

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第24回議事録概要(2010.1.15)

1. 委員長、副委員長、行政より、簡単な挨拶があった。
2. 配布資料の確認・第23回議事抄録案及び、読み上げによる第23回議事録概要案の確認を行った。

### “試験法のバリデーションについて”

3. 本委員会で策定される標準法、および標準法や標準物質を参照値とする代替法のバリデーション方法を規定する必要がある。
4. 微生物のバリデーション手法については国際的に定まっているわけではないが、準拠する規程等はいくつかあるので、これを基にこの委員会で統計処理や必要なデータ数の設定などに関してガイドラインとして目安を示す。
5. 微生物試験法では正確性を問うことが難しい部分があり、不確かな部分が多い。
6. 過去に実施した試験結果が充分あれば、それを編集することによって共同試験を省略することもできるのではないか。
7. 微生物試験では、通常、離散値(菌数)を対数変換して連続値として扱っているが、この問題は統計的にも重要な課題として現在も議論されている。
8. 統計については、専門家のアドバイスは必要で、今後専門家を育てる必要がある。
9. 試験法の同等性についてどのくらい検討するのかを示す必要がある。
10. 試験の不確かさについても考慮する必要がある。
11. アドバイサーを含めたバリデーション設計ワーキンググループを作って議論する。
12. ISO16140 には、レファレンスメソッドのバリデーションについては述べられていない。
13. 標準試験法の作成に当たってのバリデートをどうするかについては、委員会でどのようにするか決める。
14. 公定法は、行政的に迅速な対応が必要な場合もあり、当初必ずしも十分にバリデートされない場合もあり得るが、最終的には科学的な根拠があるものとする必要がある。
15. 微生物でも、農薬のように標準法と代替法とのバリデーション方法に関するガイドラインが必要である。
16. 検討する食品種数については、SIC コードから5つとか安を目安を決める必要がある。
17. 同等性という言葉が多数出てくるが、本当の意味がよくわからない。
18. 定性試験に関するバリデーションとはどういうことかわからない
19. バリデーションについては、作業部会である程度整理して、具体的な例についてガイドラインなどを提案をする。
20. 標準試験法を導入するときに行う Verification(検証)については、バリデーションとは異なるので別にガイドラインとして示すべきだ。
21. 標準試験法と同等な試験法とはどのように評価したらよいのかということを示すこ

とが重要である。

“リステリア試験法について(ステージ2)” について

22. 検討している試験法は、ISO11290 をベースにしている。
23. ISO では ALOA 培地を、日本ではクロモアガーを用いているため、両者を評価したところ、どちらもほとんど差がない結果が得られた。
24. 示された結果の表で平均値の異なる所が指摘され、見直しすることになった。
25. 添加回収試験で培地の輸送中に菌数の変化がみられ、機関間のばらつきが観察された。
26. リステリアは低温でのコントロールが難しく、今後添加回収実験では凍結サンプルについても検討する必要があるかもしれない。
27. なぜプレラボをするかという前提をはっきりし、実験結果を示すとわかりやすい。
28. プレラボの目的はコラボ案を出すためのたたき台で、コラボで最終的に何と何を比較するかははっきりとさせる。

“<衛生指標菌試験法について(ステージ2)>”

29. 衛生指標菌・菌群試験法は、ISO 法をそのまま導入する。
30. プロトコールとして完成している試験法を使うとなると、これまでの4つのステージの議論は必要ないと思われる。
31. JIS 化する時の著作権が有料の問題は今後の課題である。
32. JIS とすれば、ISO の和訳にコメントが付けられる。
33. 検証のデータ出しは、日本固有の食品に関しておこない、コラボの必要性などについては、次回以降に決定する。

“<カンピロバクター試験法について(ステージ3)>”

34. 日本で2, 3年前から拡張型β-ラクタム系耐性 (ESBL) 大腸菌が蔓延している。この影響で ISO10271-1 のプロトコールが機能しなくなっている。
35. ISO に状況を連絡する必要がある。
36. ボルトンで増菌し、分離培地をmCCDA とバツラー培地にするならば、プレストンで増菌し、mCCDA とバツラー培地にした方がよい結果が得られる。
37. *C. coli* の検討を行う必要があると思われる。
38. 増菌培地はプレストンが *C. jejuni*、ボルトンが *C. coli* との相性がいい。

“<その他>”

39. 2月の検討委員会でリステリアはコラボの作成案。衛生指標菌についてはどこまで評価する必要があるか議論するので予め意見を考えておいてください。
40. オブザーバー希望者が多くなりすぎましたので、今後は人数制限をかけさせていただくこととなります。

以上

平成 21 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	日本食品分析センター
	高橋元秀	国立感染症研究所
研究協力者	小崎俊司	大阪府立大学
	幸田知子	大阪府立大学
	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
	吉田信一郎	日本食品分析センター
	木村由紀子	日本食品分析センター
	山口聡子	日本食品分析センター
	岸田一則	千葉県衛生研究所
	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
	梅田 薫	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
	山口 卓	日本冷凍食品検査協会
	畠山 敬	宮城県保健環境センター
	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
	石原ともえ	神奈川県衛生研究所
	相川勝弘	神奈川県衛生研究所
	岡野 洋	沖縄県衛生研究所
	須釜久美子	福島県衛生研究所
	鳥谷竜哉	愛媛県立衛生環境研究所

