

して記載する必要がある。

22. 新規の抗原型毒素が出現した場合、プライマーについては、新しい配列のものを順次加えていく必要がある。
23. ボツリヌス菌は毒素とともに「感染症法」で二種病原体等に指定されているため、許可された取扱施設以外では、試験により菌が分離された場合は、3日以内に滅菌廃棄する必要がある旨を記載する必要がある。
24. 食品を対象とした試験において菌が分離された時、型別判定ができるようにA、B、C、D、E、F、G型の抗血清について、作業部会で供給体制を整備している。
25. 本ボツリヌス毒素遺伝子確認試験法をステージ1として提案する。
26. PCRの内部コントロールについては、ステージ2で検討する。

“その他、事務連絡等”

27. リステリア試験法は、共同実験を実施しない事となったので、最終案を作業部会で作成する。
28. 衛生指標菌試験法は、ISO法をそのまま導入するため、作業部会で進めているISO法の和訳を、次回以降の検討委員会で試験法案として確認する。
29. 次回検討委員会は1月26日を予定。

以上

## 食品からの微生物標準試験法検討委員会第 31 回議事録概要(2011.1.26)

1. 委員長および行政より挨拶。
2. 配布資料と第 30 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 30 回議事録概要案の確認を行い、5 箇所が訂正された。

### “リステリア試験法について”

3. 仲真委員から、「ISO11290-2: *Listeria monocytogenes* の検出パート 2 : 定量法」和訳の配布資料について、説明があった。
4. この試験法は当初は PALCAM 平板培地を用いる方法であったが、改訂版で ALOA 平板培地に変更になった。
5. ALOA 平板培地は鑑別能力が高いため、*L. monocytogenes* の定量がより正確となった。
6. 提案した試験法では、ISO11290-2 に忠実な和訳の後に、作業部会で検討した代替培地の結果など追加・変更点を付け加えている。
7. ISO には著作権があるため、和訳による試験法の公開方法は今後の検討次第であるが、それまでは紙ベースの報告書にとどめ、web への公開は行わない。
8. 次回の検討委員会で、リステリア定性試験法と定量試験法の確定をおこなう。
9. ISO11290-2 を和訳した JIS が存在するので、本委員会で新たに提案する試験法の取扱い等については、行政側と相談する。
10. 和訳の統一の必要と思われる用語リストが示された。

### “衛生指標菌試験法について”

11. 田中委員から、「ISO21528-1: 腸内細菌科の検出及び計数のための一般試験法」和訳の配布資料について、説明があった。
12. 次回、検討委員会で ISO 21528-1 の和訳の最終確定をおこなう。
13. ISO 和訳にあたり用語を統一する必要があると作業部会で指摘されたため、用語集案を作成し、次回の検討委員会に提案する。

### “バリデーションについて”

14. 松岡委員から、「ISO 16140」和訳の配布資料について説明があった。
15. 作業部会において対訳で問題になった箇所については、検討委員会で今後検討する。

### “黄色ブドウ球菌試験法の検体処理検討に関する共同実験について”

16. 五十君委員から、黄色ブドウ球菌試験法を現在の国内の食品規格基準に適用する場合に必要なと思われる検体処理について検討した結果について、配布資料を用いて説明があった。
17. 3カ所の共同実験により主に計数法と選択培地に関する検討が行われた。
18. 加熱食肉製品(ハム)において、卵黄加マンニット食塩培地と比較して Baird-Parker

培地で接種菌の回収率が高い結果が得られた。

19. 規格基準に適する集落計数法、および使用する培地等については、更なる追加データを加え、検討委員会に報告する。

“その他、事務連絡等”

20. 衛生指標菌試験法とリステリア試験法については、残りの和訳が出来次第 ISO 原文と共に事前に委員に送付する予定で、次回検討委員会で検討する。
21. 衛生指標菌試験法は、試験法として ISO 法をそのまま導入するため、作業部会で進めている ISO 法の和訳を検討委員会で確認し、試験法とする。
22. 次回検討委員会は 2 月 22 日 (火) を予定。

以上

平成 22 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」

|       |  |   |
|-------|--|---|
| 研究分担者 | 浅尾 努<br>高橋元秀   | 財団法人 日本食品分析センター<br>国立感染症研究所   |
| 研究協力者 | 小崎俊司<br>幸田知子<br>河合高生<br>見理 剛<br>吉田信一郎<br>木村由紀子<br>山口聡子 | 大阪府立大学<br>大阪府立大学<br>大阪府立公衆衛生研究所<br>国立感染症研究所<br>日本食品分析センター<br>日本食品分析センター<br>日本食品分析センター |

