

食品からの微生物標準試験法検討委員会第18回議事録概要(2009.1.13)

1. 委員長より、議題は盛りだくさんですが、スムーズな進行を行ないたいと思いますのでご協力をお願いします。
2. 基準審査課より、この委員会は今後の食品試験法を確立する上で重要であり、皆さんの専門的な知識をお借りしたいと思いますのでよろしくお願いします。
3. 監視安全課より、標準法の開発は監視の上でも重要ですのでよろしくお願いします。
4. 3種類の配付資料の確認の後、第17回本委員会議事録案の確認を行い、議事録とした。
5. 第17回本委員会議事録概要案の読み上げによる確認と委員からの指摘箇所1箇所の訂正を行い、議事録概要とした。

“リステリア標準試験法について（ステージ2）”

6. リステリア試験法は、原案（ST1案）を公開しておりますので、ステージ2の議論に入ります。
7. リステリア作業部会から、検討したデータの報告が行われた。
8. リステリア作業部会では、ISO法をそのまま取り入れていく方針で標準法を検討中である。
9. ISO法のリステリアの定性試験では、ALOA培地という酵素基質培地に加え、パルカム寒天培地とオクスフォード寒天培地の中から一つ選択する。
10. ISO法のリステリアの定量試験では、ALOA培地のみを指定している。
11. これまで他の試験法では培養温度を35℃で統一してきたが、ISO法では37℃を採用しており、酵素基質培地の判定結果は温度の影響を受けると思われたため、培養温度を35℃と37℃について検討した。
12. 35℃では増殖が遅い、ハローが小さいということはあるが、リステリアはもともと集落の大小がでやすいため、培養温度による集落の大きさの差ははっきりしなかった。
13. ST1案では最初の判定が24時間±3時間の判定となっているので、21、24、27、48時間で検討した。
14. 同一の条件で判定した場合、典型的な集落形成までの時間に少し差が見られたが、最終判定の48時間後はほぼ安定した結果が得られた。
15. 37℃では35℃と比べ、早い時間から判定が可能であるが、48時間後であれば35℃と37℃では、ほぼ同様な結果である。
16. 作業部会の検討では、ALOA生培地の成績が良く、培養温度は37℃、培養時間は48時間までの判定が必要という結果であった。
17. 培地の性能評価をするときにどの菌株にするかは重要で、今回はATCC19115と分離株を用いた。
18. 酵素基質培地の選択性によっては雑菌が多い食品からの分離時にリステリア以外の他菌が出てくる可能性があり、選択性の強いパルカムから酵素基質培地に変える場合は何故変えたのか経緯が判ると良い。

19. 定性試験では両方使うが、定量試験ではハローが出ないとモノサイトゲネスだけを計数することが難しいため、酵素基質培地を導入する必要がある。
20. ISO法を日本語化する場合、どの程度の検討で十分であるか検討委員会で決めてゆく必要がある。
21. コラボでの菌株の扱いについては、関連各所に確認が必要と思われる。
22. リステリア作業部会は今日の検討委員会の要望を受け、ステージ2の検討を続ける。

“共通の培養温度条件について”

23. 事務局より、これまでのサルモネラと黄色ブドウ球菌の試験法は、培養温度を35℃と統一してきたが、この培養温度について再考をお願いしたい。
24. 資料を用いて、検討が必要な理由と想定される選択肢の説明があった。
25. 第17回の検討委員会で、衛生指標菌の試験法は部分的な修正を加えないで、ISO法を移植する方針で検討することが提案されているが、ISO法では一般的な培養温度を37℃としている。
26. 培養温度の統一は、既に議論がされており、これまでの国内の公定法が35℃を用いていることから、この温度に統一した経緯がある。
27. このまま進めてゆくと、35℃と37℃のインキュベーターを使い分けなければならなくなるため、再検討する必要が出てきた。
28. おそらく培養温度35℃と37℃では、酵素基質培地など特殊な場合を除いてほとんど差は無いと思われる。
29. この委員会では何を一番重要とするか優先順位をはっきりとすべきで、国際的な整合性を優先させるべきではないか。
30. 検討委員会の目的は、国内の標準法という試験法の物差しを作ることで、37℃とするには、既に検討が進んでいるサルモネラと黄色ブドウ球菌試験法について何らかの検討が必要となる可能性がある。
31. サルモネラは既に35℃で検討しているので、蓄積したデータの重みがある。
32. 基準となる培養温度については、可能であれば統一することが望ましいので今後議論を続けてゆくことにする。

“メソッドバリデーションについて”

33. 支援プログラムについて松岡委員からスライドによるプレゼンテーションが行われた。
34. これにより、バリデーションを行う際の評価のための情報として、どこまでがわかっていて、どこまでわからないのかが判断できると思われる。
35. 試験法を決める議論の過程を公開し、その検討データも見ることが出来るようにすることにより、その後の試験法の検討に役立つ。
36. もしウェブ上で公開するなら、製品名を出しての性能比較などデータの種類によっては公開できないケースもあり、配慮が必要となる
37. 公開するのは、ゴールドンメソッドはどういうものかということを示すこ

とで、そこに至る過程のデータの全てを公開するわけではない。

38. 次回以降、まだ完成していない部分を含め発表していただくことにした。

“衛生指標菌検査法について”

39. 次回以降、ステージ1の原案を作業部会から提出してください。

“その他”

40. 各作業部会の進行状況の確認を行った

41. 本委員会で検討した試験法は、日本の標準試験法と理解してよろしいでしょうかという質問に対して、そのように考えていると回答。

42. その場合、検体のバリエーションに対応する試験法のエクステンションアイテムを決めておいたほうがよいと提案があった。

43. 試験法は食品基質の影響を受けるので前処理は大変に重要ですが、食品ごとの議論を始めてしまうと、標準法が決まらないので、この委員会では効率を優先して、バーファーを出発点とした標準法作製を優先している。

44. 指摘された問題については、“前処理作業部会”で検討していただく予定である。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第19回議事録概要(2009.2.3)