## 研究要旨

細菌試験法の基本である培養法に比べて、PCR 法などによる遺伝学的手法には新しい知見が報告される頻度が高い。このために、ボツリヌス菌試験法の原案は、「ボツリヌス菌試験法（案）」と、新規の技術に対応して改正する頻度が高いと考えられる「分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法（案）」の二部に分割して、食品からの微生物標準試験法検討委員会へ提出した。二つの原案は、諸外国と国内の情報や技術を総合的に勘案して、日本の 17 の研究機関のボツリヌス菌研究者と協議し作成されたものである。原案の作成に際して、PCR 法による毒素遺伝子検出法の利用範囲およびプライマーの選択、増菌培養時の加熱条件、使用培地の選定などを重要項目とし、各研究機関から報告された実験データなどに基づいて検討した。

### A. 研究目的

日本国内でのボツリヌス食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。今後さらにボツリヌス菌研究者が減少することが危惧されるので、信頼性が高く、かつ効率の良い食品中のボツリヌス菌検出法を構築することが急務である。本研究では、ボツリヌス菌を検出、あるいは厚生労働科学研究などで取り扱った実績がある研究者の経験を集約・検証し、これに基づき作成した試験法を原案とし、「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）に提出することを主たる目的とした。

### B. 研究方法

日本の 17 の研究機関で実施されている食品を対象としたボツリヌス菌試験法、および諸外国とくに欧米のボツリヌス菌試験法を調査・集約した。この結果に基

づいて作成した試験法の素案の中で、簡略化あるいは追加すべきポイントに検討を加えた。検討した具体的な内容は、PCR 法による毒素遺伝子検出法の利用範囲およびプライマーの選択、増菌培養時の培地の加熱条件などである。最終的に、国内の研究者と問題点を整理して作成した試験法を原案として標準試験法検討委員会に提出し、各委員から追加や修正に関する意見を求めることとした。

#### 1. ボツリヌス菌芽胞の耐熱性試験

##### 1-1 培地

##### 1) クックドミート培地

クックドミート培地	1.25 g
精製水	10 ml
121°C、15 分間オートクレーブ	

##### 2) ブドウ糖・可溶性澱粉加クックドミート培地

クックドミート培地	1.25 g
ブドウ糖	0.03 g
可溶性澱粉	0.02 g
精製水	10 ml

121°C、15 分間オートクレーブ

### 3) TP 培地

トリプティケース・ペプトン	5.0 g
バクト・ペプトン	0.5 g
メルカプト酢酸ナトリウム	0.1 g
精製水	100 ml

121°C、15 分間オートクレーブ

### 4) 卵黄加 GAM 寒天培地

GAM 寒天培地	74 g
精製水	1,000 ml

115°C、15 分間オートクレーブ

50~55°Cの温浴中で冷却・保温した50%卵黄液を100 ml 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20~25 ml ずつ分注して固める。

#### 1-2 I 群菌の芽胞液調整法

- 1) 菌株を10 ml のクックドミート培地に接種した。
- 2) 80°Cで15分間加熱後に流水で急冷し、30°Cで2日間嫌気培養した。
- 3) 培養液を80°Cで15分間加熱後に流水で急冷した。
- 4) 加熱した培養液2 ml をTP培地200 ml に接種し、30°Cで7日間嫌気培養した。
- 5) 培養液60 ml を2本のチューブに分注し、2,040×gで30分間遠心した。
- 6) 上清を捨て、沈渣を滅菌精製水6 ml に懸濁した。
- 7) 懸濁液を80°Cで15分間加熱後に流水で急冷し、凍結保存用チューブに0.5 ml ずつ分注してマイナス80°Cで保存した。

#### 1-3 II 群菌の芽胞液調整法

- 1) 菌株を10 ml のブドウ糖・可溶性澱粉

加クックドミート培地に接種し、30°Cで16~24時間嫌気培養した。

- 2) 培養液を60°Cで13分間加熱後に流水で急冷した。
- 3) 加熱した培養液2 ml をTP培地200 ml に接種し、30°Cで7日間嫌気培養した。
- 4) 培養液60 ml を2本のチューブに分注し、2,040×gで30分間遠心した。
- 5) 上清を捨て、沈渣を滅菌精製水6 ml に懸濁した。
- 6) 懸濁液を60°Cで13分間加熱した後に流水で急冷し、凍結保存用チューブに0.5 ml ずつ分注し、マイナス80°Cで保存した。

#### 1-4 芽胞の耐熱性の検討

マイナス80°Cで保存していた芽胞液を室温で融解し、生理食塩水で10倍階段希釈した。希釈した芽胞液0.1 ml を各希釈段階につき2枚ずつの卵黄加GAM寒天培地に塗抹し、I群菌は35°Cで、II群菌は30°Cで2日間培養した。芽胞液の耐熱性や発芽・増殖への影響を調べるために、I群菌の芽胞液は80°Cで10分間、II群菌の芽胞液は60°Cで10分間加熱して菌数を測定した。

#### 2. PCR用プライマーの検討

A、B、EおよびF型毒素遺伝子検出用のプライマーとしては、大阪府立公衆衛生研究所および東京都健康安全研究センターが以前より使用していたものを用いることとした。C型、D型、C/Dキメラ、D/Cキメラ毒素遺伝子検出用のプライマーは大阪府立大学が開発したプライマーを選択した。

