

表 14 A型ボツリヌス菌芽胞の M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における耐熱性測定結果

菌株番号	D 値 (分)							z 値 (°C)
	99°C	101°C	103°C	105°C	107°C	109°C	110°C	
62A			13.0	8.7	5.9	3.6	2.4	10.8
33A	24.0	13.9	6.0	4.1	2.6			8.1
36A			19.8	10.5	6.0	4.3	3.1	10.0
Renkon		14.4	10.1	7.5	3.6	2.5		10.2
CB21	18.3	12.4	7.5	4.1	3.3			10.2

表 15 B型ボツリヌス菌芽胞の M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における耐熱性測定結果

菌株番号	D 値 (分)	
	100°C	105°C
Okra	19.2	5.2
67B	19.2	5.3
407	38.8	7.4
Ginger	25.1	12.4
326	24.7	7.3

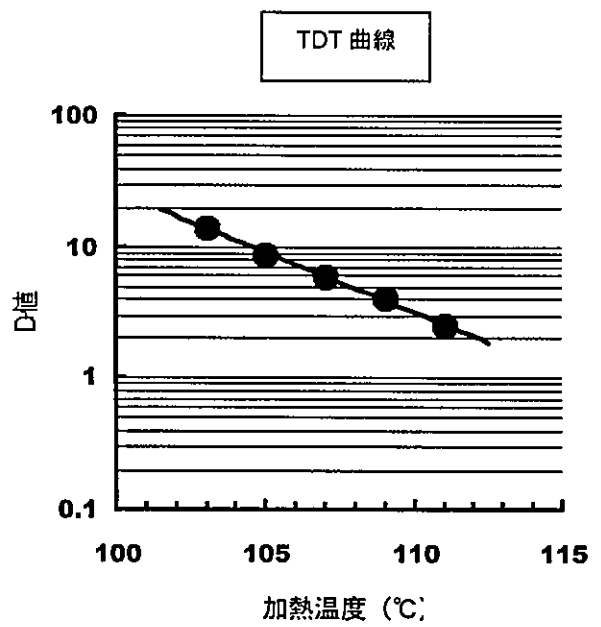
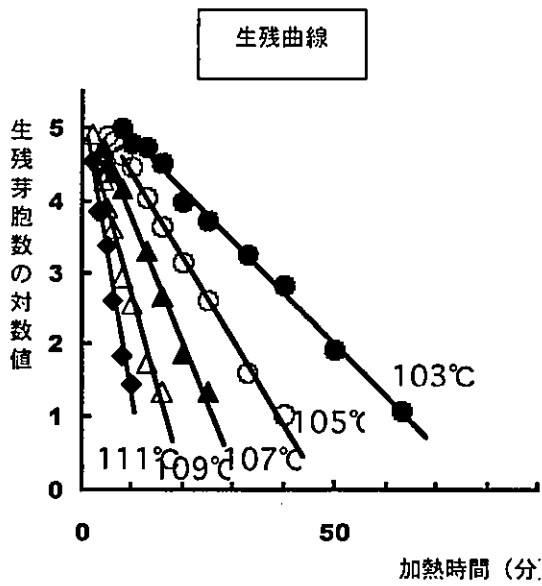


図4 A型62A株のM/15リン酸緩衝液(pH7.0)中における生残曲線およびTDT曲線

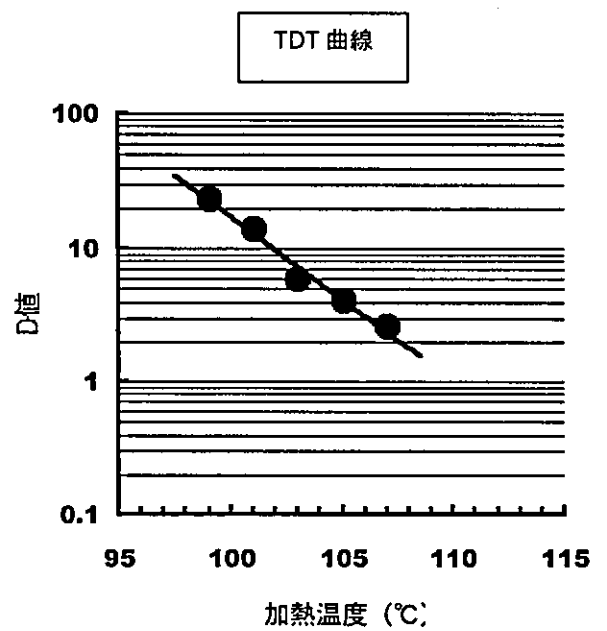
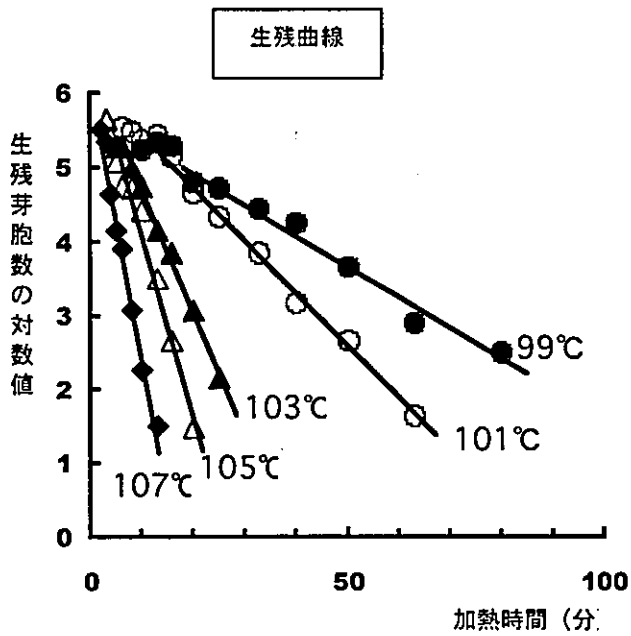


図5 A型33A株のM/15リン酸緩衝液(pH7.0)中における生残曲線およびTDT曲線

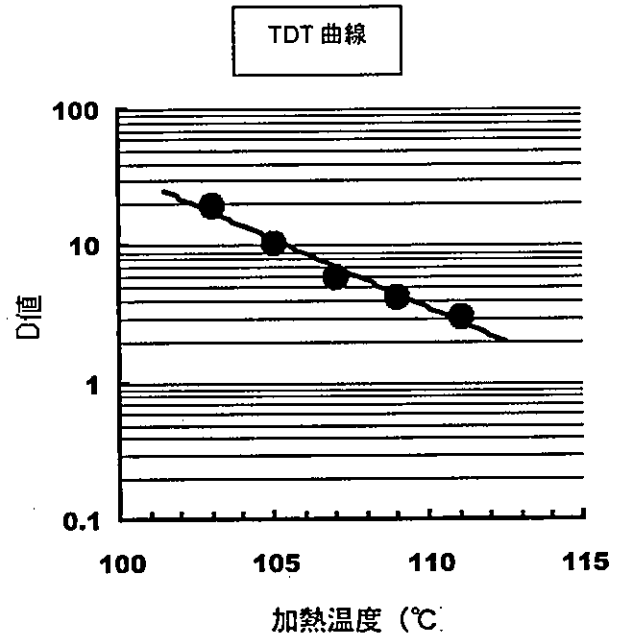
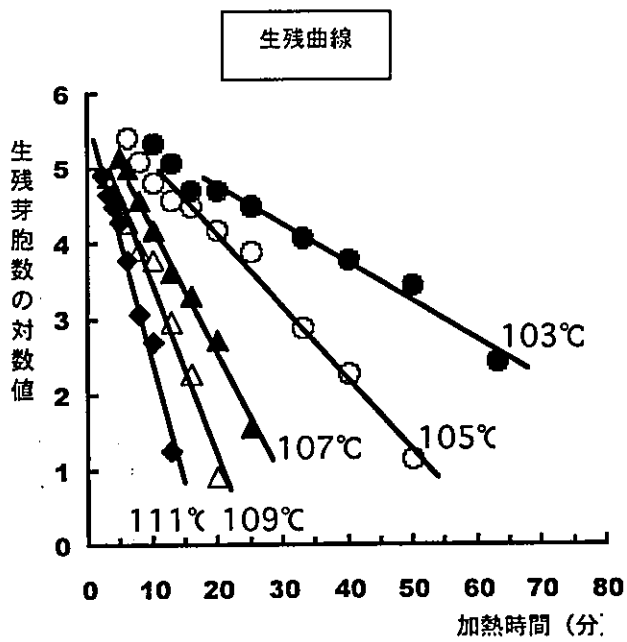


図6 A型36A株のM/15リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における生残曲線およびTDT曲線