1. 副委員長より、本日は山本委員長が海外出張のため、代わって座長を務める旨挨拶があった。
2. 副委員長も会議が入っており、4時には退席予定で、もし委員会が終わらない場合は事務局に引き継ぐことが伝えられた。
3. 今回は行政から1名の参加、“検討状況を観察して、行政へすぐに反映させることができるので有意義です。ご検討をよろしく願いいたします”と挨拶があった。
4. 配布資料の確認・第18回議事抄録案の確認をした
5. 事務局より、これまでは議事録案としたが、指摘があり、今後は議事抄録案とする。
6. 読み上げによる議事録概要案の確認を行った。

“ボツリヌス菌標準試験法について (ステージ1)”

7. 作業部会では通常の商品検査は菌の検査であって毒素の検査ではないので、「ボツリヌス菌試験法」としたい。
8. 海外、国際的な試験法では、FDAとCDCの方法は大差がなく、ELISAを採用しており、日本とは異なっている。
9. ISO、英国、オーストラリア及びニュージーランド、カナダでは、ボツリヌス菌試験法は設定されていない。
10. これまでの試験法では国際的ハーモニゼーションを基本としてきたが、ボツリヌス菌に関しては国際的な方法が無いので、どのような試験法とするか重要である。
11. 事務局より標準法でめざすのは食品の検査時の検出法 (detection method) であり、食中毒事例における原因究明の分離法 (isolation method) では無いことを確認した。
12. 感染症法が変わって、ボツリヌス菌は特定二種病原体等となり、これまでの試験法の妥当性確認のように検体を配ってコラボを行う方法が難しい状況で、どのように試験法の評価を行うのかについて議論が必要である。
13. 毒素型別の血清の入手についても検討が必要である。
14. 具体的なプロトコールは10機関が参加する作業部会で話し合っ、出てきたものについて提案の予定である。
15. ボツリヌス菌試験法では、菌株の特性から培養温度に75~80℃など、幅を持たせざる必要がある。
16. 対象とする毒素型については、今後議論が必要である。
17. 毒素型の判定は、サブタイプの問題があり遺伝子で行うのは難しく、抗血清を用いる必要がある。
18. 次回に作業部会から試験法のフロー図を出してもらって、確認したところで原案(ステージ1)として公開する。

“メソッドバリデーションについて”

19. 休憩後、副委員長から事務局へ司会を交代し、議事を進める。
20. サルモネラ試験法の検討過程に関するウェブページの紹介・デモンストレーションを行った。
21. 委員会で検討する必要はなく、意見や修正については直接作業部会に伝えることにした。
22. ウェブページは、どのように取り扱うか事務局に一任することにした。
23. 試験法の検討に関する情報を一括して納めておくと、検討委員会での議論で同じことを繰り返さず済むのでこの様なまとめは重要である。

“衛生指標菌試験法について”

24. ISO の試験法は有償で著作権があり、単なる和訳は公開して議論できない可能性があるため、その取扱について議論した。
25. リステリアは既にステージ1としてISO法と互換性のある試験法として公開し、議論を進めている。
26. これからの食品の微生物規格は、リスク評価のデータを元に決める流れであり、国際的なリスク評価の終わった規格を導入した方が効率がよいと思われる。
27. 今後、どの程度までが著作権に係わるか調査した上で、対応を考えることとした。
28. 行政からも情報収集していただき、再度検討する。

“その他”

29. 各作業部会の進行状況の確認した。
30. リステリア作業部会は、前回の討議内容について作業部会内でディスカッション中である。
31. 検体処理作業部会は、作業中でまだ提案はない。
32. 黄色ブドウ球菌作業部会は、2回目のコラボを実施し、データの評価中で、低い菌数接種群でナチュラルコンタミの判別が問題となっている。
33. カンピロバクター作業部会は、プレコラボを2月に実施し、そのデータ整理を進めている。
34. サルモネラ試験法は、最終ステージであり、通知法として検討中である。

以上

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心安全確保推進研究事業）

分担研究報告書

「食品からのボツリヌス菌検出法」

| | | |
|-------|-------|------------------|
| 分担研究者 | 浅尾 努 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 高橋元秀 | 国立感染症研究所 |
| 研究協力者 | 河合高生 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| | 見理 剛 | 国立感染症研究所 |
| | 石村勝之 | 広島市衛生研究所 |
| | 小笠原 準 | 大阪市立環境科学研究所 |
| | 鈴木荘介 | 日本冷凍食品検査協会 関西事業所 |
| | 山口 卓 | 日本冷凍食品検査協会 仙台検査所 |
| | 林 賢一 | 滋賀県衛生科学センター |
| | 堀川和美 | 福岡県保健環境研究所 |
| | 門間千枝 | 東京都健康安全研究センター |
| | 八柳 潤 | 秋田県衛生科学研究所 |

研究要旨

食品を対象としたボツリヌス菌標準試験法の策定に際して、地方衛生研究所や登録検査機関で実施している試験法に関する情報を収集した。日本国内のみならず、平行して収集した欧米等のボツリヌス菌試験法も、蜂蜜や土壌等の環境材料からの芽胞の抽出・濃縮法がある以外は、ほとんどがボツリヌス中毒や乳児ボツリヌス症などの事件発生時の診断方法に関連するものであった。通常の食品からのボツリヌス菌検出法に関する情報はなかったため、食中毒発生時の推定原因食品からの毒素検出・同定法と菌分離法のうち、使用培地、培養温度や培養時間等の培養条件、芽胞のヒートショック条件などに関する情報を中心に解析した。特殊な試験法や市販培地がない試験法は除外して、現時点で国内の研究者の同意が得られる試験法の素案を作成し「食品からの標準試験法検討委員会」へ提出した。

A. 研究目的

日本国内でのボツリヌス中毒の発生頻度は低いので、患者材料はもちろんのこと食品からボツリヌス菌を検出した経験

のある研究者は極めて少ない。また、日本には多くの研究者の同意が得られた食品からのボツリヌス菌試験法は存在しない。

このような状況から本研究の目的は、①諸外国とくに欧米のボツリヌス菌試験法の情報を収集・解析すること、②国内のボツリヌス菌を検出した経験がある研究者の検出方法や経験を集約すること、③最終的に①と②の結果を総合的に判断して作成した試験法を素案とし、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」（以下、標準試験法検討委員会）に提出することとした。