#### 3. その他の検討事項

試験に使用する食品の検体量、培養液のトリプシン処理、増菌（毒素産生）用培地、分離平板培地などについても議論した。

## C. 研究結果

### 1. 試験法全体の検討

試験に供する食品の検体量を明記すべきであるとの意見があった。しかし、国内法にはボツリヌス菌に対する規格や基準はないので、これを明記することはできないとの結論になった。国内の使用実績に基づき、分離平板には卵黄加 GAM 寒天培地と卵黄加 CW 寒天培地を併用することとした。PCR 法は増菌培養の段階でマウス法に変えることが可能かについても議論した。毒素検出法の世界標準はマウス法であること、種々の食品で PCR 法とマウス法が同等であることを保証できるデータがないことから、現段階ではマウス法を選択した。PCR 法は、あくまでも標準法に対する同等性の評価の手順を経た後に採用されるべき代替法であると位置づけた。

### 2. PCR 法による毒素遺伝子検出条件の検討

A、B、E および F 型ボツリヌス菌保存株を使用して、PCR の条件を検討した。

「分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法（案）」に示した条件で、検討した合計 71 株のボツリヌス菌から毒素型と一致した毒素遺伝子が検出できた（表 1）。

ウシ由来株 8 株は D/C キメラ毒素遺伝子を保有し、トリ由来の 16 株は C/D キメラ毒素遺伝子を保有し、これらは C 型および D 型毒素遺伝子と区別することができた。

### 3. 食品培養時の加熱条件の検討

合計 3 カ所の研究所から提出された、過去のボツリヌス菌検出事例を表 2~4 に示した。非加熱と加熱条件下でのボツリヌス菌の検出状況には、加熱が良い場合もあり、非加熱が良い場合があるというように、一定の傾向はなかった。また、同一ロット・バッチの検体を繰り返し試験しても、同じ結果は得られなかった（表 4）。

ボツリヌス菌芽胞の加熱処理による発芽・発育への影響を検討した。I 群菌では 80℃で 10 分間、II 群菌では 60℃で 10 分間の加熱処理によっても、発育菌数には差がなかった（表 5）。

### 4. 標準試験法原案の作成

PCR 法による遺伝学的手法は、培養法に比べて新しい知見が報告されるスピードが速い。新しい技術を迅速に採用しやすくする目的で、以下のように培養法と PCR 法は別々のプロトコールにした。

#### ボツリヌス菌試験法（案）

#### 1 ボツリヌス菌とボツリヌス毒素産生菌の概要

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は生化学的性状などにより I 群~IV 群に区分され、産生される毒素の抗原性の違

いにより A~G の 7 型に分類されている。

I 群菌は *Clostridium sporogenes* と、III 群菌は *Clostridium novyi* と毒素産生性以外は区別できないし、IV 群菌には *Clostridium argentinense* の菌名が提案されている。ボツリヌス菌以外にも、E 型毒素を産生する *Clostridium butyricum* や F 型毒素を産生する *Clostridium baratii* がある。

## 2 試験の概要 (図)

食品中のボツリヌス菌の存否は、検体を毒素産生用培地で増菌培養し、その上清中の毒素を検出することにより決定する。毒素を検出・同定すれば、たとえ菌が分離できなくてもボツリヌス菌陽性と判定できる。ボツリヌス菌と類縁菌を鑑別できる生化学的性状はないので、毒素検査なしにボツリヌス菌を確実に分離できる選択培地は存在しない。

ボツリヌス菌には発育至適温度や芽胞の耐熱性等が異なる複数の菌が含まれているので、単一の培養法ですべての菌を効率よく検出することはできない。ボツリヌス毒素を検出・同定するためには、現時点ではマウスを使用する方法が信頼性も高かつ感度も良い。毒素の同定は抗毒素血清によるマウス中和試験で行う。PCR 法等の遺伝学的手法は、分離菌株の中からボツリヌス菌をスクリーニングする方法としては有効であるが、確定診断には使用できない。

## 3 使用機器・器具

- ・ストマッカーとフィルター付きストマッカー袋

- ・嫌気ジャーとガスパック
- ・恒温水槽
- ・恒温培養器
- ・高速冷却遠心機
- ・滅菌注射器 (1 ml)
- ・滅菌フィルター (孔径 0.45  $\mu$ m 以下)
- ・ピペットマン等

## 4 試薬類

### 4-1 希釈液

#### 4-1-1 滅菌ペプトン加生理食塩水

ペプトン	1.0 g
塩化ナトリウム	8.5 g
精製水	1,000 ml

pH 7.0 $\pm$ 0.1

121°C で 15 分間滅菌する。

#### 4-1-2 滅菌ゼラチン希釈液

ゼラチン	2 g
リン酸一水素二ナトリウム	4 g
精製水	1,000 ml

pH 6.2 $\pm$ 0.1

121°C で 15 分間滅菌して冷蔵庫に保存する。

### 4-2 毒素の活性化用トリプシン溶液

結晶トリプシンは 0.001N 塩酸に 2 mg/ml の濃度に溶解する。

トリプシン (1 : 250) は 10% に希釈する。

### 4-3 マウス

約 20 g のマウスを使用する

### 4-5 毒素中和テスト用抗毒素血清

日本で販売されていたボツリヌス毒素の診断用抗毒素血清は、製造元である千葉県血清研究所の廃所 (2003 年) にともない入手できなくなった。国立感染症研

究所は、中国蘭州生物製品研究所より単味の A、B、E、F のウマ免疫血清を購入し、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により比較・標準化した。標準化された抗毒素血清は、15ヶ所の全国地方衛生研究所に配布されている。