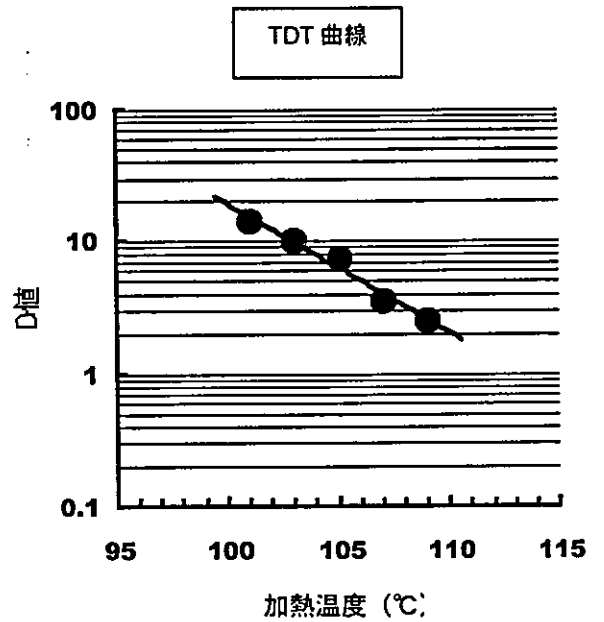
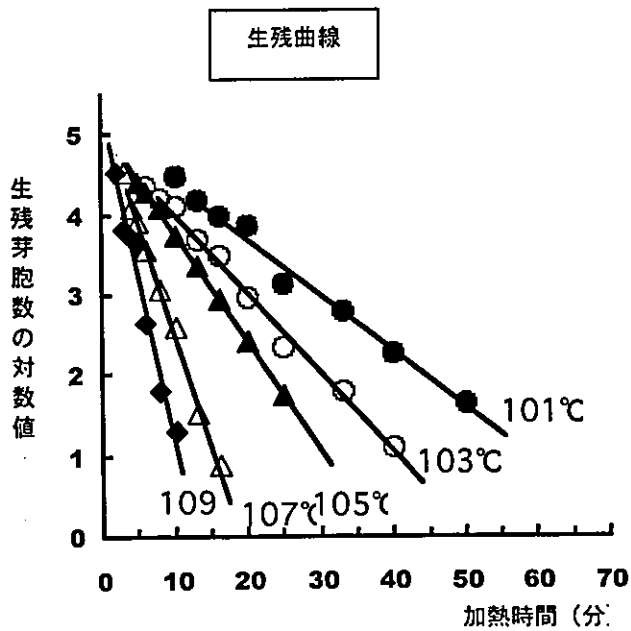


図7 A型Renkon株のM/15リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における生残曲線およびTDT曲線

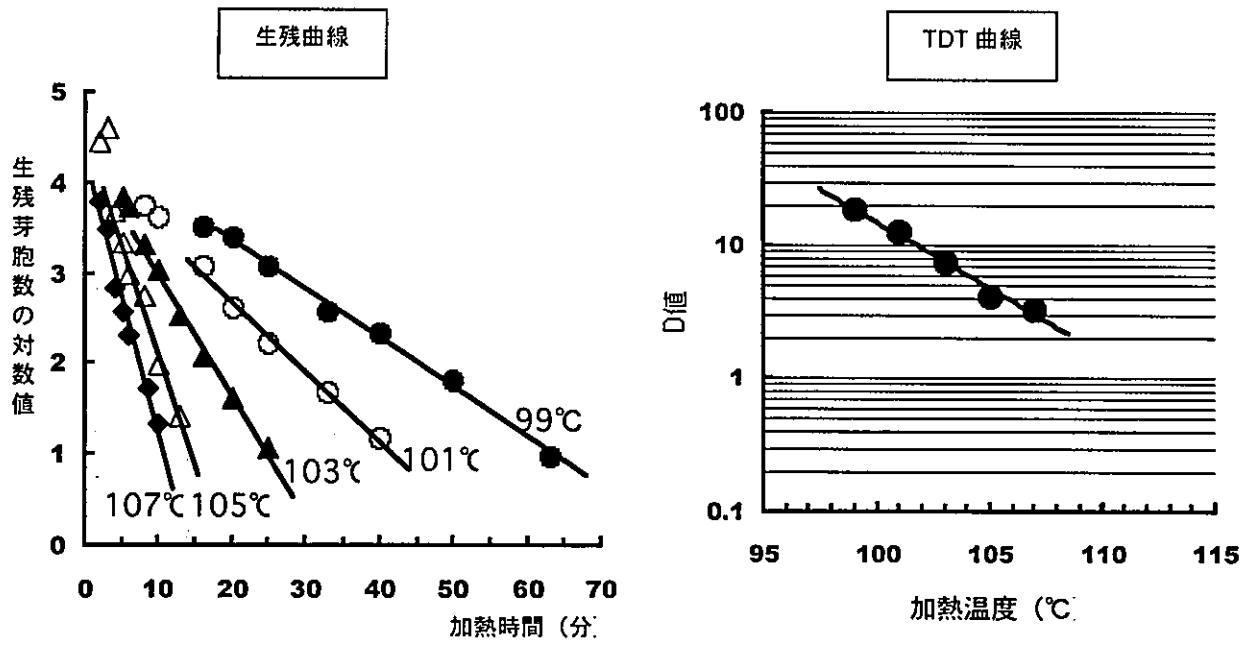


図8 A型CB21株のM/15リン酸緩衝液(pH7.0)中における生存曲線およびTDT曲線

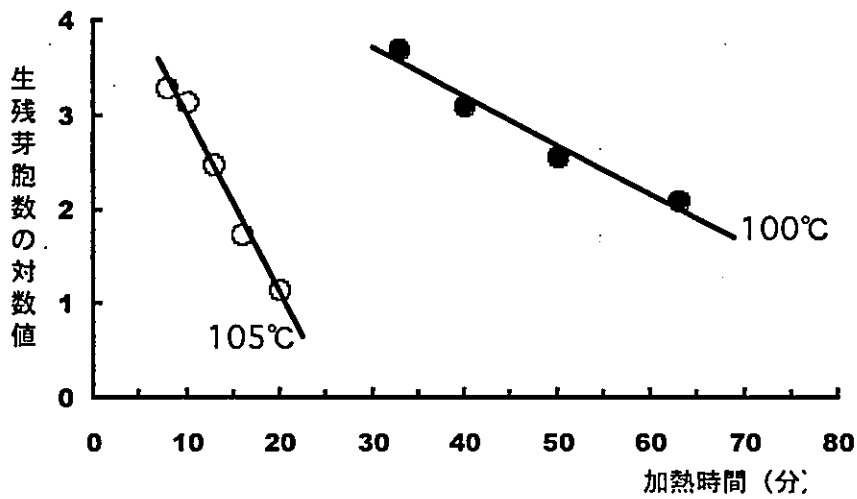


図9 B型Okra株のM/15リン酸緩衝液(pH7.0)中における100および105°Cの生存曲線

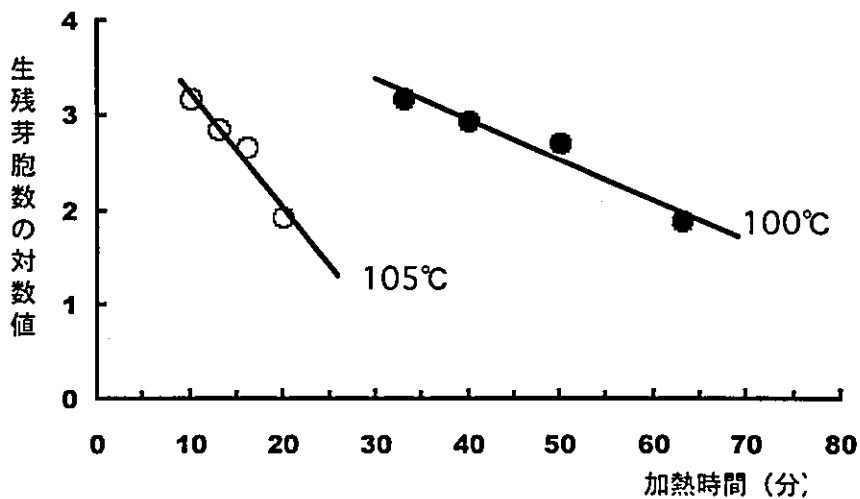


図10 B型67B株のM/15リン酸緩衝液(pH7.0)中における100および105°Cの生存曲線

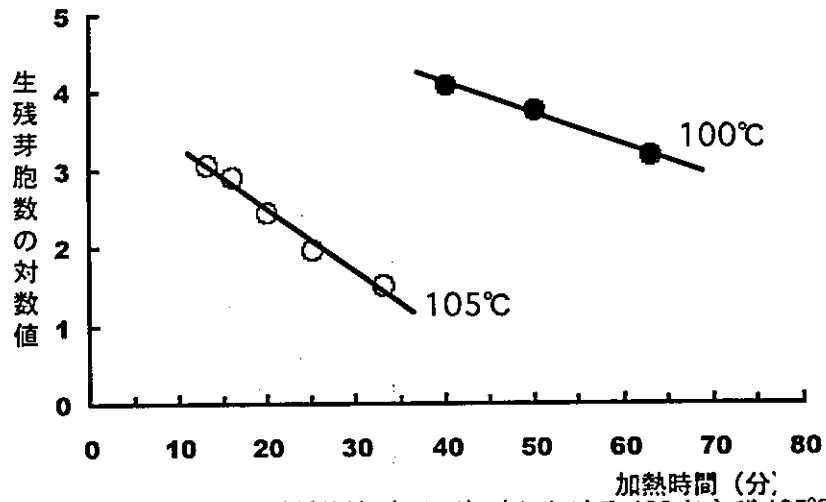


図 11 B型 407 株の M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における 100 および 105°C の生残曲線