研究要旨

食品からボツリヌス菌を分離同定する場合には、最終的にはマウスを使用する動物実験に頼らざるを得ないのが世界的な状況である。食品の増菌培養液中のボツリヌス毒素の存在を PCR 法により推定する方法では、擬陰性の危険は避けられない。本研究では、分離平板培地上に形成された大量の集落からボツリヌス菌を検索する方法としての PCR 法の有用性を確認した。食品からの微生物標準試験法検討委員会へ提案した試験法は、少数（10 個）のボツリヌス菌芽胞でも確実に検出できることがわかった。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は有用であった。また、ボツリヌス毒素を同定するために必要な診断用型血清を標準化し、各地方衛生研究所に配布するとともに、食品等の検査機関にも交付する方法を検討した。

A. 研究目的

食品などからボツリヌス菌を検出する方法として、検体を増菌培養し、培養液中に産生された毒素をマウス法に

より検出することが基本となっている。マウス法を実施する場合は、動物愛護の観点からも、使用するマウスの数を可能な限り少なくする努力が必要である。しかし、菌分離の際には分離平板

上に形成された大量の集落の毒素産生性をスクリーニングしなければならない場合が多い。

本研究では、卵黄加 GAM 寒天培地培地に発育した集落の中から、マウス法の代替法として PCR 法により毒素産生菌をスクリーニングする方法を確立することを目的とした。

## B. 研究方法

食品の増菌培養により、培養液中から毒素を検出した検体からボツリヌス菌を分離する場合に、マウス法の代替法として使用可能と思われる PCR 法の有用性を検討した (図 1)。10 個のボツリヌス菌芽胞をブドウ糖・可溶性デンプン加クックドミート培地に接種し、30°C で 7 日間培養後に卵黄加 GAM 培地に画線培養した。発生した集落を直接 PCR 法に供する方法①と、TPYG 培地で 30°C で 2 日間培養後に PCR 法に供する方法②を検討した。

以下に本研究で使用した菌株、培地類、試薬、器具機材などを記載した。

### 1. 使用菌株

Renkon 株、Osaka99 株、Okra 株、Osaka06 株、Langeland 株、Honey-2 株、Biwako 株、Tenno-2 株、Mustard 株、CB-19 株、003-9 株、1873、OFD05 株を使用した。

### 2. 使用培地

#### 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 で 15 分間滅菌後直ちに流水中で急冷した。

#### 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  |

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した。

#### 3) 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した。

|            |          |
|------------|----------|
| 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した。121°C で 15 分間滅菌後直ちに流水中で急冷した。

#### 4) 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で15分間滅菌後直ちに流水中で急冷した。

#### 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 7.0±0.1に調整

121°Cで15分間滅菌後直ちに流水中で急冷した。

#### 6) 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ずつ分注して固めた。III群菌の分離には0.1%のシステイン-塩酸塩を加えた後、pHを元の培地のpHに調整した。

#### 3. 芽胞液の作製

##### 3-1 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。

##### 3-2 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
  - 7) 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。
4. 菌株の毒素産生試験
- 1) 作製したボツリヌス菌芽胞液を 10/g の濃度に滅菌蒸留水に懸濁した。
  - 2) 芽胞懸濁液 1 ml を、ブドウ糖・可溶性澱粉加クックドミート培地 (10 ml) に泡を立てないように注意しながら試験管の底部にピペットで接種した。
  - 3) I 群菌は 80°C で 10 分間、II 群菌 60°C で 10 分間加熱後に流水中で急冷した。
  - 4) 30°C で 7 日間嫌気ジャーを用いて培養した。
  - 5) 増菌培養液を緩やかに攪拌後、3,000 回転、4°C で 20 分間遠心して上清を採取した。上清をろ過滅菌し、その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した。
  - 5) II 群菌の試料液に 1/10 容のトリプシン溶液を加え、37°C で 30 分間反応させる (毒素の活性化)。
  - 6) マウス腹腔内注射による毒素の同定と型別
5. 菌の分離培養
- 1) 増菌培養液を卵黄加 GAM 培地に画

- 線培養して、嫌気ジャー内で 30°C、2 日間培養した
- 2) 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°C で 4 日間培養し、上述の方法に従い毒素を同定した。

## 6. PCR 法

### 1) 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 ×TAE buffer, pH 8.3 (2 M Tris-acetate/50 mM EDTA)
- ・ PCR 用キット (TaKaRa Ex Taq)

### 2) 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

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 (図 2)

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):

GTTGGTGAAGTAGATAGATTAAA

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。

3) テンプレート DNA の作製と PCR 反応条件

[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 日間培養した。
- ・ 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 分間遠心した。
- ・ 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 に懸濁した。
- ・ 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 とした。

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、以下同様の操作をした。

[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 |

[PCR反応条件]

初期変性 95°C、5 min



95°C、30秒

53°C (C、D型)あるいは57°C (A、  
B、E、F型)、30秒

72°C、1 min 30サイクル

72°C、10 min

10°Cに冷却

[判定]

- ・PCRサンプルの5 $\mu$ lを2%アガロースゲル (1x TAE buffer) で電気泳動した。
- ・エチジウムブロマイドなどのDNA染色剤で染色した。
- ・バンドを UV トランスイルミネーターにて観察した。