（上記 4 型の血清を食品試験で使うことが可能か否か、また環境中から分離頻度の高い C 型と D 型は配布されていないので、対応方法を厚生労働省対応部局と検討中である。）

#### 4-6 増菌培地

##### 4-6-1 ブドウ糖・可溶性澱粉加クックドミート培地

###### 4-6-1-1 培地組成：代表例

クックドミート培地	1.25 g
ブドウ糖	0.03 g
可溶性澱粉	0.02 g
精製水	10 ml

pH 7.2±0.2

###### 4-6-1-2 培地の調製

クックドミート培地に、あらかじめ加温溶解したブドウ糖と可溶性澱粉溶液を分注し、121℃で 15 分間滅菌後に直ちに流水中で急冷する。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で 10 分間加熱後に急冷してから使用する。

#### 4-6-2 TPGY 培地

##### 4-6-2-1 培地組成

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
精製水	1,000 ml

pH 7.0±0.1

##### 4-6-2-2 培地の調製

121℃で 15 分間滅菌後に直ちに流水中で急冷する。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で 10 分間加熱後に急冷してから使用する。

#### 4-7 分離培地

##### 4-7-1 卵黄加GAM寒天培地

基礎培地組成/L (GAM寒天培地)：

###### 代表例

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

pH 7.1±

##### 4-7-2 卵黄加CW寒天培地

基礎培地組成/L (CW寒天培地)：代表例



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

pH 7.2±

#### 4-7-3 L-システイン塩酸塩溶液

L-システイン塩酸塩1 gを900 mlの精製水に溶解後、pH 7.1に調整する。

#### 4-7-4 50%卵黄液

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。

#### 4-7-5 培地の調製

##### 4-7-5-1 卵黄加 GAM 寒天培地

L-システイン塩酸塩溶液 900 ml に GAM 寒天培地 74 g を加温溶解後、115°C で 15 分間滅菌する。50~55°C の温浴中で冷却・保温後、50%卵黄液を 100 ml 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 20~25 ml ずつ分注して固める。

(参考)

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。

##### 4-7-5-2 卵黄加 CW 寒天培地

精製水 1,000 ml に CW 寒天培地 60 g を加え、加温溶解に 121°C で 15 分間滅菌する以外は、4-7-5-1 と同様にして平板を作製する。

#### 5 試験法

##### 5-1 増菌（毒素産生）培養

クックドミート培地 10 ml に検体 1 ml (g) を、気泡が入らないように注意しながら試験管の底部に接種する。非加熱群、60°C で 10 分加熱群および 80°C で 10 分加熱群を作製し、加熱後は流水中で急冷した後に嫌気ジャー内で 7 日間培養する。

##### 5-2 培養液中の毒素の検出・同定

###### 5-2-1 試料の調製

増菌培養液を緩やかに攪拌後エッペンドルフチューブに入れ、12,000 回転、4°C で 5 分間遠心して上清を採取する。遠心上清をフィルターでろ過滅菌した後に、ゼラチン希釈液で 5 倍希釈したものを毒素試験に供する。

###### 5-2-2 毒素の活性化

5 倍希釈した増菌培養液に 1/10 容の結晶トリブシン溶液あるいは 1:250 トリブシン溶液を加え、37°C で 30 分間反応させる。

###### 5-2-3 マウス腹腔内注射による毒素の同定と型別法

### 5-2-3-1 腹腔内投与法

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い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、個体識別のためにマウスの頭、首、背中、尻、尻尾、前足、後足と標識すれば、無標識を含めて1ケージに8匹を同時に飼育できる。

### 5-2-3-2 毒素の検出と中和試験による同定

トリプシン処理(5-2-2)した検体0.5mlを2匹ずつのマウス腹腔内に注射する。検体中にボツリヌス毒素が存在すれば、5-2-3-3に示すような特有の症状によりマウスが死亡する。最終的には、以下の中和試験により毒素の同定・型別を行う。

マウス法による中和テスト用の抗毒素血清のうちA、B、C、E、F、G型は1IU(国際単位)で、D型は10IUで使用する。無処理の検体、およびトリプシン処理(5-2-2)した検体1mlと各抗毒素血清(D型は100IU、それ以外は10IU)0.25mlを混合し、37°C、15~30分間反応させ、0.5mlを2匹ずつのマウス腹腔内に注射する。

### 5-2-3-3 結果の判定

検体中にボツリヌス毒素が存在すれば、

マウスは腹壁の振動、腹壁陥凹、後肢麻痺、呼吸困難のような特有の症状を呈して死亡する。このような症状なしにマウスが死亡しても、ボツリヌス毒素陽性とは判定できないので、検体を注射後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マウスを観察する。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。

無処理の検体を注射したマウスが死亡し、中和群のうちのいずれか1つの群のマウスが生存した場合、その血清型に相当する毒素の存在が証明される。

ボツリヌス毒素特有の症状でマウスが全部死亡した場合は、①用いた抗毒素血清の力価に対して毒素量が過剰である、②A~G型以外のボツリヌス毒素の存在、③複数のボツリヌス菌の混在、④1種類の菌が2種類の毒素を産生する可能性が考えられる。Ab、Ba、Af、Bf型が報告されており、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。①の毒素量が過剰である場合は、試料液を10倍、100倍と希釈して中和試験に供する。③と④の場合は、2種類の抗毒素血清を混合して中和を試みる。

