

“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

食品からの微生物標準試験法検討委員会第25回議事録概要

1. 委員長、副委員長、行政より、簡単な挨拶があった。
2. 4組の配布資料の確認、読み上げによる第24回議事録概要案の確認を行い、指摘された3箇所を訂正し議事録概要とした。

“ボツリヌス試験法案（ステージ1）について”

3. 作業部会から提出された原案につき、浅尾委員から説明があった。（以下4～11は説明の内容）
4. 原案は、15箇所のボツリヌスのレファレンスセンターと調整し、菌の増殖手法とPCR手法の2つの資料を作成した。
5. ボツリヌスは、性質の異なる菌の集合体であり、培養条件も群によって大きく異なり試験法は単純ではない。
6. 食品検体を何g使用する必要があるかについては、まだ判断できない。
7. ボツリヌス試験法ではまず毒素の有無を見てから菌の分離を試みる。
8. 芽胞を形成するので、競合菌を殺す操作として、非加熱、60℃、80℃加熱を設定した。
9. 原案ではボツリヌス毒素の検出に、マウスによるバイオアッセイを行うこととした。
10. 食品検査用の毒素型別血清については、今後供給について考えていかなければならない。
11. PCR法は毒素遺伝子の評価用で、プライマーや増殖条件などを示した。
12. 原案の委員会での議論は、作成方針のステージ1で行うこと、その議論の範囲を確認した。
13. 食品以外を含め、国内外の標準的なボツリヌス試験法がどのような培地や手法をとっているかの比較表を作成する必要性が指摘された。
14. 検体量は25gを単位としてその倍数で考えるか、それが難しければ、10%乳剤等とするなどサンプル量については検討する。
15. 食品検査用の毒素型別血清の供給については、国立衛研、感染研、行政の3者が相談の上今後の方針を検討する。
16. 感染症法の制限の下で、実現可能なバリデーション手法を考える必要がある。
17. 本原案は、1.マウスアッセイ 2.菌分離 3.PCR(代替的)の3つからなるので、それぞれ別の物として議論を進めることは可能。
18. ボツリヌスではリスクマネジメント上何が大切かという基本的なところをまず決めて、その上でどのようなボツリヌス試験をするのか決めた方がよい。
19. マウスアッセイ、菌分離、PCRの流れは、食中毒事例の原因究明と混同してしまい、食品検査のような予防的な衛生検査には向かないのではないかと。
20. この委員会が検討するものは検出法 detection method であり分離法 isolation method ではない。

21. ボツリヌスでは、同定は専門機関にお願いするという枠組みを考えた方が良くも
しれない。
22. マウス試験を入れる場合は、判定基準をわかりやすくする。
23. PCR には、内部標準を入れる必要があるため作業部会で検討する。

“前処理について” について

24. 資料を用いて宮原委員から説明があった。
25. 卵、食肉のサルモネラは、BPW で良好な結果が得られた。
26. 希釈液は、現在3種類あるので、統一できれば利便性が高い。
27. 通知法で規定されていると、変更することは難しいので、検討結果が良ければ使用
可能となるのが望ましい。

“<衛生指標菌試験法について(ステージ2)>”

28. 衛生指標菌・菌群試験法は、ISO 法をそのまま導入する予定であるが、どのような
手続きで確認するかを次回以降議論する。
29. 作成方針では原案→作業部会案→コラボ案→最終試験法と4つのステージを設けて
いるが、ISO 法導入では全てが必要と思われない。
30. コラボをどうするか、日本固有の食品に対する確認をどの程度行うかについて次回
に議論する。

“<その他>”

31. 研究班の構成ですが、宮原先生がご退官されますので、鎌田先生に引き継いでいた
だくこととなります。
32. 宮原委員より挨拶。検討した試験法が早く世に出ることを期待します。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 26 回議事録概要

1. 委員長から、委員の交代について報告があった。
2. 配布資料と第 25 回議事抄録案の確認と、読み上げによる第 25 回議事録概要案の確認を行った。
3. 事務局より、ISO 法を標準試験法とする場合の考え方、サルモネラ通知法、カンピロバクター試験法についての議論を行い、バリデーションに関しては次回にすると討議内容の変更が伝えられた。