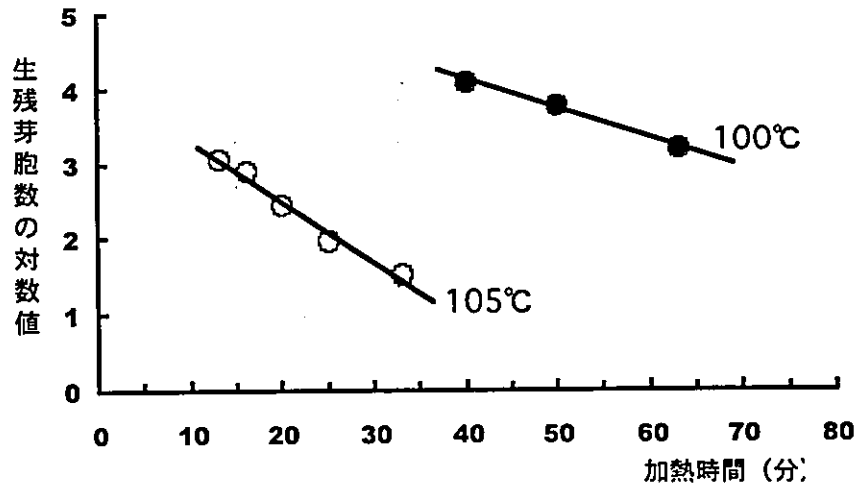


図 12 B型 Ginger 株の M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における 100 および 105°C の生残曲線

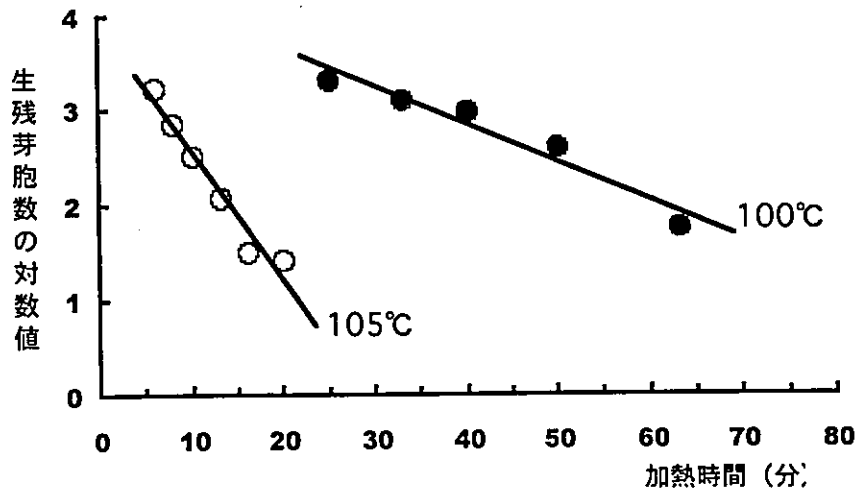


図 13 B型 326 株の M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における 100 および 105°C の生残曲線

表 16 各種試験に用いたボツリヌス菌芽胞液の初発芽胞数測定結果

血清型	菌株番号	芽胞数 (CFU/ml)			
		発育温度域		最低発育 pH	最低発育 Aw
		10 ^{3a)}	10 ^{5a)}		
A	62A	3.2×10 ³	4.0×10 ⁵	4.2×10 ⁵	5.5×10 ⁵
	33A	3.5×10 ³	3.8×10 ⁵	9.6×10 ⁵	3.6×10 ⁵
	36A	1.6×10 ⁵	4.2×10 ⁶	6.5×10 ⁶	1.9×10 ⁶
	Renkon	5.4×10 ³	4.3×10 ⁵	5.8×10 ⁵	1.3×10 ⁵
	CB21	5.3×10 ³	4.3×10 ⁵	5.7×10 ⁵	3.2×10 ⁵
B	Okra	9.4×10 ³	8.7×10 ⁵	NT ^{b)}	4.6×10 ⁵
	67B	8.2×10 ³	8.8×10 ⁵	NT	9.5×10 ⁵
	407	8.0×10 ²	1.1×10 ⁵	NT	9.4×10 ⁵
	Ginger	2.6×10 ⁴	3.0×10 ⁶	NT	2.3×10 ⁵
	326	1.0×10 ⁴	6.5×10 ⁵	NT	7.3×10 ⁵

a) 設定芽胞数 (CFU/ml), b) NT: 試験せず

表 17 供試ボツリヌス菌の発育温度域, 最低発育 pH および水分活性域の測定結果

血清型	菌株番号	設定芽胞数 (CFU/ml)	発育温度域 (°C)	最低発育域	
				pH	Aw
A	62A	10 ³	13.5~43.0	NT ^{a)}	NT
		10 ⁵	12.3~43.0	5.2	0.96
	33A	10 ³	13.0~44.5	NT	NT
		10 ⁵	12.3~44.5	5.4	0.97
	36A	10 ³	12.3~44.5	NT	NT
		10 ⁵	10.4~44.5	5.2	0.97
	Renkon	10 ³	14.7~43.0	NT	NT
		10 ⁵	14.1~43.0	5.2	0.96
	CB21	10 ³	14.1~43.0	NT	NT
		10 ⁵	12.3~43.0	5.4	0.97
B	Okra	10 ³	14.7~40.0	NT	NT
		10 ⁵	14.7~41.4	NT	0.97
	67B	10 ³	13.5~43.0	NT	NT
		10 ⁵	12.3~43.0	NT	0.96
	407	10 ³	14.1~40.0	NT	NT
		10 ⁵	13.5~41.4	NT	0.97
	Ginger	10 ³	14.7~43.0	NT	NT
		10 ⁵	13.0~44.5	NT	0.96
	326	10 ³	14.1~43.0	NT	NT
		10 ⁵	13.5~43.0	NT	0.97

a) NT: 試験せず

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

スポロゲネス菌芽胞の性状の解析と毒素検出用イムノクロマト法の開発

分担研究者 武士 甲一 帯広畜産大学畜産学部獣医学科応用獣医学講座教授
研究協力者 牧野 壮一 帯広畜産大学大動物疾病研究センター長・教授
木村 浩一 北海道立衛生研究所微生物部細菌科長
長野 秀樹 北海道立衛生研究所微生物部ウイルス科長
駒込 理佳 北海道立衛生研究所微生物部細菌科研究職員
若森 吉広 北海道立衛生研究所微生物部細菌科医療技術専門員
木村 稔 北海道立中央水産試験場加工利用部品質保全科長
栗原 誠 関東化学(株)技術・開発本部伊勢原研究所所長
高橋 建吾 関東化学(株)技術・開発本部伊勢原研究所研究員
分担研究者 駒木 勝 (社)日本缶詰協会研究所所長
大久保良子 (社)日本缶詰協会研究所食品微生物学研究室主任
山口 敏季 (社)日本缶詰協会研究所食品微生物学研究室研究員

研究要旨

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒対策については、厚生労働省からの通知で商業的殺菌処理の実施、食品の理化学的性状の調製、冷蔵保存等によりボツリヌス菌を制御すべきであり、また、必要に応じて当該食品へのボツリヌス菌芽胞の接種試験を実施すべきであることが示されている。ボツリヌス菌の試験は煩雑で熟練、時間及び費用を要し、かつ現状の試験法では毒素の検定にマウスを用いた毒性試験と中和試験が必要である。しかし、毒性試験にマウスを用いることについては、実験用の施設と動物の維持管理が必要であり、また、動物愛護の観点から倫理上の問題が提起されている。

本研究ではマウスを用いた毒性試験の欠点を補い、簡易・迅速で特異性の高いボツリヌス毒素の検出方法として、イムノクロマト法に着目して実験を行った。ボツリヌス A, B, E 型毒素とその特異抗体を用いて作製した本キットは、特異性と検出感度に優れており、今後、ボツリヌス食中毒発生時の検査、食品工場でのモニタリング試験、当該食品への芽胞の接種試験、その他バイオテロ対策等への応用が可能である。また、本研究では、サケフレークについて理化学試験及び細菌試験を行い、その安全性を評価した。さらに無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスクを評価するため、米飯へのボツリヌス菌の接種試験を行い、また、ボツリヌス菌の代替株としてスポロゲネス菌が使用できるか否かについても検討した。

A. 研究目的

現在、ボツリヌス毒素の検出は、マウスを用いた毒性試験及び中和試験によって行われている。しかし、マウスを常備するためには飼育施設や動物の維持管理等種々の制約を受け、また、動物愛護の観点から、マウスを毒性試験に供することに倫理上の問題が提起されている。今回、マウスを用いた毒性試験を改善する目的で、イムノクロマト法に着目して実験を行い、簡易で迅速に結果が得られるボツリヌス毒素検出用キットを試作し、ボツリヌス症発生時の検査、食品工場でのモニタリング試験、当該食品への芽胞接種試験、バイオテロ対策等への応用を可能とするイムノクロマトシステムによるキットの開発を目指した。また、市販されているサケフレ