C型毒素とD型毒素には、重鎖のC末端領域が相互に入れ替わったモザイク毒素(C/D毒素、D/C毒素)が知られており、それぞれ単独の抗毒素血清では完全には中和できない場合がある。菌が分離できれば、別紙に示したPCR法によりモザイク毒素のタイプを決めることができる。

この段階で毒素が検出されなければボツリヌス菌は陰性と、毒素が同定できればボツリヌス菌陽性と判定する。毒素が検出された培養液から菌の分離培養を試みるが、それは必ずしも成功するとは限らない。

### 5-3 菌の分離培養

毒素が検出された培養液を卵黄加 GAM 寒天培地あるいは卵黄加 CW 寒天培地に画線培養して、嫌気ジャー内で 30℃、2 日間培養する。ただしⅢ群菌の C 型および D 型毒素が検出された場合は卵黄加 GAM 寒天培地を使用し、37℃で 2 日間培養する。Ⅰ～Ⅲ群菌を疑えるボツリヌス菌集落の周囲には、リパーゼ反応により 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。Ⅲ群菌ではレシチナーゼ反応も見られることがある。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。

上述の“疑わしい集落”を TPGY 培地へ接種後に、嫌気ジャー内で 30℃、4 日間培養して、5-2 の方法に従い毒素を同定する。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。

### 5-4 PCR 法

分離菌株のボツリヌス毒素遺伝子検出法は別紙に示した。

### 6 付帯事項

本試験法は、新たな知見や情報が得ら

れた場合には速やかに、長くても 5 年ごとに見直すこととする。

### 7 注意事項

ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」により二種病原体等に指定されている。食品検査でボツリヌス菌・毒素を取り扱う際には、所持者の義務、施設の基準、運搬の基準などのバイオセキュリティ対策が規定されているので、その詳細は厚生労働省のホームページを参考にされたい。

### 分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法（案）

#### 1 目的

本 PCR 法は、卵黄加 GAM 寒天培地と卵黄加 CW 寒天培地に発育した集落の中から、毒素産生菌をスクリーニングすることを目的とする。

マウス中和試験では同定が困難である、C 型毒素と D 型毒素の重鎖 C 末端領域が相互に入れ替わったモザイク毒素（C/D 毒素、D/C 毒素）遺伝子を、PCR 法により鑑別する方法も示した。

#### 2 注意点

PCR の実施に際し、①一部のⅠ群菌は、Ab、Ba、Af、Bf 型と表現されるような、抗原性の異なる 2 種類の毒素を産生すること、②A 型と B 型両方の毒素遺伝子を保有するが、B 型毒素産生能がないいわゆる B サイレント株が 40% 以上存在することに留意する必要がある。

### 3 使用器具

- ・ ヒートブロック
- ・ 微量高速冷却遠心器
- ・ 冷凍庫
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 電気泳動装置
- ・ UV トランスイルミネーター
- ・ マイクロピペット
- ・ マイクロピペット用チップ
- ・ チューブ類 (PCR 用、テンプレート作製用)
- ・ 滅菌フィルター (孔径 0.45  $\mu$ m 以下)

### 4 試薬類

- ・ TE buffer, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA)
- ・ DNA 染色剤、例えばエチジウムブロマイド
- ・ ローディングバッファー
- ・ アガロース
- ・ 100 bp DNA ladder
- ・ 20 xTAE buffer, pH 8.3 (2 M Tris-acetate/50 mM EDTA)
- ・ PCR 用キット (TaKaRa Ex Taq)

### 5 プライマー

5-1 A、B、E、F 型毒素遺伝子検出用プライマー

A 型 Size: 782 bp

Forward (CBMLA1):

AGCTACGGAGGCAGCTATGTT

Reverse (CBMLA2):

CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG

B 型 Size: 205 bp

Forward (CBMLB1):

CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA

Reverse (CBMLB2):

CTT GCGCCTTTGTTTTCTTG

E 型 Size: 389 bp

Forward (CBMLE1):

CCAAGATTTTCATCCGCCTA

Reverse (CBMLE2):

GCTATTGATCCAAAACGGTGA

F 型 Size: 543 bp

Forward (CBMLF1):

CGGCTTCATTAGAGAACGGA

Reverse (CBMLF2):

TAACTCCCCTAGCCCCGTAT

5-2 C 型、D 型、C/D モザイク、D/C モザイク毒素遺伝子検出用プライマー

① C 型、C/D モザイク毒素遺伝子に共通 (Size: 800 bp)

Forward (C5F):

TTGAAAATGGTAGTTGGAAAGTA

Reverse (C26R):

ATATGAATCTTTCCATCTCTTAA

② D 型と D/C モザイク毒素遺伝子に共通 (Size: 884 bp)

Forward (D9F):

TTAATATAGAAAATTCGGGTCA

Reverse (C26R):

ATATGAATCTTTCCATCTCTTAA

③ C/D モザイクと D 型毒素遺伝子に共通 (Size: 713 bp)

Forward (C12F):

GTTGGTGAAGTAGATAGATTAAA

Reverse (D15R):

ATCTCTAATCCAAAGCATCTG

④ D/C モザイクと C 型毒素遺伝子に共通 (Size: 816 bp)

Forward (C12F) :

GTTGGTGAAGTAGATAGATTA

Reverse (C23R) :