食品中のボツリヌス菌試験法は、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。毒素の検出・同定試験には、マウスを用いた中和試験法により毒素型が決定される。この際に診断用毒素型血清 (型特異血清) が必要であるが、過去に千葉県血清研究所で販売されていた診断用抗毒素血清は、2003年の廃所にもない入手困難であった。その後、感染研では食中毒患者等の実験室診断に必要なA、B、EおよびF型毒素に対しては、単味の各ウマ免疫血清を国内標準品に対して標準化した。しかし、C及びD型診断用血清は作製されていないために、今回免疫用の抗原調整をおこないヤギに頻回接種後、得られた血清を国際標準品に対して標準化する。

### C. 研究結果

I群A型菌、B型菌、F型菌およびII群E型菌、B型菌の芽胞液 (10個) をブドウ糖・可溶性澱粉加クックドミート培地に接種し、図1に示したボツリヌス菌試験法の手順に従って菌の分離を試みた。いずれの菌株も分離培地である卵黄加GAM寒天培地上に集落を形成した。集落から直接作製したテンプレートDNAを用いたPCR法により、それぞれの型に特異的な毒素遺伝子をアガロース電気泳動により確認できた (表)。TPGY培地培養液から作製したテンプレートDNAでも同様の結果が得られた。PCR産物のアガロース電気泳動の代表的な写真を図3に示した。

0.1%のシステイン-塩酸塩を加卵黄加GAM寒天培地上で形成されたIII群C型菌、D型菌およびモザイク毒素 (C/D毒素、D/C毒素) 産生菌集落から直接作製したテンプレートDNAを用いたPCR法により、それぞれの型に特異的な毒素遺伝子をアガロース電気泳動により確認できた (図4)。C型菌はレーン1と3に、D型菌レーン2と4にそれぞれバンドが見られた。モザイク毒素産生菌であるC/D型菌はレーン1と4に、D/C型菌はレーン2と3にそれぞれバンドが見られた。

CおよびD型診断用血清の作製は、2匹のヤギを基礎免疫として沈降トキソイドを4日間隔で3回、液状トキソ

イドを1週間間隔で5回、さらに各毒素を2週間隔で8回接種した。高度免疫後に採血して、各型約1,000 mlの抗血清を得た。経時的に採血した血清中の抗体価(ELISA)は順調に上昇した(図5)。標準抗毒素血清に対する相対値として中和抗体価を調べたところ、C型抗血清 1,800 IU/ml、D型抗血清 4,000 IU/mlであった。

#### D. 考察

ボツリヌス菌の同定は、マウス法を用いた毒素検出法によるのが世界標準となっている。毒素そのものの代わりに毒素遺伝子を検出するPCR法も考えられるが、これを培養の第一段階であるクックドミート培地に適用するのはリスクが高すぎると思われる。その理由として、PCR反応を妨害する食品マトリックスのために、本来陽性となるべき検体が擬陰性と判定される可能性が挙げられる。したがって、この段階でもっとも確実な毒素確認法はマウス法であり、PCR法はあくまでもスクリーニング法として利用されるべきものと考えられる。クックドミート培地の培養液のPCR反応が陰性でも、ボツリヌス菌陰性と判定するには最終的にはマウス法による毒素の検出を実施しなければならない。

ボツリヌス食中毒の診断では、毒素の検出は比較的容易であるが、菌分離は極めて困難であるか、失敗に終わる

例が多いようである。実際、過去の食中毒事例で、患者便からボツリヌス菌を分離した際に、200個以上の集落の毒素産生性を調べなければならないことを経験した。ボツリヌス菌試験法で、PCR法による毒素遺伝子検出法が非常に有効なのは、菌分離の際に多数の集落をスクリーニングする必要がある場合である。分離平板上に独立したボツリヌス菌様集落がない場合には、集落から直接テンプレートDNAを作製することは困難である。この場合にはTPYG培地で培養後にPCR法を実施することも可能である。

ボツリヌス菌試験法のプロトコールにしたがって実施した芽胞添加試験では、少量の芽胞(10個)があれば分離平板上に確実に集落が形成されることが明らかになった。この結果は、I群菌芽胞は80℃で10分間の加熱に、II群菌は60℃で10分間の加熱処理によっても菌数は減少しないという平成21年度の成績を裏付けたものでもある。

家畜・家禽のボツリヌス症の原因となる主たるボツリヌス菌はIII群に属するC型およびD型菌が産生する毒素により発生する。これらの菌群が産生する毒素には、型特異的な毒素とモザイク毒素の存在が知られている。モザイク毒素は毒素遺伝子N末端側から2/3の軽鎖(L)・重鎖N末端(H<sub>N</sub>)領域と、C末端側から1/3の重鎖C末端(H<sub>C</sub>)領域が異なる型の毒素で構成されてい

る。D/C モザイク毒素は L・H<sub>N</sub> 領域が D 型、H<sub>C</sub> 領域が C 型と類似した構造を有し、C/D モザイク毒素とは逆の構造を示す (図 3)。これらのモザイク毒素は、C 型と D 型それぞれの単独の抗毒素血清では完全には中和できないので、中和反応による正確な毒素の型別は困難である。