ークの安全性評価を目的として調査を行い、さらに無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスクを評価するため、米飯へのボツリヌス菌の接種試験を行い、また、ボツリヌス菌の代替株としてスポロゲネス菌が使用できるか否かについても検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

Clostridium botulinum type A strain 62A(ATCC 7948), type B strain 213B, type C strain C-ST, type D strain D-1873, type E strain E-Iwanai, type F strain F-Langeland を用いた。

2. 毒素の産生及び毒性試験

各菌株をクックドミート培地 (Difco) に接種し、30°C で 7 日間培養した。各培養液を遠心し、上清を毒素試料とした。毒素試料をゼラチン緩衝液 (0.1%ゼラチン加 50mM リン酸緩衝液, pH 6.5) で適宜希釈した後、各希釈液をマウス (ddY 系, ♂, 5 週齢) の腹腔内に 0.5ml 宛接種し、マウスの致死性を観察した。マウスの致死性と毒素試料の希釈倍数により、毒素試料原液 1ml あたりの毒性を算定した。

3. 抗原及び抗体の調製

(1) A 型及び B 型毒素と抗体

A 型菌 62A 株及び 213B 株を培養して粗毒素を得た。毒素試料をトリプシン処理し、これを緩衝液 I (10mM リン酸緩衝液, pH 6.0) で平衡化したラクトースゲルに吸着させ、ゲルを洗浄後、緩衝液 II (リン酸緩衝液, 100mM, pH 8.0) で溶出した。溶出された各神経毒素成分の濃度を測定した後、0.6%ホルマリン加リン酸緩衝液 (50mM, pH 7.0) に透析し、トキシノイド化した。トキシノイドとアジュバントとを混ぜ、家兔の皮下に 2 週おきに 4 回注射して免疫血清を作製した。免疫血清を硫酸で塩析出し、透析後、DEAE Toyopearl に吸着させ、緩衝液 III (50-100mM NaCl 加リン酸緩衝液, 10mM, pH 7.5) で溶出した。抗体濃度を測定し、4°C で保存した。A 型あるいは B 型神経毒素成分を分離した後、無毒成分及び血球凝集素が吸着・残留してるラクトースゲルに家兔抗体をマウントし、アフィニティークラムクロマトを行った。その Pass-through 分画を特異抗体として集め、その濃度を測定した。

(2) リコンビナントタンパク質と抗体

A 型, B 型, E 型の重鎖遺伝子を PCR でクローニングし、各重鎖遺伝子を発現ベクター (Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質発現用ベクター; pGEX-6P1) に組み込み、その塩基配列を確認した。ベクターを大腸菌に導入して培養し、培養後、菌体をリゾチーム及び超音波処理して発現タンパク質を抽出後、発現タンパク質を Glutathione Sepharose 4B カラムを用いて精製した。これらリコンビナントタンパク質をアジュバントに混ぜ、これを抗原として家兔に注射して免疫血清を作製した。

(3) イムノクロマトシステムの試作

イムノクロマトシステムの試作にあたり、先ず抗原と抗体の反応性を ELISA 法で確認した (図 1)。次に抗体を用いてイムノクロマトシステムを試作し、その検出感度と特異性を検討した。今回は特異抗体の調製が遅れたため、米国製の抗毒素血清 (MetabioLogics 社製, Affinity purified, Rabbit, 40U/ml) を用いて試作した。抗原との反応性については、プレートリーダーで 0.2 以上 (主波長 415nm

副波長 492nm の吸光度) を陽性とした。サンプルスポット窓には、毒素試料液 150 μ l をマイクロピペットで接種し、バンド形成の最終判定は試料滴下 30 分後に行った。

4. サケフレークの調査

市販のサケフレークを購入し、販売形態、成分組成を調べ、次いで細菌試験及び生化学試験を行った。製品については、3 社 15 検体を用い、一般生菌数、クロストリジウム属菌数、ボツリヌス菌, pH, 水分的活性, 塩分濃度, 水分含量を測定した。

5. 無菌包装米飯への芽胞接種試験

芽胞接種試験の概要を図 4 に示す。

(1) 供試菌株

ボツリヌス菌 A 型 3 株 (62A ATCC 株, 62A NFPA 株, 36A 株), B 型 2 株 (213B 株, Okra 株) およびスプロゲネス菌 1 株 (PA3679 株) を用いた。

(2) 芽胞の調製

既報の方法にしたがって調製した。

(3) 供試試料

無菌包装米飯 (品種: ほしのゆめ, 北海道産) 約 160g をプラスチック成型容器 (容器: PP/EVOH/PP, 蓋材: BNy15/ONy-25/ CPP50, PP: ポリプロピレン, EVOH: エパール, BNy: バリアナイロン, ONy: 延伸ナイロン, CPP: 無延伸ポリプロピレン) に詰め、脱酸素剤封入した後、シールした。これを 121°C, 15 分間殺菌処理 (Fo 値 13.1 分) して調製した。米飯の炊飯工程の概要は以下のとおりである。

<炊飯工程>: 洗米→浸漬 90 分→浸漬水充填→連続

式加圧蒸気殺菌 (138.5°C, 約 4 秒)→炊飯水充填

→蒸気炊飯 (100°C, 30 分)

(4) 接種芽胞液の調製

ボツリヌス菌芽胞混合液は、まず各菌株から分離した芽胞液を約 2.0×10^8 CFU/ml になるよう希釈し、この希釈液を等量ずつ混合して設定芽胞数を 10^8 CFU/ml の混合液とした。さらに、この混合液を 100 倍希釈したものを設定芽胞数 10^6 CFU/ml の混合液とした。スプロゲネス菌芽胞液については、調製した芽胞液を設定芽胞数 10^8 CFU/ml とし、その 100 倍希釈液を設定芽胞数 10^6 CFU/ml 液とした。

調製した芽胞液を予め 80°C, 20 分間加熱処理した。接種芽胞数を 10^2 及び 10^4 CFU/g とし、接種芽胞数と当該食品中でのボツリヌス菌及びスプロゲネス菌の発育との関係を調べた。

(5) 接種方法

- ① 当該米飯の容器包装表面をアルコール綿でよく拭き、ゴムシール (樹サン科学製) を貼った。
- ② 貼り付けたゴムシール表面をアルコール綿で拭

き、接種芽胞液を 20 μ l とし、各芽胞液（ボツリヌス菌及びスポロゲネス菌由来）を各々、33 検体に接種した。対照として滅菌蒸留水 20 μ l を 6 検体に接種した。

③ ゴムシールの接種面をアルコール綿で拭き、針穴付近に同一のゴムシールを貼った。

(6) 接種直後の初発菌数測定

対照試料（滅菌蒸留水接種）、ボツリヌス菌芽胞液接種区及びスポロゲネス菌芽胞液接種区の各 3 検体について、pH、好気性生菌数、*Clostridium* 属菌数の測定を行った。なお、ブランクについてはヘッドスペースガス分析を行なった。

(7) 恒温放置および発育の判定

対照試料（滅菌蒸留水接種）3 検体、ボツリヌス菌およびスポロゲネス菌芽胞接種試料各 30 検体を 30 $^{\circ}$ C で 90 日間恒温放置した。発育の判定については、ボツリヌス菌接種区では恒温放置後（30 $^{\circ}$ C、90 日間）に pH の測定、*Clostridium* 属菌の菌数測定及びマウス毒性試験により行った。また、スポロゲネス菌接種区では 30 $^{\circ}$ C 恒温放置期間中の 14、30、60 日目に無作為に選択した 3 検体ずつを、さらに 90 日目には残りの検体の pH 及び *Clostridium* 属菌数の測定により、発育の有無を判定した。

C. 研究結果

1. 毒素の産生及び毒性試験

クックドミート培地における供試株の産生毒素量を表 1 に示す。産生された毒素量は $10^2 \sim 10^4$ MLD/ml であった（表 1）。

2. イムノクロマトシステム

(1) 抗体価の測定

各株のクックドミート培地培養上清を抗原とし、米国製の血清（抗 A 型及び抗 B 型抗毒素血清）及び自家調製の抗 E 型毒素重鎖リコンビナントタンパク質抗体を用いて抗原との反応性を測定した（図 2）。A 型毒素では約 80 pg/ml、B 型毒素では 25ng/ml、E 型リコンビナントタンパク質では 30 ng/ml 以上で各抗体との反応が有意に確認された。

(2) 検出感度と特異性

これらの血清を用いてイムノクロマトシステムを試作し、検出感度、特異性、反応時間を検討した（表 2）。いずれにおいても、検出対象とした毒素型以外の毒素ではバンドが確認されなかった。検出感度については、A 型毒素検出用システムでは 0.2ng/ml (10 MLD/ml)（図 3(1)）、B 型毒素検出用システムでは 2.5ng/ml (25 MLD/ml)（図 3(2)）、E 型毒素検出用システムでは 20ng/ml (200 MLD/ml)（図 3(3)）で、微量毒素の検出が可能であった。