B. 研究方法

日本の各研究機関で使用されている食品を対象としたボツリヌス菌試験法、および欧米等から報告されている方法を調査・集約した。これを試験法の素案として標準試験法検討委員会に提出し、各委員から意見を求めた。ここで得られた結果を素案に反映させ、標準試験法検討委員会へ提出するための原案を作成した。

C. 研究結果

1. 国内で公にされたボツリヌス菌分離マニュアルや試験法を年代順に以下に示した。4)の厚生労働科学研究費補助金報告書に記載された香辛料のボツリヌス菌試験法以外は、基本的には食中毒発生時の推定原因食品からの毒素検出・同定法と菌分離法であった。

1) 感染症検査マニュアル「ボツリヌス中毒」、大阪府立公衆衛生研究所 浅尾努、久米田裕子（平成12年）

2) ボツリヌス症の手引き・資料集、国立

感染症研究所細菌血清部・地方衛生研究所（平成13年）

3) 食品衛生検査指針 II ボツリヌス菌、武士甲一（平成16年）

4) 平成16年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）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、1. 香辛料のボツリヌス菌検査法の検討および汚染実態調査、浅尾 努、久米田裕子、河合高生、古田雅一（平成17年）

2. 諸外国のボツリヌス菌分離マニュアルや試験法を調査したが、国内法と同様に食中毒発生時の推定原因食品からの毒素検出・同定法と菌分離法であった。

1) Botulism in the United States, 1899-1996, Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers, Atlanta, GA. Centers for Disease Control and Prevention、米国CDC（1998年）

2) Detection of Clostridium botulinum in honey and syrups. Government of Canada, Health Protection Branch, Ottawa, カナダ（1998年）

3) Bacterial Analytical Manual, Chapter 17 Clostridium botulinum、米国FDA（2001年）

4) Clostridium botulinum and its toxins、米国公衆衛生協会（2001年）

なお、International Organization for Standardization（ISO）、National Standard Methods（英国健康保護局）、Food

Standards Australia New Zealand (オーストラリア・ニュージーランド食品局、FSANZ)、および Official Methods for the Micro-biological Analysis of Foods (カナダ) にはボツリヌス菌や毒素試験法は示されていないかった。

3. 香辛料のボツリヌス菌試験法では、おもに検体からボツリヌス菌芽胞の抽出・濃縮法が工夫されており、その方法の概略は以下のとおりである。

- 1) 試料 (20-50 g) をストマフィルター (フィルター付きストマッカー袋) に秤量する。
- 2) 4倍量の50%エタノールを加え、2分間ストマッキングする。
- 3) ストマフィルターを熱シールし、室温で1-2時間振とうする。
- 4) 濾過液をステンレスメッシュ (500メッシュ) で濾過する。
- 5) 20°C、3,000回転で20分間遠心、上清を捨てる。
- 6) 40 ml の蒸留水で洗浄後に遠心し、上清を捨てる。
- 7) 沈殿物に蒸留水を加えて、約4 ml にメスアップする。
- 8) 抽出液1 ml ずつを4本のクックドミート培地に接種する。
- 9) 2本は非加熱、残りの2本は70°Cで10分間加熱処理する。
- 10) 30°Cで7日間嫌気培養後に毒素試験を実施し、陽性の場合は引き続き菌分離を試みる。

本法により、C型菌、D型菌およびI群

B型菌が分離できたと報告された。

4. ハチミツ、水飴等 (粘度の高い検体) : 容器全体を加温、全体をよく攪拌してから採取し、滅菌蒸留水で2~5倍に希釈した溶液を試料とする (東京都)。

香辛料、からし粉等 : 懸濁液を数分間放置した上澄み液を試料とする (東京都)。

- 1) 上記の試料を遠心分離 (7,500xg、30分間) する。
- 2) 沈殿物を少量のクックドミート培地を加え溶解する。
- 3) クックドミート培地2本の深部に接種する。
- 4) 一本は非加熱、他の一本は75°Cで10分間加熱処理する。
- 5) 30°Cで7日間嫌気培養後に毒素試験を実施する。

日本国内および欧米等で使用されている培地類、培養条件、ヒートショック条件等を表1と表2にまとめ、以下に培地の組成等を示した。

5. 増菌 (毒素産生用) 培地

1) ブドウ糖および可溶性デンプン加クックドミート培地

クックドミート培地に加温溶解したブドウ糖 (0.3%) と可溶性デンプン (0.2%) 溶液を分注し、121°Cで15分間滅菌後直ちに流水中で急冷する。可能であれば嫌気ジャーやグローブボックス内に保存する。外気中に放置した培地は、溶存酸素を除去するために使用直前に沸騰水中で10分間加熱後急冷する。

2) 強化クックドミート培地

クックドミート培地に加温溶解した以下の溶液を分注し、121°Cで15分間滅菌後直ちに流水中で急冷する。

| | |
|------------|----------|
| 酵母エキス | 10 g |
| ブドウ糖 | 8 g |
| 可溶性デンプン | 5 g |
| L-システイン塩酸塩 | 1 g |
| 硫酸アンモニウム | 10 g |
| 炭酸カルシウム | 5 g |
| 精製水 | 1,000 mL |

加温溶解し、1N NaOHでpH 7.6に調整炭酸カルシウムは溶解しないので、混合しながら試験管に分注する。

3) チョップドミート・ブドウ糖・可溶性デンプン培地 (CMGS培地、CDC)

以下のチョップドミート培地に加温溶解したブドウ糖 (0.3%) と可溶性デンプン (0.2%) 溶液を分注し、121°Cで15分間滅菌後直ちに流水中で急冷する。

チョップドミート培地

| | |
|---------|----------|
| 新鮮ウシ赤身肉 | 500 g |
| 1N NaOH | 25 ml |
| 蒸留水 | 1,000 ml |