本試験法に採用した 4 組のプライマーの組み合わせによる PCR 法は、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を鑑別するのに大変有用であった。

C および D 型診断用血清の作製にあつては、1 回目の力価試験は終了したが、国内 3 研究所による共同試験に必要な国際標準品は、英国 NIBSC からの発送が遅れたため、年度内の結果解析が予定されている。作製した血清は 3 研究所により各型について 3 回の中和試験が計画されており、すべての成績を統計学的解析により国際標準品に対する相対価を与える。ボツリヌス毒素は 7 型に分類され、残りの G 型血清についても今年度調製中である。従つて、A~G 型すべての診断用血清が整うことになるが、行政検査 (患者の診断等) 以外に用いる検査センターへの分与については国立衛研では業務上困難なため、感染研からの交付を検討している。

#### E. 結論

本研究で提案したボツリヌス菌試験法は、ボツリヌス菌の発育を阻害する

共雑菌や食品成分がなければ、食品中の少量のボツリヌス菌でも確実に検出できることがわかった。現時点では、毒素検出のためのマウス法を PCR 法などの遺伝学的手法に完全には置き換えることは困難であるとした。しかし、PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法は、分離平板上に発育した多数の集落の中からボツリヌス菌を推定する場合には、マウスを節約できることなどの理由から有効であると結論した。

ボツリヌス毒素 A~G 型の 7 種類を同定する診断用ボツリヌス抗毒素血清が整った。食品のボツリヌス菌検査を実施する各地方衛生研究所 ボツリヌスレファレンスセンターには 5 月中に分与を予定している。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 浅尾 努 (2011) 食品による微生物危害の発生と安全確保のための検査、食品と開発、46: 37-39.
2. 浅尾 努 (2011) 食品微生物検査 - 衛生指標菌- クリーンテクノロジー - 日本工業出版 印刷中

表 ボツリヌス菌検出法におけるPCR法の有益生

| 菌株名       | 群  | 毒素型 | PCR用テンプレートDNA |            |
|-----------|----|-----|---------------|------------|
|           |    |     | GAM培地上の集落     | TPYG培地の培養液 |
| Renkon    | I  | A   | +             | +          |
| Osaka99   | I  | A   | +             | +          |
| Okra      | I  | B   | +             | +          |
| Osaka06   | I  | B   | +             | +          |
| Langeland | I  | F   | +             | +          |
| Honey-2   | I  | F   | +             | +          |
| Biwako    | II | E   | +             | +          |
| Tenno-2   | II | E   | +             | +          |
| Mustard   | II | B   | +             | +          |