3. サケフレークの調査

サケフレークの調査結果を表 3 及び表 4 に示す。原材料のサケについては、B 社及び C 社で秋鮭（シロザケ）を用いていると考えられた。植物油は主にナタネ油が使用されており、調味方法や着色料の使用については、製造所により著しく異なっていた。いずれの製品からも一般生菌数、クロストリジウム属菌、ボツリヌス菌は検出されなかった。水分含量は A 社の製品が最も高く、いずれの製品も 60% 以下であった。水分含量に反比例して塩分濃度は、C 社の製品が最も高かった。pH の平均は A 社及び B 社で 6.2、C 社では 5.2 で、水分活性の平均は A 社及び B 社で 0.95、C 社では 0.93 であった。

4. 無菌包装米飯への芽胞接種試験

(1) 接種芽胞液の芽胞数

当該米飯に接種したボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の芽胞液 20 μ l 中の芽胞数測定結果を表 5 に示す。ボツリヌス菌では、 10^4 に設定した接種芽胞液の測定結果は $3.7 \sim 4.5 \times 10^4$ （平均 4.0×10^4 ）CFU/20 μ l で、 10^6 に設定した接種芽胞液の測定結果は $1.7 \sim 1.8 \times 10^6$ （平均 1.8×10^6 ）CFU/20 μ l であった。また、同様にスポロゲネス菌は、 10^4 に設定した接種芽胞液の測定結果は $1.5 \sim 1.7 \times 10^4$ （平均 1.6×10^4 ）CFU/20 μ l で、 10^6 に設定した接種芽胞液においては $8.4 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^6$ （平均 1.1×10^6 ）CFU/20 μ l であった。

(2) 接種直後の当該米飯の細菌試験

芽胞液を接種した直後の当該米飯の細菌試験結果を表 6 に示す。ボツリヌス菌芽胞を接種した検体のうち、接種芽胞数が 10^4 CFU/20 μ l の検体では、pH 6.9、好気性生菌数 10 CFU 未満/g、*Clostridium* 属菌数は $2.9 \sim 7.0 \times 10^2$ CFU/g で、接種芽胞数が 10^6 CFU/20 μ l の検体では、pH 6.9、好気性生菌数 10 CFU 未満/g、*Clostridium* 属菌数は $1.8 \sim 4.4 \times 10^4$ CFU/g であった。また、スポロゲネス菌芽胞を接種した検体のうち、接種芽胞数が 10^4 CFU/20 μ l の検体では、pH 6.9、好気性生菌数が 10 CFU 未満/g、*Clostridium* 属菌数は $1.5 \sim 3.1 \times 10^2$ CFU/g で、接種芽胞数が 10^6 CFU/20 μ l の検体は、pH 6.8、好気性生菌数 10 CFU 未満/g、*Clostridium* 属菌数は $7.3 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^4$ CFU/g であった。

当該製品の内容量は約 160g であるので、接種芽胞液 20 μ l 中の芽胞数の平均値から米飯 1g 当たりの接種芽胞数を算定すると、ボツリヌス菌芽胞を 10^4 CFU/20 μ l 接種した検体では、 2.5×10^2 CFU/g で、 10^6 CFU/20 μ l を接種した検体では 1.1×10^4 CFU/g となる。また、スポロゲネス菌芽胞を 10^4 CFU/20 μ l 接種した検体では 1.0×10^2 CFU/g で、 10^6 CFU/20 μ l を接種した検体では 6.9×10^3 CFU/g となる。対照区から *Clostridium* 属菌が

検出されなかったため、芽胞接種区で検出された *Clostridium* 属菌は、すべて接種したボツリヌス菌又はスポロゲネス菌と考えられた。したがって当該米飯には、ほぼ予定どおりの芽胞数が接種されたと解釈された。

(3) 当該米飯の恒温放置試験

芽胞液を接種した当該米飯の 30℃、90 日後の恒温放置試験結果を表 7 に示す。芽胞液を接種しなかった対照区では、恒温放置期間中に膨脹する検体は認められなかった。ボツリヌス菌芽胞接種区のうち、接種芽胞数が 10^2 CFU/g の検体では、pH 6.7~6.9、*Clostridium* 属菌数は $6.5\sim 6.6\times 10^2$ CFU/g の範囲で、マウス毒性試験は陰性で、ボツリヌス菌の発育及び毒素産生は認められなかった。しかし、接種芽胞数が 10^4 CFU/g の検体では pH 6.3~6.9、*Clostridium* 属菌数は $4.7\times 10^5\sim 3.9\times 10^6$ CFU/g の範囲で、*Clostridium* 属菌数が増加し、また、マウス毒性試験が陽性であったため、ボツリヌス菌の発育と毒素産生が認められた。

スポロゲネス菌芽胞接種区では 30℃、14 日目の細菌試験において、接種芽胞数が 10^2 CFU/g の検体では pH 6.5~6.7、*Clostridium* 属菌数は $90\sim 2.9\times 10^4$ CFU/g の範囲で、この時点ですでに *Clostridium* 属菌数が増加した検体が認められた。また、接種芽胞数が 10^4 CFU/g の検体では pH 6.7~6.8、*Clostridium* 属菌数は $3.4\times 10^5\sim 1.1\times 10^6$ CFU/g の範囲で、*Clostridium* 属菌数の増加が認められた。さらに 30℃、30 及び 60 日後では、接種芽胞数が 10^2 CFU/g の検体において pH 6.8~6.9、*Clostridium* 属菌数は $4.3\times 10^3\sim 9.4\times 10^4$ 及び $1.2\times 10^5\sim 10^6$ 以上 CFU/g で、また、90 日後の検体では pH 6.8~6.9、*Clostridium* 属菌数は $5.6\times 10^5\sim 1.9\times 10^6$ の範囲で明らかに *Clostridium* 属菌数の増加が認められた。接種芽胞数が 10^4 CFU/g の検体では pH 6.9~7.0、*Clostridium* 属菌数は $2.4\sim 4.0\times 10^5$ 及び $5.1\times 10^5\sim 3.3\times 10^6$ CFU/g の範囲、また、90 日後では $3.3\sim 7.1\times 10^5$ CFU/g であったことから、いずれも *Clostridium* 属菌数の明らかな増加が認められた。

(4) 当該米飯中における細菌の発育状況

当該米飯中におけるボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の発育状況を表 8 に示す。ボツリヌス菌芽胞を 10^2 CFU/g 接種した検体では、ボツリヌス菌の発育は認められなかった。 10^4 CFU/g 接種した検体では *Clostridium* 属菌数が増加し、マウス毒性試験が陽性であったことから、ボツリヌス菌の発育と毒素産生が認められた。

一方、スポロゲネス菌芽胞を接種した検体では、芽胞数を 10^2 および 10^4 CFU/g 接種したいずれの

検体においても *Clostridium* 属菌数が増加したため、スポロゲネス菌の発育が認められた。

(5) ヘッドスペースガスの分析

芽胞接種直後及び 90 日間の恒温放置後の当該容器のヘッドスペースガスの分析結果を表 9 に示す。総ガス量は、恒温放置 0 日及び 90 日後において各々、180.0ml 及び 174.7ml で、酸素量についてはいずれの恒温放置期間においても 0 であった。当該食品の容器包材は気体透過性がないため、ヘッドスペースガスについては変化が認められなかった。

D. 考察

わが国では平成 11 年以降、ボツリヌス食中度は発生していないが、その疑い例は依然として後を絶たず、常に迅速な対応が求められる。今回、われわれは本厚生科学研究の一環として、ボツリヌス毒素の簡易・迅速検出を目的としてイムノクロマト法に着目し、A 型、B 型、E 型毒素検出用イムノクロマトシステムを試作した。

クックドミート培養上清 (A~F 型) を用いて本システムを検定したところ、本キットの特異性が確認され、検出感度は A 型毒素検出用システムで 2ng/ml(10MLD/ml)、B 型毒素検出用システムで 2.5ng/ml(25 MLD/ml)、E 型毒素検出用システムでは 20ng/ml(200 MLD/ml)で、いずれも微量のボツリヌス毒素の検出が可能であった。今回の結果から、本イムノクロマトシステムを用いたボツリヌス A 型、B 型、E 型毒素の検出法は特異性と検出感度に優れ、今後ボツリヌス症発生時の検査、食品工場でのスクリーニング試験、容器包装詰低酸性食品への芽胞接種試験、バイオテロリズム対策に応用が可能である。ボツリヌス毒素診断用免疫血清の入手が困難となった現在、簡易濃縮装置の併用による検出感度の向上及びキット自体の性能をさらに改善し、その普及を図りたいと考える。

今回調査したサケフレークは、いずれも要冷蔵品で、培養群 I のボツリヌス菌のリスクはないと考えられた。また、冷蔵保存中の培養群 II のリスクについては、培養群 II の最低発育水分活性が 0.97 であることから、当該製品はボツリヌス菌によるリスクのない食品といえる。

無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスクを評価するために行った芽胞接種試験において、接種芽胞数によってボツリヌス菌及びスポロゲネス菌の発育の度合いに差が認められた。今回の接種試験では、接種芽胞数を 1g 当たり 10^2 CFU 及び 10^4 CFU の 2 段階の濃度で実施し、芽胞を 10^2 CFU 接種した米飯ではボツリヌス菌の発育の兆候は認められなかったが、芽胞を 10^4 CFU 接種した米飯では、ボツリ