攪拌しながら15分間煮沸後、冷却して濾過後に肉片とともに以下の成分を加える。

| | |
|----------|------|
| トリプティケース | 30 g |
| 酵母エキス | 5 g |
| ブドウ糖 | 5 g |
| 可溶性デンプン | 2 g |

pHを7.8に調整

4) チョップドリバー培地 (Chopped liver broth)

| | |
|------------|----------|
| 新鮮ウシ肝臓 | 500 g |
| ペプトン | 10 g |
| リン酸一水素カリウム | 1 g |
| 可溶性デンプン | 1 g |
| 蒸留水 | 1,000 ml |

pHを7.0に調整

5) TPGY培地

| | |
|---------------|----------|
| トリプトン | 50 g |
| ペプトン | 5 g |
| ブドウ糖 | 4 g |
| 酵母エキス | 20 g |
| チオグリコール酸ナトリウム | 1 g |
| 蒸留水 | 1,000 ml |

pHを7.0に調整

6. 分離培地

1) 卵黄加GAM寒天培地

基礎培地組成 (GAM寒天培地)

| | |
|---------------|--------|
| ペプトン | 10.0 g |
| ダイズペプトン | 3.0 g |
| プロテオーゼペプトン | 10.0 g |
| 消化血清末 | 13.5 g |
| 酵母エキス | 5.0 g |
| 肉エキス | 2.2 g |
| 肝臓エキス | 1.2 g |
| ブドウ糖 | 3.2 g |
| リン酸二水素カリウム | 2.5 g |
| 塩化ナトリウム | 3.0 g |
| 溶性デンプン | 5.0 g |
| L-システイン塩酸塩 | 0.3 g |
| チオグリコール酸ナトリウム | 0.3 g |
| 寒天 | 15.0 g |
| 精製水 | 900 mL |

pH 7.1±0.1

115°Cで15分間滅菌したGAM寒天培地を50～55°Cの温浴中で冷却・保温後、50%卵黄液を10%の割合で加え、泡をたてないように静かに攪拌しながら混合し、シャーレに20 mlずつ分注して固める。III群菌の分離には0.1%のシステイン-塩酸塩を加える。この場合はpHを元の培地のpHに調整しなければならない。

[50%卵黄液作製法]

新鮮卵で卵殻に傷のないものを選び、洗剤でブラシ洗浄する。流水で水洗後、70%エタノールに30秒間浸漬後に風乾するか、あるいはエタノールを噴霧後に火炎滅菌する。無菌的に割卵して卵白を除去する。この場合、市販のステンレス製の黄身取り器を滅菌して使用すると容易である。卵黄を滅菌した広口びん（希釈びん等）に入れ、等量の滅菌精製水を加え、例えば滅菌ガラス棒を用いてエマルジョンを作製する。保存する場合は4°Cで、3日以内に使用する。

基礎培地に卵黄液を加えて混合すると泡立つが、市販のステンレス製連続分注器を使用すれば、平板作製時に泡を消す手間が省ける。

2) 卵黄加CW寒天培地

基礎培地組成 (CW寒天培地)

| | |
|------------|--------|
| ハートエキス末 | 5.0 g |
| プロテオーゼペプトン | 10.0 g |
| ペプトン | 10.0 g |
| 塩化ナトリウム | 5.0 g |
| 乳糖 | 10.0 g |
| フェノールレッド | 0.05 g |

| | |
|-----|--------|
| 寒天 | 20.0 g |
| 精製水 | 900 mL |

pH 7.2±0.1

121°Cで15分間滅菌したCW寒天培地を50～55°Cの温浴中で冷却・保温後、50%卵黄液を10%の割合で加え、シャーレに20 mlずつ分注し固化させる。

3) CBI寒天培地

| | |
|------------------|--------|
| トリプティケース ペプトン | 40 g |
| リン酸一水素ナトリウム | 5 g |
| 塩化ナトリウム | 2 g |
| 硫酸マグネシウム (5% 溶液) | 0.2 mL |
| ブドウ糖 | 2 g |
| 酵母エキス | 5 g |
| 寒天 | 20 g |
| 精製水 | 900 mL |

121°Cで15分間滅菌した培地を50～55°Cの温浴中で冷却・保温後、以下の抗生物質と50%卵黄液を10%の割合で加え、シャーレに20 mlずつ分注し固化させる。

| | |
|-------------|--------|
| スルファメトキサゾール | 76 mg |
| サイクロセリン | 250 mg |
| トリメトプリム | 4 mg |

4) 変法マックラング・トウベ・卵

黄寒天培地

| | |
|------------------|--------|
| トリプティケース ペプトン | 40 g |
| リン酸一水素ナトリウム | 5 g |
| 塩化ナトリウム | 2 g |
| 硫酸マグネシウム (5% 溶液) | 0.2 mL |
| ブドウ糖 | 2 g |
| 酵母エキス | 5 g |
| 寒天 | 20 g |
| 精製水 | 900 mL |

121°Cで15分間滅菌した培地を50〜55°Cの温浴中で冷却・保温後、50%卵黄液を10%の割合で加え、シャーレに20 ml ずつ分注し固化させる。

5) 卵黄加Liver veal 寒天培地

| | |
|-------------|--------|
| 肝臓浸出液 | 9.0 g |
| 子牛肉浸出液 | 6.4 g |
| プロテオース ペプトン | 20.0 g |
| ゼラチン | 20.0 g |
| 可溶性デンプン | 10.0 g |
| カゼイン | 2.0 g |
| ブドウ糖 | 5.0 g |
| ネオペプトン | 1.3 g |
| トリプトン | 1.3 g |
| 塩化ナトリウム | 5.0 g |
| 硝酸ナトリウム | 2.0 g |
| 寒天 | 15.0 g |
| 精製水 | 900 mL |

pH 7.3±0.2

121°Cで15分間滅菌した培地を50〜55°Cの温浴中で冷却・保温後、50%卵黄液を10%の割合で加え、シャーレに20 ml ずつ分注し固化させる。

[参考]

上記培地以外にも LV 寒天平板培地 (Lecitho Vitellin agar) を使用している研究所 (秋田県) があったので、参考として記載する。

滅菌生理食塩水 1,000 ml に珪藻土を 25g 添加して高圧滅菌し、冷却後これに鶏卵 4 個分の卵黄を添加して十分に攪拌し、1,000 rpm で 10 分間遠心後、上清をそのまま、あるいは無菌的にろ紙 (ワットマ