I 群菌は80°C、II 群菌は60°Cで10分間加熱

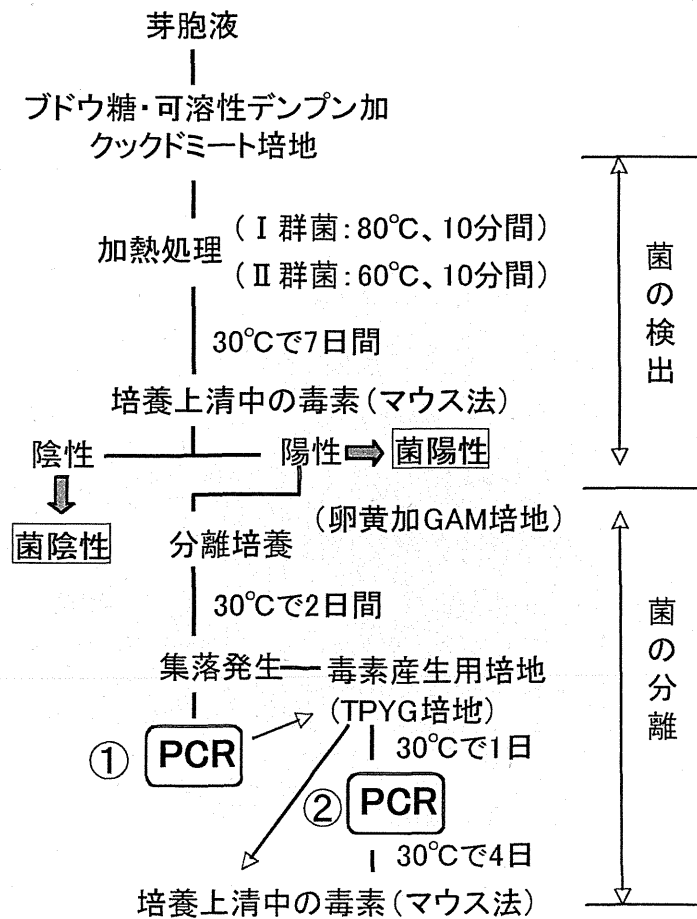


図1 ボツリヌス菌試験法におけるPCRの使用方法

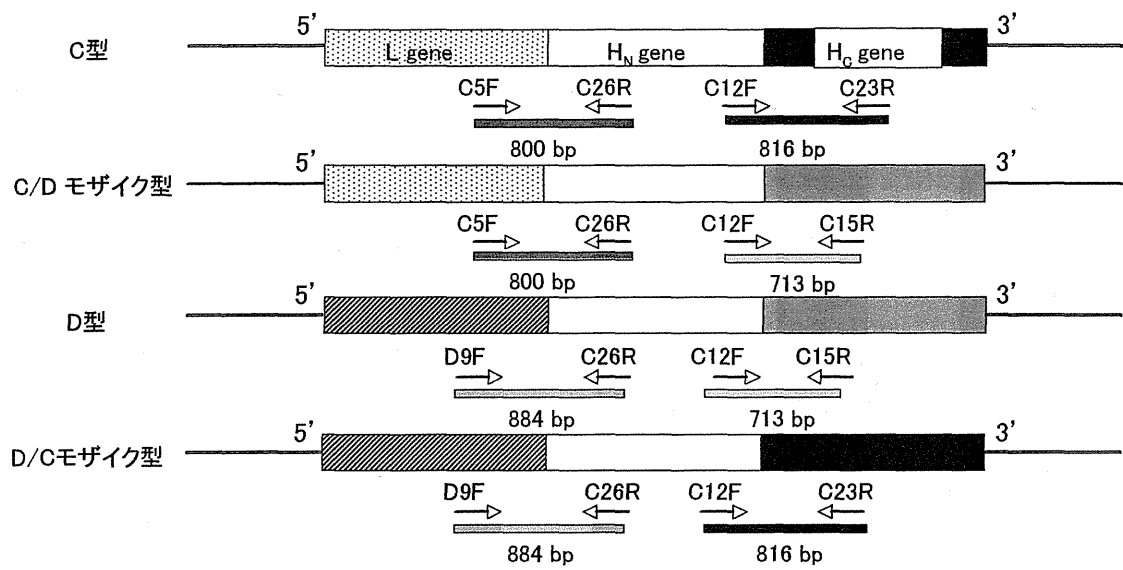


図2 C型菌、D型菌およびモザイク毒素遺伝子上のプライマーの位置

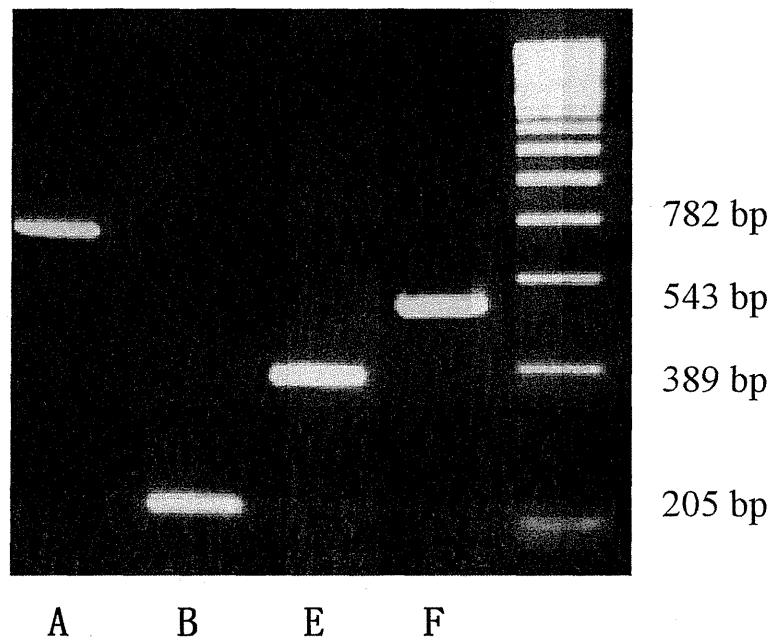


図3 PCR法によるA型、B型、E型、F型ボツリヌス菌の鑑別



菌株 CB-19 (C型), 003-9 (C/D型),  
1873 (D型), OFD05 (D/C型)

Lane 1; C5F and C26R, lane 2; D9F and C26R, lane 3; C12F and C23R, lane 4; C12F and D15R, lane M; 100 bp DNA ladder

図4 PCR法によるC型、D型ボツリヌス菌の鑑別

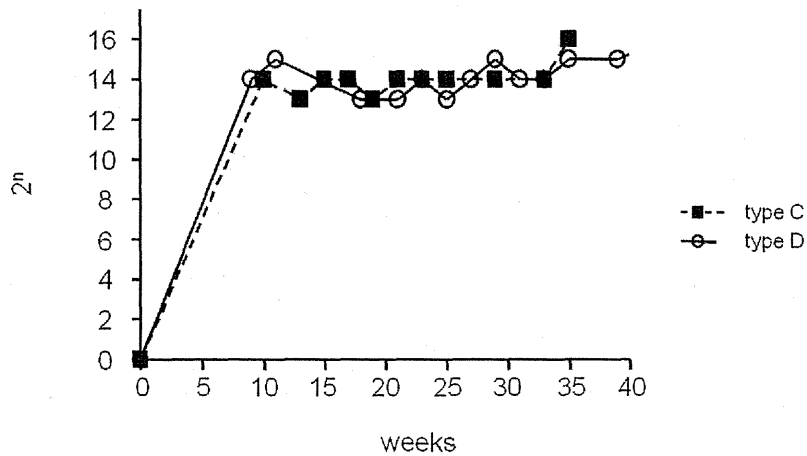


図5. ボツリヌスC型およびD型トキソイド・毒素免疫ヤギの抗体価推移(ELISA価)