ヌス菌の発育が認められた。スポロゲネス菌の米飯中における発育能は、接種芽胞数の濃度の違いに関係なく発育が認められた。一般にボツリヌスの接種試験において、当該食品には1g当たり $10^3 \sim 10^4$ CFUの芽胞が接種され、今回の接種試験では、接種芽胞数を1g当たり 10^2 CFU及び 10^4 CFUの2段階の濃度で実施した。ボツリヌス菌の代替株としてのスポロゲネス菌の米飯中における発育能については、接種芽胞数の濃度の違いに関係なく発育が認められ、代替株として用いることが可能であると考えられた。ボツリヌス菌芽胞の接種濃度の違いによる発育能については、今後の検討課題と考える。

E. 結論

ボツリヌス毒素の簡易・迅速検出を目的としてイムノクロマト法に着目して実験を行った。抗ボツリヌス毒素特異抗体を用いて作製した本キットにより、ボツリヌスA型、B型、E型毒素(培養上清)を簡易・迅速に検出することができ、しかも特異性と検出感度に優れていた。

今回調査したサケフレークは要冷蔵品で、水分活性値が0.93~0.95の範囲であった。本製品は、ボツリヌス食中毒のリスクのない食品と考えられた。無菌包装米飯のボツリヌス菌に対するリスク評価のために行った芽胞接種試験において、接種芽胞数によってボツリヌス菌及びスポロゲネス菌芽胞の発育状況に差が認められた。芽胞を 10^2 CFU接種した当該米飯では、ボツリヌス菌の発育は認められなかったが、芽胞を 10^4 CFU接種した米飯では、ボツリヌス菌の発育が認められた。一方、スポロゲネス菌芽胞を接種した当該米飯では、芽胞数を 10^2 および 10^4 CFU/g接種したいずれの検体においても、スポロゲネス菌の発育が認められた。

F. 健康危害情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1). 武士甲一：ボツリヌス菌，厚生労働省監修，食品衛生検査指針微生物編，(社)日本食品衛生協会，東京都，2004，pp.283-296
- 2). Hasegawa, K., Watanabe, T., Takeshi, K., Ohyama, T., *et al.*: Characterization of toxin complex

produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* serotype D 4947. Protein J., 23(6), 371-378, 2004

3). Nagano, H., Fujita, K., Takeshi, K., *et al.*: Phenotypic and genotypic characterization of β -D-glucuronidase positive shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. J. Med. Microbiol., 53(10), 1037-1043, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許登録番号第 3584251 号，発明の名称：ハロー撮影装置およびハロー撮影方法，発明者：北海道知事(申請：笹川伸之，武士甲一)，平成 16 年 8 月 13 日

表 1. ボツリヌス菌培養上清の毒性試験

毒素型	菌株の名称	マウス毒性試験
A	62A(ATCC 7948)	1,000 MLD/ml
B	213B	10,000MLD/ml
C	C-ST	200 MLD/ml
D	D-1873	200 MLD/ml
E	E-Iwanai	800 MLD/ml
F	F-Langeland	200 MLD/ml

表 2. イムノクロマトシステムの検出感度及び特異性

毒素型	毒素量 (MLD/ml)	イムノクロマトシステム		
		A型毒素用	B型毒素用	E型毒素用
A	1,000	+	-	-
B	10,000	-	+	-
C	200	-	-	-
D	200	-	-	-
E	800	-	-	+
F	200	-	-	-
検出感度		10 MLD/ml	25 MLD/ml	200 MLD/ml

操作手順

- 1) PBSで希釈した抗原をELISA プレート (旭テクノグラス) に50 μ lずつ散布し、冷蔵で一晩静置した。
(BlankはPBSを散布)
 - 2) プレートウェル内の液を捨て、0.05% Tween20を含むPBSでプレートを3回洗浄した。その後、プレートを紙タオルなどに叩きつけ十分に液を切った。
 - 3) ブロッキング試薬 (2% skim milkを含むPBS) をプレートに400 μ lずつ添加した。室温で1時間放置した。
 - 4) 2) の洗浄作業後、PBS で希釈した抗体を50 μ lずつ散布した。室温で1時間放置した。
 - 5) 2) の洗浄作業後、二次抗体*を50 μ lずつ散布した。室温で1時間放置した。
 - 6) 2) の洗浄作業後、基質溶液**を5050 μ lずつ散布した。室温で30分間放置後、プレートリーダーで吸光度 (主波長415nm/副波長492nm) を測定した。
- *ベルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギムノグロブリン抗体 (DAKO) をPBSで10,000倍に希釈。 **基質溶液: ABTS-H2O2 (フナコシ)

図 1. Indirect ELISA 法を用いた抗体の抗原との反応性を調べる手順

抗原: A型毒素培養上清16倍希釈 (0.625ng/ml)からの段階希釈系列

抗体: 抗A型ポリクローナル抗体, A072203-01, 4.61mg/mL, PBSで1000倍に希釈

抗原濃度ng/mL	0.625	0.3125	0.15625	0.078125	0.039063	0.019531	0.009766	0 (Blank)
A415/492	0.28	0.331	0.323	0.216	0.134	0.084	0.056	0.012

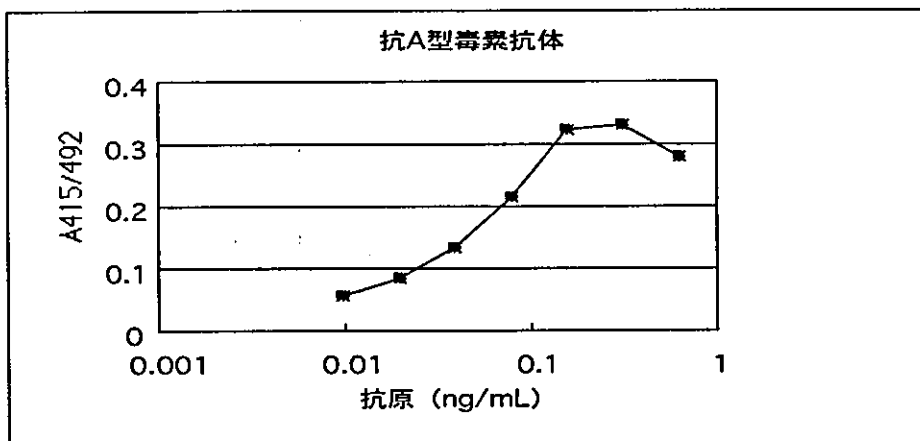


図 2(1). A 型毒素 (培養上清) と抗 A 型毒素抗体の反応性

抗原: B型毒素培養上清100倍希釈 (10ng/ml)からの段階希釈系列

抗体: 抗B型ポリクローナル抗体, B072203-01, 5.46mg/mL, PBSで1000倍に希釈

抗原濃度ng/mL	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.15625	0.078125	0.039063	0.019531	0.009766	0 (Blank)
A415/492	0.326	0.261	0.218	0.149	0.076	0.047	0.029	0.019	0.016	0.013	0.014	0.013

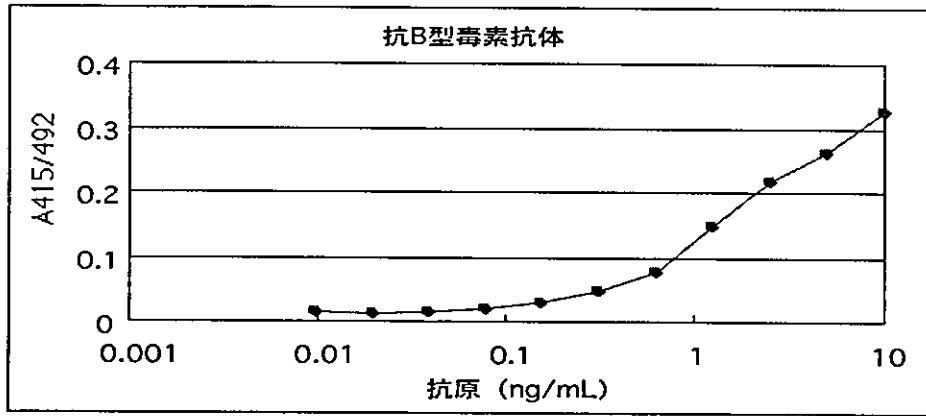


図 2(2). B 型毒素 (培養上清) と抗 B 型毒素抗体の反応性

抗 原 : E型リコンビナント重鎖抗原 2000倍希釈 (100ng/ml)からの段階希釈系列
 抗血清 : 抗E型抗ウサギ血清 (E1) 040820, PBSで1000倍に希釈

抗原濃度ng/mL	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.78125	0.390625	0.1953125	0.09765625	0 (Blank)
A415/492	0.503	0.34	0.238	0.133	0.08	0.046	0.031	0.031	0.033	0.024	0.025	0.025