ン、DE81) でろ過して卵黄液 (LV 液) とする。次に、LV 液 100 ml を 55°Cに保温した滅菌ハートインフュージョン寒天培地 (原法では普通寒天培地) 900 ml に混合し、クリスタルバイオレットを 1.43 mg/L 加えて 20 ml ずつシャーレに分注し、十分に乾燥する。LV 液は 1 ヶ月程度であれば冷蔵、それ以上の期間であれば 20°C以下での冷凍保存が可能であるが、冷凍の場合には解凍により卵黄が粒子状になり易いため用事調製が望ましい。

本培地を用いて A、B、C、D、E、F 型ボツリヌス菌を 30°Cで 48 時間嫌気培養を行った場合、菌が産生するリパーゼにより、集落直下に乳濁帯、集落周辺表面に明瞭な「真珠様」層を形成し、ボツリヌス菌を疑う集落の判定が容易になる。ただし、*C. sporogenes* と *C. novyi*、そして、自然界の土壤等に多い無毒のボツリヌス E 型菌類似菌 (Boticin E などのバクテリオシン産生菌および非産生菌) もリパーゼ産生性であるため、本培地では、ボツリヌス菌と誤判定しやすい。ボツリヌス菌と疑われた菌については毒素産生性の確認が必要である。

7. 抗毒素血清と試薬類

1) 毒素中和テスト用診断用抗毒素

血清

ボツリヌス毒素の診断用抗毒素血清は、2002 年に廃業した千葉血清研究所が食品中の毒素検出用として限定した使用目的で製造販売していたが (食品衛生検査指針には千葉県血清研究所の診断用血清を

用いることとなっている)、ボツリヌス患者発生に際しては使用する地方衛生研究所等では便や血清のような人由来の検体についても用いていた。しかし、感染症法に基づく実験室内診断に用いる試薬、標品およびキット等は、製造・市販に際しては体外診断用試薬として認可承認が必要であると厚生労働省の審査管理課では判断している。現実的には、国内では診断用に標準品として位置づけされたものが用意されていなかった。

従って、ボツリヌス症に対する各地方衛生研究所、検査機関での病原体診断に用いる試薬の対応が求められており、早急に標準品を整える必要があった。なお、治療用ボツリヌス抗毒素を千葉血清から製造・承継した化血研では、ボツリヌス抗毒素のウマ免疫、抗毒素精製が終了する時期は、2010年度が予定されており、もし化血研が診断薬の製造を了承する場合でも、この間の暫定対応が求められる。生物学的製剤（ワクチンや抗毒素製剤）の品質管理標準品以外である診断目的の国内標準品の交付、位置づけを国立感染症研究所（レファレンス業務）として明確にする事も必要であり、平成17年度に感染研の予算に計上し、以下の手順でボツリヌス抗毒素血清の実験室内標準品を作製した。

1-1) 薬事法上の診断用試薬とすると製造・治験する製造所がないことが予想されるので、生物学的製剤の標準品と同様に感染研の検定・検査業務運営委員会に

審議、承認されることで国の標準品としての位置づけることで対応する。

1-2) 緊急用ボツリヌス抗毒素の確保を検討した中国蘭州生物製品研究所より、A、B、E、Fの各単独型ウマ免疫血清を購入した。

1-3) 国内の数ヶ所の衛生研究所および研究室の協力を得て、治療用ウマ抗毒素製剤の国内標準品（WHO標準品に標準化済み）に対してマウス中和試験法を用いて比較、標準化した。

このような経緯で診断用ボツリヌスA、B、EおよびF型抗毒素血清を標準化した後、全国地方衛生研究所のうちでボツリヌス診断を実施できる15ヶ所に配布した。

2) ゼラチン希釈液（培養上清や毒素の希釈用）

リン酸一水素ナトリウム（4g）を精製水（900ml）に溶解し、1Nの塩酸でpHを6.2に調整する。蒸留水を加えて1,000mlにした後、ゼラチン（2g）を加え、121℃で15分間滅菌する。必要に応じてペニシリン300U/mlやストレプトマイシン0.5mg/mlを加える

3) トリプシン溶液（毒素の活性化用）

1:250溶液（日本ベクトン・ディッキンソン）の場合には2%にゼラチン希釈液に溶解する。結晶トリプシンの場合は0.001N塩酸に2mg/mlの濃度に溶解して使用する。

4) マウス（毒素の検出・同定用）

15～20gのマウスを用意する。

5) ピクリン酸溶液（マウス標識用）

適量のピクリン酸をエタノールに溶解する（飽和状態）。マウスの頭、首、背中、尻、尻尾、前足、後足に標識する。

6) PCR用プライマー（A-G型）が宝酒造で販売されている。Bacterial Analytical Manual (FDA) にA、B、E、F型毒素用プライマーが記載されている。

7) TE-0.1% Tween20 (PCRのテンプレート作製用)
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)、0.1% Tween 20 に調整する。121°C で15分間滅菌して使用する。

8) 0.1N NaOH、0.5%NaClO（毒素の不活性化や菌、芽胞の殺菌用）
ボツリヌス毒素はアルカリや酸化剤で速やかに失活する。毒素や菌で汚染した場所に少なくとも15倍量以上の0.1N NaOHまたは0.5%NaClOをそそぎ、その上にペーパータオルをかぶせる。数分後にふき取り、再度表面をNaOHまたはNaClOで清掃した後ペーパータオルを滅菌する。