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    |
|       | 江渕寿美  | 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    |
|       | 門田修子  | 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部       |       |

研究要旨

*L. monocytogenes* 汚染食品の摂取によって感染するリステリア症は、高齢者や糖尿病患者などの免疫弱者及び乳幼児に髄膜炎や敗血症、妊産婦に流死産を引き起こし、発症時の致命率は20～30%に上る重篤な疾患である。本菌は動物の腸管内や河川水など自然界に広く分布しており、食肉、魚介類やそれらの加工品、乳製品、野菜類など様々な食品から分離されている。リステリア症の原因食品としてはナチュラルチーズや食肉製品、サラダなどのいわゆる ready-to-eat 食品が多くみられるが、生ハムなどの非加熱食肉製品やナチュラルチーズの多くは海外からの輸入食品である。しかしながら、現行の国内における乳及び乳製品からの本菌の試験法（通知法）が準拠している国際酪農連盟（IDF）の試験方法が、近年 International Standard Organization (ISO) の試験法に合流したこと、さまざまな食品汚染細菌の規格基準及び試験法に関して、その国際的整合性が輸入時のトラブルとなっている例も見られていることから、国際的に整合性のある本菌の標準試験法を新しく定めることが急務となっている。過去2年間において本研究では、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、国内の新規リステリア標準試験法として ISO 法を採用することとした。その上で数箇所の変更・検討事項について妥当性確認を行って作業部会案を作成し、その方法に従って2種類の食品に人工的に添加した本菌の回収を行い、国際的に知られているハイリスク食品であるナチュラルチーズと同様に、わが国特有の食品であるマグロすきみからの回収が可能であることを検証した。本年度は、ISO 法におけるリステリア試験法及びその修正法の完全逐語訳を作成した上で、妥当性を確認した事項について変更・修正を加え、最終的な標準試験法を作成した。

## A. 研究目的

*Listeria monocytogenes* (以下リステリア) は脳脊髄膜炎・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り、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り、糖尿病などの基礎疾患を持つ人、妊産婦、高齢者等がハイリスク群とされている。本菌は、食肉や魚介類及びその加工品、乳製品、サラダなど惣菜類等様々な食品から分離されている。また、本菌は食塩耐性、低温増殖性等の環境抵抗性を有し、食品製造工程での二次汚染、冷蔵、食塩添加等の保存方法による増殖の制御は困難である。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おり、その原因食品もナチュラルチーズ、ホットドッグ、サラダ、ローストビーフ等多岐に亘る。わが国は、過去に確認された集団事例は1例のみであるが、年間約80例の散发例があると推定される。その原因食品はほとんど同定されていないが、輸入食品を含む様々な国内流通食品から本菌が分離されており、今後社会の高齢化に伴い、患者数の増加が懸念されるため、輸入検疫の強化や製造工程における高度衛生管理の普及、消費者への啓蒙を含めたリステリア症発生防止策が重要となる。しかしながら、現在国内で用いられている食品からのリステリア試験法は、1993年に定められた乳・乳製品の検査法であり、その試験法が準拠していた国際酪農連盟 (IDF) の試験法 (IDF143A) は、数年前に International Standard Organization (ISO) の定める試験法に合流している。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、わが国でも当該試験法を国際的な試験法と同等のものにするべく、早急に標準的試験法を検討・改訂する必要がある。一昨年度の本研究では、国際的に通用しうる食品からのリステリア検出のための標準的試験法を作成するにあたり、国際的に用いられている ISO の試験方法を基礎としていくことを決定し、いくつかの変更点について純培養菌を用いた検討を行った。昨年度は、国内の標準法作出時に変更・検討が必要な箇所について ISO 法原法との同等性の検証を、2種類の食品への添加・回収試験により行い、その妥当性を確認した。最終年度の今年度は、ISO11290-1:1996 (定性法)、ISO11290-2:1998 (定量法) 及びそれらの修正法 (2004) の完全逐語訳を作成した上で、妥当性を確認した事項について変更・修正を加え、国際的に用いられているリステリア試験法と互換性のある、最終的な標準試験法を作成した。

## B. 研究方法

ISO11290-1:1996 (定性法)、ISO11290-2:1998 (定量法) 及びそれらの修正法 (2004) について、本文及び annexA から D を含む全文を逐語訳した。また、過去2年間の作業部会による検討箇所について、その妥当性が確認され、変更が可能であるとされた箇所について記載した。