“ISO 法を標準試験法とする場合の考え方について”

4. ISO 法の日本語化は、JIS 規格として登録する方法と、JIS としないで単に ISO の和訳とする方法がある。
5. JIS 規格とする場合、主務は経済産業省で JISC の委員会が審議し JIS 化を決定し、国際的にも正式な規格として扱われる。
6. JIS としないで単に ISO の和訳とする場合は、日本規格協会が合意すれば登録できる。
7. JIS 規格とした場合は、閲覧のみは無料、購入しても 2,000 円程度と安価で、コメントを加えることも可能である。
8. ISO の和訳の場合は、英和対訳として購入するので 20,000 円程度と高価で、原文を変更することはできない。
9. ISO 法では国内の固有の食材の検討を行う必要があり、このような食品種は検証データを出す必要がある。
10. ISO を JIS 規格とするには、書類審査だけで行われるが、標準試験法としてはベリフィケーションが必要になる。
11. JIS 規格とする方針で進めたいが、その手続き等に関してはさらに情報収集をする必要がある。
12. ISO 法をそのまま導入する場合、従来の 4 つのステージでの議論を進める必要はない。
13. ステージ 1 で ISO の和訳を JIS 規格とすると提案し、その方向性を確認し、ステージ 3 のコラボ案で検証を行うという案を作業部会で検討する。
14. 内田氏から、ISO リファレンスメソッドの具体的な策定プロセスについて、解説された。
15. 標準試験法を策定する場合のバリデーションについては、ISO 法の例では、それほどハードルは高くない。

“サルモネラ通知法に関して”

16. 本委員会のサルモネラ標準試験法 NIHSJ-1 を公定法とした場合の行政的な問題点について説明が行われた。

17. サルモネラの ISO 法と、標準試験法の同等性を検証し、ISO 法と NIHSJ-1 のどちらでも使えるようにする。
18. これまで検討してきた NIHSJ-1 はバリデートされた標準試験法として残す。
19. サルモネラの ISO 法の和訳を準備できたところで、ステージ 1 として公開することにする。

“カンピロバクター試験法について (ステージ 2)”

20. 作業部会の検討データの説明とコラボ案の提案が行われた。
21. 鶏肉中の拡張型 β ラクタマーゼ産生菌(ESBL)の拡大により、ISO 法では、カンピロバクターの検出が難しい状況なので、コラボ案ではプレストン培地とボルトン培地の両方を提案している。
22. 増菌培地については、コラボの結果を見て最終試験法を判断する。
23. コラボ案の内容の検討は、次回の検討委員会で行う。

“その他”

24. 各作業部会の進行状況を確認した。
25. 次回検討会は 7 月 6 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 27 回議事録概要

1. 委員長および行政より挨拶
2. 配布資料と第 26 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 26 回議事録概要案の確認を行い、4 箇所が訂正された。

試験法のバリデーションについて

3. 田中委員がバリデーション作業部会で検討した内容について資料を用い説明した
4. ISO 法を日本の標準試験法として導入する際に行うべき検証に関するガイドライン案を今年度中に作成する
5. 食品等事業者が実施する自主検査における試験法選定に関するガイドラインを作成する
6. これらのバリデーションに関するガイドラインの作成は、ISO 16140 に準拠して作成する
7. バリデーション及びベリフィケーションに関する情報収集を続ける
8. 作業部会の資料の最後のページは、非公開データを含むため討論後回収した
9. 平成 9 年に内部精度管理に関する指針が厚生労働省から出されているが、見直しが必要と思われる
10. ガイドラインは、食品企業、登録検査機関で利用できるものを作成する
11. ISO 16140 は代替試験法のバリデーション方法を示しており、採用するキットや迅速法の評価に使用できる
12. 行政に関わる検査は、公定法で行う必要がある
13. 提案された方針が了承され、作業部会は作業を進めることとした

カンピロバクター試験法について (ステージ 2)