8. 装置および器材

1) ストマッカー

食品の乳剤化に使用する。

2) 嫌気培養装置

嫌気ジャーによるガスパックシステムで培養できるが、嫌気培養装置（グローブボックス）があれば理想的である。

3) 恒温水槽

検体の加熱処理（60°Cおよび80°C）や

毒素の活性化処理（37°C）に使用する。

4) 遠心機

12,000xgで遠心可能な冷却遠心機、エッペンドルフ型チューブを遠心できる高速微量遠心機を用意する。

5) 注射器

1 mlの市販のものを用意する。

6) ろ過装置

培養上清をろ過滅菌するために使用する。孔径0.45 μm以下の遠心フィルタあるいはシリンジフィルタが使用できる。

7) ピペットマン、安全ピペッター

8) アルコール綿花

マウスの注射部位を消毒するときに使用する。

【食品からのボツリヌス菌検出法素案】

食品からの標準試験法検討委員会へ素案を提出し、委員の意見を取り入れて修正した素案「食品からのボツリヌス菌検出法」の説明文およびその概略を図に示した。

1. ボツリヌス菌の一般的性状

ボツリヌス菌は偏性嫌気性のグラム陽性大桿菌（0.8~1.2×4~6 μm）で、鞭毛を有し芽胞を形成する。自然界に広く分布し、土壌等から食品を汚染する。破傷風菌やウエルシュ菌と同じ属に含まれる。

2. ボツリヌス菌の分類

例外もあるが、基本的にはボツリヌス毒素を産生する菌がボツリヌス菌であり、毒素の抗原性に基づきA型~G型の7型

の毒素型に分類される。一般的に菌の分類は生化学的性状や DNA 相同性に基づくが、ボツリヌス菌は例外的に毒素産生性の有無により同定される。このためボツリヌス菌という名称は複数の菌種を代表する「グループ名」と理解すべきような菌群である。性状が異なる複数の菌種は、タンパクや糖の分解性などにより I 群～IV 群に区分され、各群に特有の性状はボツリヌス毒素の診断法や菌の分離法と深く関連する。例えば、発育至適温度は III 群菌が最も高く (40～42℃)、II 群菌が最も低い (28～32℃)。芽胞の耐熱性も各群で異なる。I 群菌は 80℃の加熱処理に耐えるが、II 群菌はもっとも熱抵抗性が低く、特に E 型菌は 60℃で 13 分の加熱でも一部死滅する。また芽胞の発芽は加熱処理により促進されるので、I 群菌を対象とした検査では 80℃での加熱処理が行われる。I 群菌と III 群菌の毒素はトリプシンによりほとんど活性化されないが、II および IV 群菌の毒素は活性化される。I、II および III 群菌はリパーゼ陽性であるが、IV 群菌は陰性である。

近年、ボツリヌス毒素を産生する *Clostridium baratii* (F 型毒素産生) や、*Clostridium butyricum* (E 型毒素産生) が報告された。両菌ともにリパーゼ陰性であるが、*C. baratii* はレシチナーゼ陽性が特徴である。このようにボツリヌス菌試験は、複数の異なる菌や毒素を対象とした試験と考えなければならない。

[ボツリヌス毒素について]

ほとんどのボツリヌス菌は 1 種類の毒素しか産生しないが、一部の I 群菌は 2 種類の毒素を産生する。Ab、Ba、Af、Bf 型があり、大文字は産生量の多い毒素で小文字は少ない毒素を意味する。さらに A 型と B 型の遺伝子を両方保有するが、B 型毒素産生能がないいわゆる B サイレント株が 40%以上存在することが知られている。毒素の中和テストや PCR 法等による遺伝子診断時には、このような菌株の存在を念頭に置く必要がある。C 型毒素のうち C₁ は神経毒であるが C₂ は致死毒である。

3. 増菌 (毒素産生) 培養

- 1) 使用培地：ブドウ糖・可溶性デンプン加クックドミート培地、強化クックドミート培地 (III 群菌が疑われる場合)
- 2) 泡を立てないように注意しながら検体を試験管の底部にピペットで接種する。
- 3) 非加熱群、60℃で 10～15 分加熱群および 80℃で 10～15 分加熱群を作製する。
- 4) 加熱群は流水中で急冷する。
- 5) 嫌気ジャーやグローブボックス内 (特に III 群菌) で 30℃、7 日間培養する。

4. 培養液中の毒素試験法

1) 試料の調整

増菌培養液を緩やかに攪拌後、3,000 回転、4℃で 20 分間遠心して上清を採取する。上清をろ過滅菌し、ろ過液をゼラチン希釈液で 5 倍希釈したものを

試料液とする。

2) 培養液のトリプシン処理による毒素の活性化

試料液に1/10容のトリプシン溶液を加え、37℃で30分間反応させる。

3) マウス腹腔内注射による毒素の同定と型別法 (マウス法)

[腹腔内投与方法]

マウスをケージの蓋に這わせ、尾を引っ張り、背部の皮膚を大きく掴んで持ち上げ、尾部を小指で保定する。

下腹部の正中線を少しはずした部位に注射針を刺入し、皮下に沿って少し進めた後、注射針を立てて腹壁を貫通させる。注射器の内筒を引いて血液や腸管内容物が入ってこないことを確認してから注射する。

一つのケージにマウスを入れる場合、個体識別のためにピクリン酸でマークするとよい。

[毒素の同定と型別法：中和試験]

マウス法には、15～20 gのマウス2匹以上を1群として、次の7群を準備する。

- ▶第1群：培養上清(5倍希釈液)を0.5 ml ずつマウス腹腔内に注射する。
- ▶第2群：培養上清(5倍希釈液)を100℃、10分間加熱処理し、0.5 ml ずつをマウス腹腔内に注射する。
- ▶第3群：培養上清(5倍希釈液)とA型ボツリヌス抗毒素血清(1 IU/ml)と等量に混合し、37℃、15～30分間反応させ、0.5 ml ずつをマウス腹腔内に注射する。
- ▶第4群：操作は第3群と同様で、抗毒素

血清はB型を用いる。

▶第5群：操作は第3群と同様で、抗毒素血清はC型を用いる。

▶第6群：操作は第3群と同様であるが、抗毒素血清はD型(10 IU)を用いる。

▶第7群：操作は第3群と同様で、抗毒素血清はE型を用いる。

注射後24時間までは1、2、4、8、12、18時間目など可能な限り頻繁に観察する。ボツリヌス毒素陽性の場合には24時間以内にほとんどのマウスは死亡するが、産生毒素量が少ないと死亡時間は延長する。最終4日目まで観察する。