AACATTAGTATATTGCAAGCT

C型は①と④が陽性、D型は②と③が陽性、C/Dモザイクは①と③が陽性、D/Cモザイクは②と④が陽性となる。

#### 6 TPGY 培地

##### 6-1 培地組成

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 7.0±0.1

##### 6-2 培地の調製

121°Cで15分間滅菌後に直ちに流水中で急冷する。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で10分間加熱後に急冷してから使用する。

#### 7 方法

##### 7-1 テンプレート DNA の作製

・分離培地に発育した集落を TPGY 培地に接種して、嫌気ジャー内で 30°C、

2日間培養する。

・増菌培養液 0.5 ml をエッペンドルフチューブに入れ、12,000 回転、4°Cで5

分間遠心する。

・上清を捨て、沈渣を滅菌生理食塩水で遠心洗浄した後、0.5 ml の 0.1%

Tween20-TE buffer に懸濁する。

・懸濁液を 100°Cで10分間加熱後、遠心

上清をろ過滅菌してテンプレート DNA とする。

集落から直接テンプレート DNA を作製する場合は、少量の菌を 0.1 ml の 0.1% Tween20-TE buffer に懸濁し、以下同様の操作をする。

##### 7-2 反応溶液組成 (1 反応分)

TaKaRa Ex Taq (5 unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
10x Ex Taq Buffer	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$ l
Sample DNA	5 $\mu$ l
Forward Primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
(final 0.4 $\mu$ M)	
Reverse Primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
(final 0.4 $\mu$ M)	
H <sub>2</sub> O	33.75 $\mu$ l

##### 7-3 PCR反応条件

初期変性 95°C、5 min

95°C、30 sec

53°C (C、D型) あるいは 57°C (A、B、E、F型)、30 sec

72°C、1 min

30サイクル

72°C、10 min

10°Cに冷却

##### 7-4 判定

・PCRサンプルの 5  $\mu$ l を 2%アガロースゲル (1x TAE buffer) で電気泳動する。

・エチジウムブロマイドなどの DNA 染色剤で染色する。

・バンドを UV トランスイルミネーターにて観察する。

##### 7-5 付帯事項

本試験法は、新たな知見や情報が得られた場合には速やかに、長くても5年ごとに見直すこととする。

#### D. 考察

ボツリヌス菌を検出する際には、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。このボツリヌス菌試験法の特徴をより明確にするために、「ボツリヌス菌試験法」をさらに毒素検出法と菌分離法の二部に分割するのが適切であると標準法検討委員会から提案されたので、来年度の検討課題とすることとした。

標準法検討委員会の方針として、使用する培地は可能な限り一種類に限定することで合意されているが、日本での普及度と実績を考慮した結果、卵黄加 GAM 寒天培地と卵黄加 CW 寒天培地は併記するのが妥当であるとの結論になった。培養温度や培養時間などは、一定の許容範囲を表示することで合意されているが、ボツリヌス菌は、発育至適条件などが異なる菌の集合であるために、例外措置として合意された記載方法には従わないことにした。

提案した試験法（案）には、試験に供する食品の量が記載されていないことが指摘された。しかし、国内法にはボツリヌス菌に対する規格や基準はないので、これを明記することはできない。食品の

ボツリヌス菌汚染菌数は非常に少ないことが知られているので、同一ロット・バッチを複数回検査すると、表4に示したように試験結果に違いが生じることがある。あえて検体量を示すならば、ICMSF（国際食品微生物規格委員会）のサンプリングプランが指標となる。もっともリスクの高い菌の一つであるボツリヌス菌には、 $N=60$ 、 $C=0$ 、 $m=0/25\text{ g}$ が適用されるので、検体量の合計は1.5 kgとなり現実的ではない。いずれにしても、試験に供する検体量はリスク評価に基づいて決定されるものであり、標準法検討委員会で検討する問題ではない。日本と同様に、ISOのTC34/SC9でもボツリヌス菌試験法の検討が始まるとの情報がある。ISOの情報を継続的に入手し、これを日本の試験法に反映させ、試験法の国際調和を図る必要があると考えられる。

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およびボツリヌス毒素は、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予定である。なお、原案に記載したA

型プライマーは、破傷風菌毒素遺伝子を増幅して非特異反応を起こす可能性があることが最近報告されたので、新しいA型プライマーの設計も来年度の検討課題とする。

地方衛生研究所や登録検査機関などからは、診断用抗毒素血清が入手できないことへの対応が求められ、標準法検討委員会でもその対応が急がれることが指摘された。診断用の抗毒素血清の入手法については、関係当局と調整中である。

#### E. 結論

ボツリヌス菌試験法の原案は、「ボツリヌス菌試験法(案)」と「分離菌株のPCR法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法(案)」の二部に分割して標準法検討委員会へ提出した。これらの原案は、諸外国と国内の情報や技術を総合的に勘案して、日本の17の研究機関のボツリヌス菌研究者の合意により作成されたものである。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 浅尾 努 (2009) 微生物検査の現状とこれから —衛生指標菌等について—、ソフト・ドリンク技術資料 158 : 191-206.
2. 浅尾 努 (2009) わが国の食品微生物検査の展望、—日本の衛生指標菌試験法のあるべき姿—、日本食品微生物学雑誌、

26 : 163-167.