14. カンピロバクター検討班から、現在の ISO 法に関する問題点が示された
15. ボルトン培地で増菌し、分離培地 mCCDA を用いると ESBL の影響で分離が困難であったが、バツラー培地では分離できた
16. プレストン培地で増菌を行えば、いずれの分離培地でも良好であった
17. ボルトン培地とプレストン培地を比較するプロトコルをコラボ案として提案した
18. 微好気条件の設定のうち、特殊素材の袋を用いた方法は主に検体の増菌時に用いる
19. ISO 法の表はそのまま使うことはできないので、文章で表現する
20. 提案された方法を、コラボ案として公開し、コラボの参加を募集することにした (ステージ 3 へ)

リステリア試験法について (ステージ 2)

21. JIS に ISO の和訳に相当する試験法があるので資料として示し、説明した
22. 我国では他の酵素基質培地が一般的に使用されているので、JIS 法にこの培地が追

記できるか検討し、結果が良ければ追記する

23. 我国特有の食品であるマグロのすき身を用いた定量試験をプレラボとして検討した
24. 検討した選択培地を JIS 法に加え、ステージ 3 のコラボ案として提案したい
25. リステリア試験法は、ISO 法をそのまま和訳したものが JIS 法であり、このまま使用するならばコラボは必要ない
26. 培地を追加するならば、バリデーションは必要となる
27. β -リジンディスクの評価時に見られた特殊な株の出現頻度については調査する
28. コラボ案（ステージ 3）とするが ISO には版權があり、Web 上への公開はできない
29. JIS 版のリステリア試験法の資料は、検討後回収した

その他、事務連絡等

30. ISO を JIS 化する場合の手順について行政から調査報告があった
31. JIS 化には二つの方法があり、主務大臣が制定する場合と、民間団体からの申し出によって規定する場合がある
32. 民間団体が原案作成委員会を作り、本検討委員会委員が、関わることは可能である
33. JIS には食品の試験法に関する項目がなく、現在 JIS となっている試験法は培地の工業規格として示されている
34. JIS は食品を対象としておらず、食品規格は JAS で扱う
35. JAS 法は除き、ISO22000 に工業化されるものは記載されており、この項目にないと JIS 化できない
36. JIS 化すれば試験法の購入コストは低いですが、ISO の和訳となると購入コストは高い
37. JIS 化するなら追記することが可能であるが、ISO の和訳となると追記はできない
38. 当面は情報収集して方針を検討する
39. 各作業部会の進行状況を確認した。
40. 次回検討委員会は 9 月を予定。

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 28 回議事録概要

1. 委員長から挨拶
2. 配布資料と第 27 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 27 回議事録概要案の確認を行い、6 箇所が訂正された。

サルモネラ JIS 法の扱い方及び NIHSJ 法のコラボスタディについて

3. コラボスタディでは NIHSJ-01 と ISO6579 (JIS K3705)が試験法として同等とみなせるか確認することを目的とする
4. 両方法ともに既にバリデートされている試験法であるため、検討は最小限で行う
5. JIS K3705 をステージ 3 として扱い、複数の試験所の参加によるコラボスタディを行う予定
6. シングルラボバリデーションにより、ある程度検討を行い、コラボスタディにより最終評価を行う
7. コラボスタディでは、シングルラボバリデーションの結果を受けて接種菌数等を設定し、H₂S 産生菌 1 株を用いて試験を実施する予定であることが提案された
8. 今回は、ステージ 3 でシングルラボ及びコラボスタディのデータを評価する
9. コラボスタディの内容については、次回以降再度確認する

その他、事務連絡等

10. ボツリヌス作業部会では、PCR 法のプロトコール作成中で、中和試験用の抗血清 C 型、D 型を準備している
11. リステリア作業部会は、次回、酵素基質培地の追加時のバリデーション方法とコラボ試験についての提案をする予定
12. 衛生指標菌作業部会では、ISO 法の和訳を行っている最中で、今後その扱いを考える
13. 次回の検討委員会は 10 月 5 日 (火)を予定

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 29 回議事録概要

1. 委員長から挨拶
2. 配布資料と第 28 回議事抄録案の確認、読み上げによる第 28 回議事録概要案の確認と修正を行った。
3. 本検討委員会は、微生物の標準試験法を作成することを目的としているため、第 28 回議事録概要から「試験法のバリデーションガイドラインについて」の 7 項目は省くこととした。