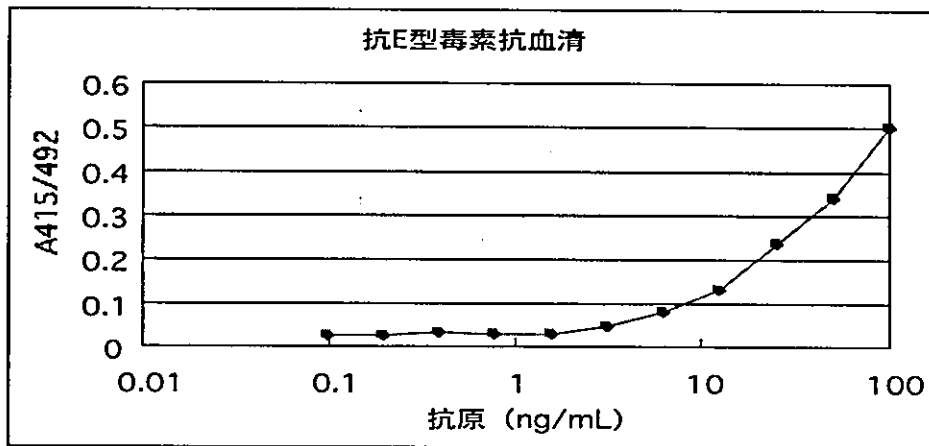


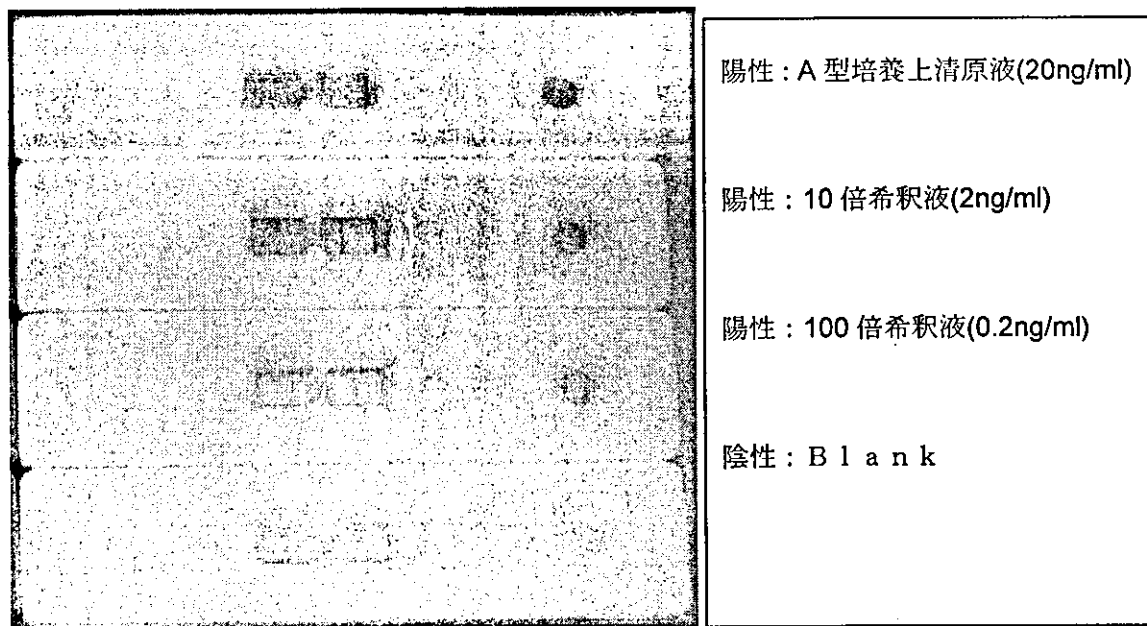
図 2(3). E 型毒素 (培養上清) と抗 E 型重鎖リコンビナントタンパク質血清との反応性

A型毒素検出用イムノクロマト試薬

抗 原 : A型毒素培養上清
 希釈液 : PBS
 試料0.1mLを展開後、20分後のラインの有無を目視で判定

検出, 対照ライン	抗原濃度 (ng/ml)				
	20	2	0.2	0.02	0
検出ライン	+	+	+	-	-
コントロールライン	+	+	+	+	+

交叉反応性 : B, C, D, E, F型毒素 (培養上清) に対して陰性であった。



陽性 : A 型培養上清原液(20ng/ml)

陽性 : 10 倍希釈液(2ng/ml)

陽性 : 100 倍希釈液(0.2ng/ml)

陰性 : B l a n k

図 3(1). A 型毒素検出用イムノクロマトシステム

B型毒素検出用イムノクロマト試薬

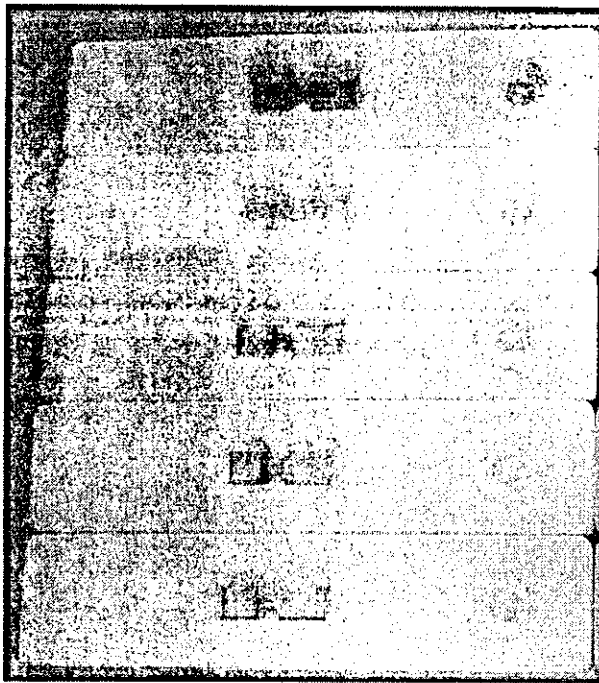
抗 原 : B型毒素培養上清

希釈液 : PBS

試料0.1mLを展開後、20分後のラインの有無を目視で判定

検出, 対照ライン	抗原濃度 (ng/ml)				
	1000	100	10	1	0
検出ライン	+	+	-		-
コントロールライン	+	+	+	+	+

交叉反応 : A, C, D, E, F型毒素 (培養上清) に対して陰性であった。



陽性：原液(1000ng/ml)

陽性：10倍希釈(100ng/ml)

陽性：100倍希釈(10ng/ml)

陰性：1000倍希釈(1ng/ml)

陰性：Blank

図 3(2). B 型毒素検出用イムノクロマトシステム

E 型毒素検出用イムノクロマト試薬

抗 原：E 型毒素培養上清

希釈液：界面活性剤含有 PBS

試料 0.1mL を展開後、20 分後のラインの有無を目視で判定

検出, 対照ライン	重鎖抗原濃度(ng/ml)				
	500	125	30	8	0
検出ライン	+	+	+	-	-
コントロールライン	+	+	+	+	+

交叉反応：A, B, C, D, F 型毒素（培養上清）に対して陰性であった。

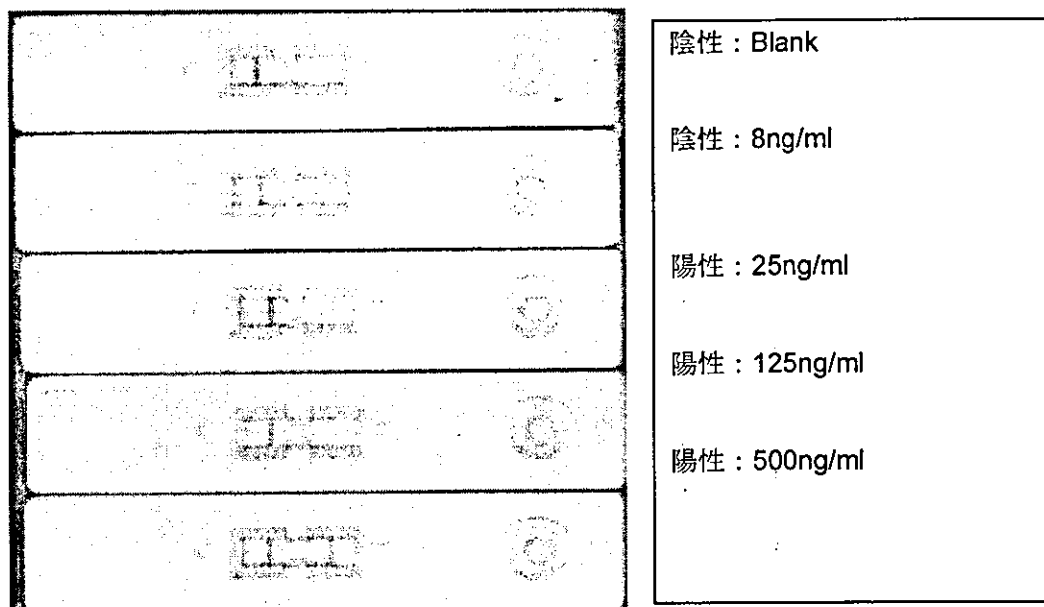


図 3(3). E 型毒素検出用イムノクロマトシステム

表 3. サケフレークの成分組成及び細菌検査

製造所	成分組成	一般生菌数(cfu/g)	<i>Clostridium</i> (cfu/g)	<i>C. botulinum</i>
A(新潟県)	鮭, 植物油, 食塩, 発酵調味料, 調味料(アミノ酸等), トレハロース, 着色料(黄色 5号, 赤色 102号)	300 以下	300 以下	陰性
B(北海道)	鮭, なたね油, 食塩, 清酒, 魚骨カルシウム, 調味料(アミノ酸等), 酸化防止剤(ビタミン C), 着色料(紅こうじ, カロチノイド)	300 以下	300 以下	陰性
C(北海道)	白鮭, 植物油脂(なたね・大豆油), 食塩, 魚介エキス(鮭, 鰹, 鰯), デキストリン, 調味料(アミノ酸等), 香料, 着色料(赤色 102号, 黄色 5号)	300 以下	300 以下	陰性