3. 浅尾 努 (2009) *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, pp 365-377, 食品由来感染症と食品微生物、中央法規出版、東京
4. 浅尾 努、木股裕子 (2009) 行政検査、食品由来感染症と食品微生物、pp 58-67、中央法規出版、東京
5. 河合高生、浅尾 努 (2009) *Bacillus cereus*、食品由来感染症と食品微生物、pp 439-455、中央法規出版、東京
6. 浅尾 努、河合高生 (2010) 食品中の食中毒菌検査法 ボツリヌス菌、日本防菌防黴学会誌、印刷中
7. 浅尾 努 (2010) 感染症制御のための公衆衛生の役割 食中毒、総合臨床、59 : 426-430.
8. Yuichiro Tanaka, Hajime Takahashi, Akiya Imai, Tsutomu Asao, Shunji Kozaki, Shizunobu Igimi and Bon Kimura (2010) Reconsideration of flexibility in verifying rapid alternative food microbiological methods. Food Control, 21: 1075-1079.

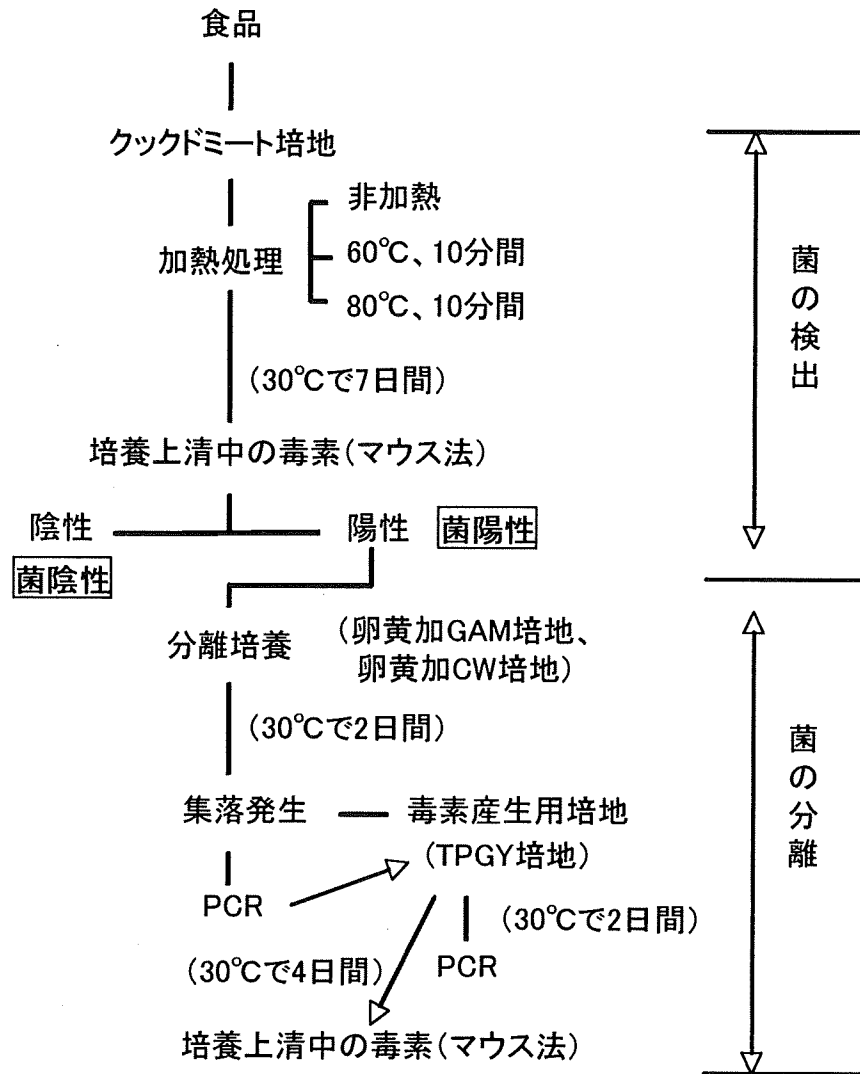


図 ボツリヌス菌試験法の概略



表1 PCR法によるボツリヌス毒素遺伝子の検出

菌株の毒素型	菌株数	陽性数
A型	30	30
B型	24	24
C型	6	6
D型	2	2
C/D型	16	16
D/C型	8	8
E型	4	4
F型	5	5
合計	71	71

保存株をクックドミート培地で30°C、3日培養  
再びクックドミート培地で30°C、2日培養後に  
培養液をPCRに供した

表2 ボツリヌス菌を検出した食品			大阪府立公衆衛生研究所		
香辛料 (未殺菌)	原産地	菌型	クックドミート培地		耐熱性 嫌気性菌数/g
			非加熱	加熱	
マスタード	?	B(Ⅱ群菌)	NT	○(1/10)*	NT
ジンジャー	インド	C	×(0/2)	○(1/2)	20
フェヌグリーク	インド	D	○(1/2)	○(2/2)	NT
ジンジャー	中国	B(Ⅰ群菌)	×(0/2)	○(1/2)	2

加熱は70°C10分間

\*加熱は80°C10分間、C型毒素を検出したが、菌は分離できず

NT: 検査せず

食中毒検体	菌型	クックドミート培地		
		非加熱	60°C、10分	80°C、10分
カラシレンコン1	A(B)	○(1/1)	○(1/1)	○(1/1)
カラシレンコン2	A(B)	○(1/1)	○(1/1)	×(0/1)