## C. 研究結果

2004年に発表された修正法を含む定性法及び定量法の全訳を添付1及び2に示す。ISO原文では、2004年に公表された修正は主に酵素基質培地である Agar *Listeria* according to



Ottaviani and Agosti (ALOA 培地)の使用に関連した部分であるため本文の大幅な書き換えは行っておらず、部分的に変更点を挿入、置換している。そのため、原文には誤解や混乱を生じかねない箇所が随所に見られた。今回は、酵素基質培地の使用により明らかに記述を変えるべきであると思われる箇所については、本文下に[作業部会 注]として記述変更の提案を記載した。記載箇所は、ISO11290-2の訳である定量的試験法本文の4箇所である。また、(1)わが国でこれまで使用されており、過去2年間の本研究においてISO法で使用されているALOA培地との同等性が確認されたCHROMagarListeriaの使用、(2)一昨年の本研究で、ISO法で規定されているトリプトン・ソーヤ・イーストエクストラクト寒天(TSYEA)との同等性を確認したトリプトケースソイ寒天の使用、及び(3)一昨年の本研究で、*L. monocytogenes*の鑑別試験であるCAMP試験との同等性を確認したβリジンディスクの使用について、文末に「リステリア標準試験法での追加、変更点」として記載した。これらの追加・変更点については作業部会での検討内容を、厚生労働省及び国内の食中毒菌の専門家から構成された「食品からの微生物検査標準法検討委員会」に提出し、そこでの討議、承認を経て決定した。微生物試験に関連した専門用語の翻訳は、本研究班の別の分担研究である「バリデーション作業部会」による用語集に則って行った。

#### D. 考察

3年間の本研究により、わが国における国際的に整合性のある食品からのリステリア試験

法として、ISO法を基礎とした国内標準試験法を作成した。その際に、国内の状況に合わせてISO法に追加、改変すべきであると思われる点がいくつかみられた。特に、ISO法で規定されている酵素基質培地であるALOA培地と、わが国で以前から用いられている酵素基質培地であるCHROMagarListeriaの同等性については、過去2年の本研究において純培養菌を用いた接種試験、作成培地を長時間保管した場合の保存試験、諸外国で知られているハイリスク食品であるナチュラルチーズと、ある程度の汚染率が知られているわが国独自の食品であるマグロすきみへの添加回収試験を通じ、検討を行ってきた。その結果、2種の酵素基質培地からの回収率に大きな差は認められず、また、フランスにおける公的バリデーション機関であるAFNOLでも両培地の同等性評価を実施し、差がないとの結論を出していることから、2種の培地のどちらを用いてもよいとの結論を得た。また、*L. monocytogenes*としての確認試験用の純培養を行う培地についても、国内で一般に市販されているトリプトケースソイ寒天の使用を認めた。*L. monocytogenes*と他のリステリア属菌との鑑別に重要なCAMP試験には、その溶血性の判定に*Staphylococcus aureus*と*Rhodococcus equi*の2菌株が必要であり、試験所によっては菌株の維持が困難であるところもあるため、簡易に溶血性の判定が行えるβリジンディスクの使用についても検討し、溶血性の弱い株についてはCAMP試験、βリジンディスク共に注意が必要であるとの結論が得られた。以上の結果から、わが国における食品からのリステリア標準試験法として、今回提案した方法を採用することに問題はないと思われた。

#### E. 結論

国際的に互換性のある食品からのリステリア試験法として ISO11290-1 及び 2 を基礎とした標準試験法案を作成し、国内の状況にあわせた改変点について検討した。「食品からの微生物検査標準法検討委員会」での討議を経て、最終的な試験法を策定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

M. Ida, Y. Shimojima, S. Kaneko, Y. Higuchi,  
A. Nakama, A. Kai.

Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated from retail beef, pork and poultry in Japan.

17<sup>th</sup> International Symposium on Problems of Listeriosis. ポルト市 2010年5月

Y. OKADA, H. SUZUKI, S. MONDEN, S. IGIMI, N. OKADA.

RpoN, the alternative sigma factor, is associated with the growth phase transition and pathogenesis in *Listeria monocytogenes*.

17<sup>th</sup> International Symposium on Problems of Listeriosis. ポルト市 2010年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 22 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）  
食品における衛生管理手法及びその精度管理に関する研究

分担研究報告書

試験法のメソッドバリデーション

研究代表者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 室長  
分担研究者 松岡 英明 東京農工大学 大学院工学研究院 教授

研究要旨

国際的ハーモナイゼーションを図りつつ、我国における微生物試験標準法の作成が進められている。本研究は、その個々の標準試験法のメソッドバリデーションの実施計画の検証、試験結果の検証、を具体的に行うと共に、そうした検証を機能的に実施するためのシステムを創案することを目的としている。本年度は、適当な標準法を参照法として行う代替法のバリデーションについて規定した ISO16140 に関して、別途、全文和訳が行われることになったので、その監修、指導を行った。また、バリデーションに際して常にボトルネックとなっている微生物汚染食品標準物質に関して、技術的課題を検討し、その結果、セルソーターを利用する生菌標準物質の、その場調製法の可能性を示した。

