリヌス菌以外では5Dまたは6Dが一般的とされるのは, StumboとNCAからきていると思われる. なお, ヨーロッパのILSIでは, ボツリヌス菌以外の耐熱性微生物や工程の変動性も考慮し低酸性食品の場合で $F_0=6 \sim 10$ 分の範囲が一般的であること²¹⁾が示されている.

6. まとめ

1900年代に入り顕在化したボツリヌス食中毒という緊急の課題に対し, 1922年EstyとMeyerは問題のない殺菌条件(120°C 4分)を設定し, 1938年Townsendは伝熱遅れなどを考慮し, F 値・ z 値を用いて定量的な扱いを行い, ボツリヌス食中毒の発生をほぼ防止することができた.

この際, 芽胞数が多いほど F 値が高くなるという問題点を解決するために, 1950年BallはD値の概念を取り入れたが, 厳密に考えると F 値が決定できないという矛盾を生じてしまった. そこで1956年NCAは, EstyとMeyerの実験結果とその後のボツリヌス食中毒発生状況に基づき $F=12D$ の関係づけを行った. 1965年Stumboによると, 当時のアメリカの缶詰生産量(10^9 缶/年以上)と比較しても, 厳しすぎる条件ではないことから $F=12D$ コンセプトの考え方が広まったのではないと思われる. ちなみに日本における食品衛生法の基準値 120°C 4分は1922年EstyとMeyerの条件と同一であり, 121.1°C 換算すると $F_0>3.1$ 分となり, Stumboの $F_0>3$ 分も満たしている.

参考文献

- 1) Esty, J. R., Meyer, K. F. : The Heat Resistance of the Spores of *B. botulinus* and Allied Anaerobes. XI, The Journal of Infectious Diseases, 31, 650-664 (1922).
- 2) 松田典彦, 藤原忠 : 容器詰食品の加熱殺菌 (理論および応用) 第三版, 9, 日本缶詰びん詰レトルト食品協会, 東京 (1993).
- 3) 松田典彦 : かん・びん詰食品製造における安全管理とくに加熱殺菌について, 食品衛生研究, 26, 503-513 (1976).
- 4) Samuel, A. G. : A condensed history of the science and technology of thermal processing-part 1, Food Technology, 25, 1256-1262 (1971).
- 5) Samuel, A. G. : A condensed history of the science and technology of thermal processing-part 2, Food Technology, 26, 64-69 (1972).
- 6) The Belgian Society for Microbiology: Emile Pierre Marie Van Ermengem (1851-1932).
<https://belsocmicrobio.be/emile-pierre-marie-van-ermengem-1851-1932/> (2019年6月20日).
- 7) Lewis, K. H. and Hall, H. E. : Botulism: Potential Hazard of Food Preservation: Proceedings of the First U.S.-Japan Conference on Toxic Micro-organisms, 384-387, UJNR Joint Panels on Toxic Micro-organisms and the U. S. Department of the interior, Washington, D.C. (1970).
- 8) Ito, K. A., Seeger, M. L., Bohrer, C. L., Denny, C. B. and Bruch, M. K. : The thermal and germicidal resistance of *Clostridium Botulinum* Types A, B, and E Spores: Proceedings of the First U.S.-Japan Conference on Toxic Micro-organisms, 410-415, UJNR Joint Panels on Toxic Micro-organisms and the U. S. Department of the interior, Washington, D.C. (1970).
- 9) Esty, J. R. : The heat resistance of *B. Botulinus* spores, The American Journal of Public Health, 13, 108-113 (1923).
- 10) Stumbo, C.R. : Bacteriological Considerations relating to Process Evaluation, Food Technology, 2, 115-132 (1948).
- 11) Bigelow, W. D. : The Logarithmic Nature of Thermal Death Time Curves, The Journal of Infectious Diseases, 29, 528-536 (1921).
- 12) James, A. S. and Berton, S. C. : The Canned Food Reference Manual Third Edition, 303, The American Can Company, New York (1949).
- 13) Townsend, C. T., Esty, J. R. and Baselt, F. C. : Heat-resistance studies on spores of putrefactive anaerobes in relation to determination of safe processes for canned foods, Food Science. 3, 323-346 (1938).
- 14) Stumbo, C. R. : Thermobacteriology as Applied to Food Processing, Advances in Food Research Volume 2, 76-79 (1949).
- 15) Ball, C. O.: Short-time pasteurization of milk, Industrial and Engineering Chemistry, 35, 71-84 (1943).
- 16) Reed, J. M., Bohrer, C.W. and Cameron, E. J. : Spore Destruction Rate Studies on Organisms of Significance in the Processing of Canned Foods, Food Research, 16, 383-408 (1951).
- 17) Stumbo, C. R., Murphy, J. R. and Cochran, J. : Nature of Thermal Death Time Curves for *P. A. 3679* and *Clostridium Botulinum*, Food Technology, 4, 321-326 (1950).
- 18) Ball, C. O. and Olson, F. C. W. : Foundation of Food Process Calculation Methods, Food Science, 20, 666-688 (1955).
- 19) Townsend, C. T., Somers, I. I., Lamb, F. C. and Olson, N. A. : A Laboratory Manual for the Canning Industry Second Edition, 10-21~10-22, National Canners Association, Washington, D.C. (1956).
- 20) Stumbo, C. R. : Thermobacteriology in Food Processing, 115-116, Academic Press, New York (1965).
- 21) Bean, D., Bourdichon, F., Bresnahan, D., Davies, A., Geeraerd, A. et al. : Risk Assessment Approach to setting Thermal Processes in Food Manufacture, 7, ILSI Europe, Belgium (2012).