A(B): Bはサイレント

表3 ポツリヌス菌を検出した食品(1998年～2007年) 東京都健康安全研究センター

食品の種類	食品名	原産地	菌型	菌数 MPN/100g	クックドミート培地	
					非加熱	加熱
調味料等	トムヤンクンペースト	タイ	F	<30	○	NT
	カレーペースト	インド	D	91	○	NT
	ピクルドグラミーフィッシュ	タイ	D	<30	○	×
	腐乳	台湾	D	<30	○	×
	コチュジャン	韓国	A	NT	×	○
食肉製品	生ハム	日本	A	NT	○	×
ハーブ	ネルト(イラクサ)	ポーランド	B(I群菌)	NT	×	○
	キンコウ(銀杏葉)	中国	E	NT	×	○
香辛料	桂皮(未殺菌)	中国	F	<30	○	×
	黒コショウ(未殺菌)	インド	D	<30	○	×
食中毒	グリーンオリーブ	イタリア	B(I群菌)		平板培地から直接分離	
	ハヤシライス(の具)	日本	A	NT	×	○

NT:検査せず

表4 ポツリヌス菌を検出した検体(1998年～2009年)

検体	菌型	*試行数	クックドミート培地		
			非加熱	60°C、15分	80°C、20分
飼料(魚粉、ぬか、きなこ、米粉)	CまたはD	1	2/2	2/2	0/2
		2	2/2	1/2	NT
		3	2/2	1/2	NT
魚粉	CまたはD	1	0/2	0/2	2/2
		2	NT	NT	0/2
		3	NT	NT	0/2
国産はちみつ	CまたはD	1	2/2	NT	0/2
漬け物(大葉含、真空包装)	C	1	0/2	2/2	0/2
		2	0/2	2/2	0/2
		3	0/2	0/2	0/2
キノコ粉末 (マイタケ、ヒラタケ、シイタケ、 アガリクス等)	D	1	2/2	0/2	2/2
		2	2/2	2/2	2/2
		3	2/2	2/2	2/2
キノコ粉末 (マイタケ、ヒラタケ、シイタケ、 アガリクス等)	D	1	1/2	0/2	2/2
		2	0/2	0/2	2/2
		3	0/2	0/2	0/2

\*国産はちみつ以外は同一検体を3回検査した

NT:検査せず

菌の分離は実施せず

表5 ボツリヌス菌芽胞のヒートショック条件の検討

菌株名	群	毒素型	非加熱の 菌数	加熱後の 菌数
Renkon	I	A	$3.7 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$
Osaka99	I	A	$6.4 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6$
Okra	I	B	$2.0 \times 10^8$	$2.1 \times 10^8$
Osaka06	I	B	$4.9 \times 10^8$	$9.0 \times 10^8$
Langeland	I	F	$4.5 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$
Honey-2	I	F	$9.9 \times 10^7$	$7.1 \times 10^7$
Biwako	II	E	$2.9 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$
Tenno-2	II	E	$1.4 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
Mustard	II	B	$2.5 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$

I 群菌は80°C、II 群菌は60°Cで10分間加熱

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

*Listeria monocytogenes* の標準試験法に関する研究

研究分担者	仲真晶子	東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科	科長
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	主任研究官
研究協力者	樋脇 弘	福岡市保健環境研究所保健科学課	課長
	江瀬寿美	福岡市保健環境研究所保健科学課	研究員
	中村寛海	大阪市立環境科学研究所	研究主任
	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所	専門研究員
	金子誠二	東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科	主任研究員
	下島優香子	東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科	主任研究員
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科	主任
	三山九美	財団法人日本冷凍食品検査協会	東京事業所
	吉田朋高	財団法人食品分析開発センター	SUNATEC

研究要旨

脳脊髄膜炎・流死産・敗血症等を引き起こす人獣共通感染症、リステリア症の原因菌である *Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は土壌、河川水や家畜及び鳥類を含む野生動物の腸管内など自然界に広く分布している。人への感染経路は主に本菌による汚染食品の摂取と、母体からの垂直感染及び産道感染である。本菌は食塩耐性、低温増殖能などの高度な環境抵抗性を持つため、食品やその原料への一次汚染や食品製造工程での二次汚染、保存過程での増殖の抑制は容易ではない。欧米では数年毎に非加熱喫食食品（いわゆる ready-to-eat 食品）を原因とするリステリア症の集団事例が報告されている。わが国でも年間約 80 例の散発例がみられるが、集団事例はこれまでのところ 1 例のみが確認されているにとどまっている。しかしながら、過去に実施された国内流通食品の調査では、欧米と同等の検出率が報告されており、多くの食品を輸入しているわが国において、食品媒介リステリア症の集団感染が起こりうる状況にあると思われる。一方、輸入検疫時の微生物試験において、その試験法の科学的合理性が諸外国との間で問題になることがあり、当該試験法を国際的な試験法と同等のものにすることが急務である。現在、国内では本菌の乳・乳製品からの検査法として、1993 年の乳等省令で定められた方法が行われているが、この検査法が準拠している IDF 法（IDF143A）は近年既に ISO 法に移行しており、わが国でも早急に本菌の標準的試験法を検討・改訂する必要がある。昨年度の本研究では、現在国際的に用いられているリステリア試験法を比較検討し、国内での標準的試験法を定めるにあたって必要となる事項を検討した。その結果、リステリアの標準試験法として ISO 法を採用し、数箇所の変更・検討事項について国内での改良点の妥当性を複数の研究機関で検討していくこととし、本菌の分離培養及び純培養に用いる寒天平板の種類や培養温度、確認試験の代替