第1群がボツリヌス毒素による特有の症状(腹壁の振動、陥凹、後肢麻痺、呼吸困難)を呈して死亡し、第2群が生存し、かつ第3～7群のうちのいずれか1つの群が生存した場合、生存群に使用した血清型に相当する毒素の存在が証明される(症状なしにマウスが死亡しても、ボツリヌス毒素陽性と判定できない)。7群のマウスが全部死亡した場合、ボツリヌス毒素以外の耐熱性毒物の存在が示唆される。

しかし、第1群がボツリヌス毒素による特異的症候を呈して死亡し、第2群が生存したにもかかわらず、第3～7群のマウスが全部死亡した場合は、試料の毒素量に対して用いた抗毒素血清の力価が不十分か、A～E型以外のボツリヌス毒素の存在が示唆される。この場合には、試料原液をさらに希釈して試験するか、他の毒素型(F型、G型)の抗毒素血清による中和試験を試みる。

[単価の抗毒素血清で中和

できない場合]

▶毒素量が過剰である可能性

培養液を10倍、100倍と階段希釈して再試験する。

▶2型以上の毒素が存在する可能性

前述のように、2種類の毒素タイプや複数のボツリヌス菌の混在、あるいは未知の毒素産生菌が存在する可能性がある。

▶交差反応

E型とF型、C型とD型にはそれぞれ交差反応があるので、高単位の抗毒素血清を使用しない。

5. 菌分離培養

1) 使用寒天培地：卵黄加GAM培地、卵黄加CW培地、CBI培地（I群菌用）

2) 増菌培養液を分離培地に画線培養して、嫌気ジャーやグローブボックス内で30℃、2日間培養する。培養液に等量のエタノールを加え、室温で1時間（15分ごとによく混合）処理したもの、あるいは80℃あるいは60℃で10～15分間加熱処理液を画線培養することは、菌の分離を促進するのに有効である。

3) “疑わしい集落”をTPGY培地あるいはクックドミート培地に接種し、30℃で4日間培養し、上述の方法に従い毒素を同定する。

4) 毒素が同定された培養液を再び分離平板に画線培養して、菌が純培養であることを確認する。

[疑わしい集落とは]

I～III群菌はリパーゼ反応により集落

の周囲に、pearly layer あるいはoil-on-water と呼ばれる真珠色の光沢リングを呈する。弱いレシチナーゼ反応が観察されることもある。IV群菌と *C. butyricum* はリパーゼ反応もレシチナーゼ反応も陰性であるが、*C. baratii* はレシチナーゼ反応のみ陽性である。

培養液を約10倍に希釈して卵黄加GAM寒天培地に画線培養すると単独集落を多く分離しやすい。菌が分離できないときは、エタノール処理や加熱処理後の培養液を新しい増菌培地に接種する方法が有効である。

6. PCRによる毒素遺伝子の検出

PCR法単独では毒素産生性の有無を決定できない。サイレント遺伝子の存在、感度や特異性等で問題がある。但し大量の分離株の毒素産生性をスクリーニングする場合に有効である。最終的にはマウスによるバイオアッセイで毒素産生性の有無を決定しなければならない。

[テンプレートの作製]

1) 疑わしい集落をTPGY培地あるいはクックドミート培地に接種し、30℃で18～24時培養する。

2) 培養液0.2 mlを1.5 mlのエピンドルフチューブに採取し、12,000回転、4℃で10分間遠心する。

3) ピペットマン等を用いて上清を捨て（毒素があるので要注意）、0.2 mlのTE-0.1% Tween20を加える。

4) 沈渣をミキサーで均一に懸濁し、100℃で10分間加熱する。この処理により毒

素は失活する。

- 5) 12,000 回転、4°C で 10 分間遠心した上清を PCR に供する。

分離培地上の疑わしい集落を少量の TE-0.1% Tween20 に懸濁してテンプレートを作製する方法もある。この場合は集落のレプリカを作製する。PCR は市販キットを使用する場合にはマニュアルに従う。

D. 考察

ボツリヌス菌を検出する際に、菌を分離・同定することは必ずしも必須条件ではない。増菌培養液中にボツリヌス毒素を検出すれば、菌が存在すると判定できることが他の菌の試験法とは異なる大きな特徴である。この理由として、ボツリヌス菌の適切な選択分離培地が存在しないことや、マウス法による毒素の検出感度が優れているので、菌分離に比べて毒素の検出は容易であることが挙げられる。

日本においても近年増加傾向にある乳児ボツリヌス症の原因食品や感染源はほとんどの事件で解明されていない。食中毒の発生頻度が低く、試験技術の経験を重ねることが非常に困難なために最適なボツリヌス菌試験法が実施されなかった可能性も否定できない。

国内における食中毒菌の試験法は、諸外国の文献や食品衛生検査指針などを参照しながら、それぞれの研究所あるいは研究者独自の様々な工夫を凝らしたものが使用されていると推察される。ところが、

食中毒の発生頻度が低いために、ボツリヌス菌を検出・同定した経験を有する国内の研究者は非常に少ない。しかもボツリヌス菌は分類学的に単一の菌ではなく、過去の国内の食中毒はⅡ群菌によるものが圧倒的に多く、Ⅰ群菌を分離した経験者は僅かであると思われる。ヒトの病気との関連性はないⅢ群菌に至っては、至適培養条件を選択して積極的に分離したものではないと考えられる。

そこで、「食品からのボツリヌス菌検出法」作成に際して、国内の研究者のうちで、過去に厚生労働科学研究等でボツリヌス菌の試験・研究に参加した研究者や、食中毒検査の経験を有する研究者から、それぞれの研究機関で実施している試験法の情報を提供して貰い、これを集約する作業を行った。

ボツリヌス菌試験法の最初のステップである増菌（毒素産生）のための培地として、自作しなければならない肝々ブイヨン等は除外し、市販品があるクックドミート培地を選択した。Ⅲ群菌には強化クックドミート培地が適切であるが、Ⅰ、Ⅱ群菌用にはブドウ糖と可溶性デンプンを添加した（米国 CDC ではチョップドミート培地に添加している）クックドミート培地（米国 FDA が使用している）を第一選択とした。

増菌培養の際に行うヒートショック条件は国内外の状況から、80°C および 60°C で 10-15 分間を選択し、非加熱も含めた 3 種類の条件を設定した。非加熱と 60°C