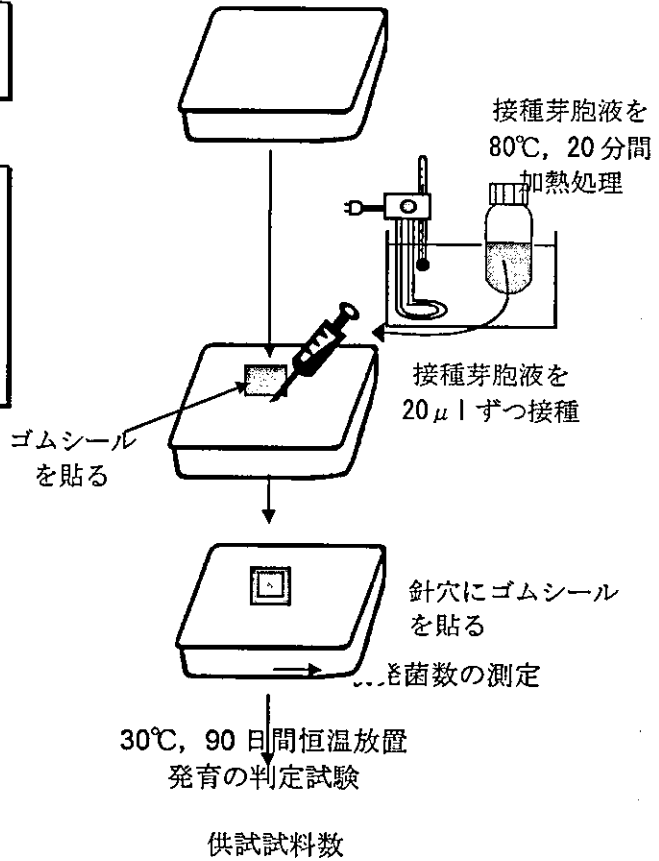
表 4. サケフレークの理化学的性状試験結果

製品	水分含量(%)	塩分濃度(%)	pH	Aw	賞味期限
A1	59.6	4.2	6.2	0.938	H17.04.15
A2	59.0	4.2	6.2	0.938	H17.04.15
A3	58.5	3.6	6.2	0.950	H17.04.23
A4	58.8	3.6	6.2	0.950	H17.04.23
A5	60.2	3.3	6.2	0.952	H17.04.23
平均値	59.2	3.8	6.2	0.946	/
SD	0.7	0.4	0	0.007	/
B1	56.3	3.6	6.2	0.951	H17.10.20
B2	55.5	3.6	6.2	0.950	H17.10.22
B3	55.8	3.8	6.2	0.960	H17.10.22
B4	58.6	3.8	6.2	0.947	H17.10.22
B5	55.8	3.8	6.2	0.949	H17.10.22
平均値	56.4	3.7	6.2	0.951	/
SD	1.3	0.1	0	0.005	/
C1	57.0	5.7	5.1	0.932	H17.01.01
C2	56.5	5.5	5.4	0.932	H17.01.01
C3	56.3	5.5	5.2	0.930	H17.01.05
C4	56.9	6.0	5.2	0.930	H17.01.05
C5	56.2	5.2	5.1	0.930	H17.01.05
平均値	56.6	5.6	5.2	0.931	/
SD	0.4	0.3	0.1	0.001	/

供試試料
 米飯（レトルト殺菌，内容量 160g）

接種芽胞液
 種類：AおよびB型ボツリヌス菌混合
 スポロゲネス菌
 接種量： 10^4 CFU/20 μ l
 10^6 CFU/20 μ l

試験内容
測定A ヘッドスペースガス
測定B 初発菌数の測定
 pH測定
 好気性生菌数の測定
Clostridium 属細菌数の測定
測定C ボツリヌス菌発育の判定
 容器の膨脹の有無
 pH測定
Clostridium 属細菌数の測定
 マウスのへい死
測定D スポロゲネス菌発育の判定
 容器の膨脹の有無
 pH測定
Clostridium 属細菌数の測定



期間 (日)	測定項目	ブランク (DW接種)	ボツリヌス菌接種	スポロゲネス菌接種
0	A	3	—	—
	B	3	3	3
14	D	—	—	3
30	D	—	—	3
60	D	—	—	3
90	A	3	—	—
	C	—	30	—
	D	3	—	21

図4. 無菌包装米飯へのボツリヌス菌芽胞及びスポロゲネス菌芽胞の接種試験の概要

表 5. 接種芽胞液の芽胞数測定結果

供試芽胞液	芽胞数 (CFU/20 μl)			
	設定 10 ⁴ /20 μl 液		設定 10 ⁶ /20 μl 液	
	測定値	平均値	測定値	平均値
ボツリヌス菌	3.8×10 ⁴	4.0×10 ⁴	1.8×10 ⁶	1.8×10 ⁶
	4.5×10 ⁴		1.8×10 ⁶	
	3.7×10 ⁴		1.7×10 ⁶	
スポロゲネス菌	1.7×10 ⁴	1.6×10 ⁴	8.4×10 ⁵	1.1×10 ⁶
	1.5×10 ⁴		1.3×10 ⁶	
	1.6×10 ⁴		1.3×10 ⁶	

表 6. 芽胞液接種直後の pH および菌数測定結果

接種芽胞液	設定芽胞数 (CFU/g)	pH	好気性細菌数 (CFU/g)	<i>Clostridium</i> 属細菌数 (CFU/g)
ブランク	—	6.4	< 10	< 10
		6.7	< 10	< 10
		6.8	< 10	< 10
ボツリヌス菌	10 ²	6.9	< 10	2.9×10 ²
		6.9	< 10	7.0×10 ²
		6.9	< 10	4.0×10 ²
	10 ⁴	6.9	< 10	2.1×10 ⁴
		6.9	< 10	4.4×10 ⁴
		6.9	< 10	1.8×10 ⁴
スポロゲネス菌	10 ²	6.9	< 10	1.5×10 ²
		6.9	< 10	2.9×10 ²
		6.9	< 10	3.1×10 ²
	10 ⁴	6.8	< 10	1.3×10 ⁴
		6.8	< 10	5.6×10 ⁴
		6.8	< 10	7.3×10 ³

表 7. 30°C, 90 日間恒温放置後の細菌試験及び毒素試験結果

接種区	恒温放置期間	設定芽胞数 (CFU/g)	容器の膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属菌 (CFU/g)	毒素産生
ブランク	90	—	なし	6.9~7.0	< 10	NT ¹⁾
ボツリヌス菌	90	10 ²	なし	6.7~6.9*	65~6.6×10 ² *	-*
		10 ⁴	なし	6.3~6.9	4.7×10 ⁵ ~3.9×10 ⁶	+
スポロゲネス菌	14	10 ²	なし	6.5~6.7	90~2.9×10 ⁴	NT
		10 ⁴	なし	6.7~6.8	4.7×10 ⁵ ~3.9×10 ⁶	NT
	30	10 ²	なし	6.8~6.9	4.3×10 ³ ~9.4×10 ⁴	NT
		10 ⁴	なし	6.9	4.7×10 ⁵ ~3.9×10 ⁶	NT
	60	10 ²	なし	6.9	1.2×10 ⁵ ~> 10 ⁶	NT
		10 ⁴	なし	6.9~7.0	5.1×10 ⁵ ~3.3×10 ⁶	NT
90	10 ²	なし	6.8~6.9	4.3×10 ³ ~9.4×10 ⁴	NT	
10 ⁴	なし	6.8~6.9	4.7×10 ⁵ ~3.9×10 ⁶	NT		

1) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず, *, 30 検体中 15 検体の試験結果 (残りは試験中)

表 8. 無菌包装米飯における芽胞の発育状況

接種芽胞液	設定芽胞数 (CFU/g)	
	10 ²	10 ⁴
ボツリヌス菌	- ¹⁾	+
スポロゲネス菌	+	+

1) 30℃, 90 日間恒温放置後の発育状況

+: 発育陽性, -: 発育陰性

表 9. 無菌包装米飯のヘッドスペースガスの分析結果

恒温放置期間 (日)	総ガス量 (ml)	酸素 (%)	窒素 (%)	水素 (%)	二酸化炭素 (%)	初期封入空気 (ml)
0	180.0	0	99.9	0.1	0	230.2
90	174.7	0	99.9	0.1	0	223.5

3 検体の平均値