A. 研究目的

国際的にハーモナイゼーションを図りつつ、我国における微生物試験標準法を作成することは、喫緊の課題である。既に、AOAC、ISO など国際的にバリデーションされた試験法は複数あるので、当初、それらの内容と整合性のある試験法の作成を企図した。ところが、既存のバリデーションされた試験法は、そのプロトコルが全く同じというわけではなく、また、議論の結果、その一部を、いずれの試験法とも異なる新しい内容にした方が良い、と考えられる場合もでてきた。

具体的には、例えば、使用する培地の種類や、培養温度・時間の範囲などに関する項目である。これらの内容をプロトコルに加味すれば、例え、他のほとんどの部分が既存の試験法と共通でも、試験法としては全く新しいもの、と考えなければならぬかも知れない。そう考え

ると、バリデーションも完全な規模と内容で実施しなければならない、という結論になってしまう。

ところで、バリデーションの仕方についても AOAC や ISO では全く同じではない。また、仮に、いずれかのバリデーション方法に従って実施するとしても、考慮しなければならない項目は多く、簡単ではない。例えば、適用する食品マトリックスの種類、試料の個数、試験菌の種類、などである。これらを決定するためには、バリデーション方法の規定内容を十分に理解することが不可欠である。

新規試験法と見なして、それを完全な規模と内容の共同試験でバリデーションをすることは理想的ではあっても、それに要するコストや時間を考えると、必ずしもそれが合理的とは言えない。そこで、国際的なハーモナイゼーションを保ちつ

つ、適切な内容でのバリデーションの具体的方法を提示することが、極めて重要となる。

以上より、本研究は、平成 20 年度より、次のことを目的として実施してきた。すなわち、試験法作成の過程でしばしば問題になった“同じ議論の繰り返し”を防ぐために、プロトコール作成過程で収集された情報、培地や温度の条件を巡って長時間に渡って行われた議論、最終判断に至った経緯、などを誤解なく伝えるための文書化の方法を検討した。その結果、WEB 閲覧型が適当であろうとの結論に達し、サルモネラ菌試験法を例に、WEB 閲覧型文書のプログラムを開発した。これに、プロトコールだけでなく、コラボスタディによるバリデーション結果も表示できるようにした。WEB 閲覧型式の情報を前にして議論すれば、予備知識の違いによらず、速やかに前提条件を共有することができることが実感された。これによって試験法各論に関する文書化の準備は整った。

平成 21 年度には、各種試験法のバリデーションの基本的考え方を整理することを目的として、標準法、及び迅速法を含む種々の代替法に対するバリデーションのガイドライン原案を作成した。また、バリデーションに際してボトルネックとなっている微生物汚染食品標準物質の技術的課題を検討した。既に、フリーズドライ型の生菌標準物質として、BioBall が開発されているが、開発済の数株以外は難しく、多数の菌種・株に対して適用できる方法が要請されていたからである。しかし、この課題は予備的検討の段階に留まっていた。

以上を受けて、本年度は、微生物標準物質の開発に関する課題に本格的に取り組むこととした。BioBall は保存可能なフリーズドライ型であるが、相当、頑強な菌株でなければ作製ができないと判断された。また、仮に、生菌として得られた

としても、ストレスを受けているか、傷害をもった菌体になっているのではないかと、との懸念もあった。そこで、菌の状態が可能な限り健常な状態で、しかも 1 個のレベルから正確な数の生菌を調製できるシステムの可能性を提示することを目的として実施した。

## B. 研究方法

標準菌株から調製した生菌の蛍光染色と、セルソーターによる単一細胞の分配、それを受ける最適培地、から構成されるシステムの可能性を検討した。

### (イ) 菌株

標準菌株として以下の 5 株を選び、それぞれ、(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部・生物遺伝資源部門(NBRC)、あるいは American Type Culture Collection (ATCC) より入手した。

- ・ *Escherichia coli* NBRC 3301,
- ・ *E. coli* ATCC 8739,
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 12689),
- ・ *Bacillus subtilis* NBRC 3009,
- ・ *Staphylococcus aureus* NBRC 102135)

試験に使用する場合は、凍結保存菌を、一旦、標準寒天培地に播種し、37℃で 18 時間培養して得られたコロニーを、再度、標準寒天培地で同一条件の培養を 2 回繰り返し、最終的に得られたコロニーを PBS に懸濁して終濃度が約  $1 \times 10^8$  cells/ml になるように調整した。

### (ロ) 生菌識別用蛍光色素

生菌を死菌と区別して染色する蛍光色素には、その原理の違いによって数種類あるが、色素の安定性や蛍光強度の観点から最適なものとして、カルボキシフルオレッセインジアセテート (CFDA) を第一に選定した。生細胞のみが細胞内エステラーゼ活性を保持している、という性質に基づいている。第二の色素として、蛍光グルコース (2NBDG) を選定した。