加熱はⅡ群菌とⅢ群菌を、80℃加熱はⅠ群菌を対象としたものである。

ボツリヌス菌の分離培地として、米国では卵黄加マックラング・トウベ培地等が、日本ではE型菌分離培地として、ハートインフュージョン寒天培地にウマ血液を加えた培地等も使用されていた。標準法としては、日本での普及度を考慮した結果、第一優先培地として卵黄加GAM寒天培地と卵黄加CW寒天培地を選択した。

今回作成した試験法とほぼ同様の方法により、大阪府では過去にカラシレンコン事件に関連して検査したカラシ粉からⅡ群B型菌を始めとして、蜂蜜や香辛料などの食品からⅠ群菌やⅢ群菌を分離した実績がある。東京都でも同様の実績がある。

改正感染症法に基づき二種病原体等に分類されたボツリヌス菌・毒素は、平成19年6月1日から“生物テロに使用されるおそれのある病原体等として管理の強化”が図られた結果、その所持あるいは運搬が厳重に規制されることとなった。このために、標準試験法作成の重要なステップである、コラボスタディにより試験法の実効性を評価するステージの実施は事実上不可能である。実施可能な唯一のコラボスタディとして、PCR用のDNAテンプレートを各研究機関に配布し、毒素遺伝子検出法の評価を行うことが挙げられる。

食品からボツリヌス菌を検出するためには、如何に効率良く食品からボツリヌ

ス菌芽胞を抽出・濃縮するかが非常に重要なポイントである。マウス法に代わる毒素検出法の開発とともに、今後取り組まなければならない重要な課題と思われる。

E. 結論

食品からのボツリヌス菌検出のための標準的な方法を策定するのに際し、日本国内および欧米などの諸外国の試験法に関する情報を収集・解析した。日常的な食品検査に関するボツリヌス菌試験法の情報はほとんどなかった。日本国内、米国内(CDC、FDA)のボツリヌス症の推定原因食品の試験法も使用培地や培養条件の点で一律ではなかった。

特殊な試験法や市販培地がない試験法は除外し、発育(毒素産生)至適温度、発育条件(栄養素、嫌気度)、芽胞の耐熱性などが異なるⅠ群菌、Ⅱ群菌、Ⅲ群菌のすべてを平均的に検出可能であると思われるボツリヌス菌試験法の素案を作成した。

F. 健康危機情報

なし

表1 ポツリヌス菌検出方法の比較(日本国内)

| | 感染研マニュアル | 食品衛生検査指針Ⅱ | 大阪府マニュアル | 香辛料(厚労科研) | 研究協力者 (厚労科研) |
|-------------------|--|--|-------------------------------------|--------------------------|--|
| 増菌培地 | 中毒検体:クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート | 中毒検体:クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート | 中毒検体:クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート | クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート | 中毒検体: クックドミート |
| 増菌培養の条件 | モニタリング:Ⅰ群菌はTYG モニタリング:Ⅱ群菌はTPGY | モニタリング:Ⅰ群菌はTYG モニタリング:Ⅱ群菌はTPGY | PCRテンプレート 作製用:TPGY | PCRテンプレート 作製用:TPGY | Ⅲ群菌:強化クックドミート 肝マブイオン |
| 加熱温度 (ヒートショック) | Ⅰ群菌:80°C、15~30分 Ⅱ群菌:60°C、15分 非加熱 | Ⅰ群菌:80°C、20分 Ⅱ群菌:65°C、20分 Ⅲ群菌:70°C、10~20分 非加熱 | Ⅰ群菌:80°C、10分 Ⅱ群菌:60°C、10分 非加熱 | Ⅰ、Ⅲ群菌:70°C、10分 非加熱 | 80°C、10~20分 70°C、10~20分 75°C、10分 60°C、10~30分 非加熱 |
| 培養温度 | 30°C | 30°Cおよび35°C 一点では30°C | 30°C | 30°C | 30°C |
| 培養期間 | 4日と7日 | 2~10日間 | 7日間 | 7日間 | 1~14日 |
| 分離培地 | 卵黄加:GAM、CW CBI | 卵黄加:GAM、CW CBI | 卵黄加GAM | 卵黄加GAM | 卵黄加:GAM、CW CBI |
| 分離培養の条件 | 卵黄加マックラング・トウベ | 卵黄加マックラング・トウベ | | | 変法LV |
| 培養温度 | 30°C | 30~35°C | 30°C | 30°C | 30°C |
| 培養期間 | 2日間 | 48時間 | 2日間 | 2日間 | 2日間 |
| 毒素検出法 | マウス法 | マウス法 | マウス法 | マウス法 | マウス法 |
| 毒素遺伝子 | PCR | PCR | PCR | PCR | PCR |

TYG: Trypticase-yeast extract-glucose

TPGY: Trypticase-peptone-glucose-yeast extract

表2 ポツリヌス菌検出方法の比較(米国、カナダ)

| | FDA/BAM | CDC(1998年) | カナダ(蜂蜜とシロップ) |
|-------|--|--------------------------------------|--------------|
| 増菌培地 | 中毒検体: I群菌:CMM、Chopped liver II群菌:TPGY | 中毒検体:Chopped meat- glucose-starch | TPGYB |
| 増菌培養 | I群菌:80°C、10~15分 (ヒートショック) II群菌:非加熱 | 80°C、10分 II群菌:非加熱 | 65°C、30分 |
| 培養温度 | CMM:35°C TPGY:28°C | 30°C | 35°C |
| 培養期間 | 5日間 | 4日間 | 7日間 |
| 分離培地 | 卵黄加Liver-veal 卵黄加anaerobic | 卵黄加Maclung-Toabe | 菌分離法の記載はない |
| 培養条件 | 35°C、48時間 | 35°C、48時間 | |
| 毒素検出法 | マウス法 ELISA(A型、B型、E型、F型) | マウス法 | マウス法 |
| 毒素遺伝子 | PCR | | |
| | CMM: Cooked meat medium | | |
| | TPGY: Trypticase-peptone-glucose-yeast extract | | |
| | TPGYB: Trypticase-peptone-glucose-yeast extract-beef extract | | |