リステリアの試験法について (ステージ 3)

4. 岡田委員が、配布試料を用いて酵素基質培地などを用いた代替法に関する作業部会の検討結果を説明した。
5. 弱い溶血性を示す株は、酵素基質培地においても典型的なコロニーを形成しにくく、また、寒天平板ではなくパウダーの状態での保存した培地程ハローが出にくくなる点が指摘された。
6. 弱い溶血性を示す株については、鶏肉からの検出頻度が高い旨を付記することとした。
7. リステリアの標準試験法は、ISO 11290 に準拠、もしくはその和訳である JIS 法に準拠した試験法でありコラボスタディは実施しない。

サルモネラ試験法の ISO 法との同等性について

8. 五十君委員が、配布試料を用いて NIHSJ-01 と ISO 6579 が試験法として同等の扱いをするには、どのように評価したらよいか、今後の検討課題について説明した。
9. ISO 16140 の代替法のバリデーションの考え方を採用するが、それぞれの試験法が既に妥当性確認の終わっている試験法であることを考慮し評価する。
10. NIHSJ-01 が基とした AOAC 法と ISO 6579 のバリデーションは既に終了しており、同等性が確認されている。
11. JIS K3705(=ISO 6579)をステージ 3 として扱い、複数の試験所の参加によるコラボスタディを行うこととする。
12. コラボスタディに先立ち、シングルラボバリデーションにて、検討する。
13. コラボスタディでは、ISO 法の 2 つめの選択分離培地として酵素基質培地を選択し、H₂S 非産生株を用いて行う。

その他、事務連絡等

14. ボツリヌス作業部会では、型別血清の供給の仕方を検討している。
15. ボツリヌス毒素試験法については次回以降提案の予定。
16. ボツリヌス菌は、菌の分離が難しいので、他の食中毒菌の試験法と同列の試験法提案は難しく、注射付きの食中毒検査指針レベルのものを提供したい。
17. 衛生指標菌作業部会では、ISO 法の和訳を行っている最中で、ISO 法と日本の衛生指標菌試験法とを比較検討する。

18. 衛生指標菌作業部会では、食品由来の675株を同定し、データベース化を進めている。
19. 次回の検討委員会は11月30日(火)を予定

以上

食品からの微生物標準試験法検討委員会第 30 回議事録概要

1. 委員長および行政より挨拶。
2. 配布資料と第 29 回議事抄録案を確認、読み上げによる第 29 回議事録概要案の確認を行い、2 箇所が訂正された。

サルモネラ試験法の共同実験について

3. 森委員から、“サルモネラ試験法に関する共同実験計画案”について、配布資料を用いて解説があった。
4. 共同実験の目的は、ISO 6579 と NIHSJ-01 の比較とする。
5. 試料の調製について、食品種を豚肉とした場合、脂の少ないロース肉が使いやすいが、新鮮な肉だと時に抗菌作用があるため、あらかじめ添加回収を行う必要がある。
6. 接種菌数については、ピペッティングの再現性から菌液中の菌数を算定する。
7. 共同実験参加数は 13 以上とし、1 試験室あたり、6 検体×3 階級（無接種、低菌数、高菌数）で行う。
8. 共同実験には H₂S 非産生株を用い、使用株の血清型は、泉谷委員と相談し決定する。
9. 共同実験では血清型別は O 抗原の型別を行い、H 抗原については省略する旨を記載する。
10. ISO 6579 で用いる XLD 培地は、市販の ISO 準拠 XLD 生培地を各試験室に供給する。
11. ISO 6579 の第二選択培地としては、クロモアガーサルモネラを指定する。
12. NIHSJ-01 の選択分離培地は、各試験室が使用を希望する培地を選択し配布する。
13. 共同実験結果の解析では、可能であれば 50% LOD を求める。
14. 試験開始日に関しては、検体受領後速やかに開始とする。
15. ステージ 3 として“サルモネラ定性試験法に関する共同実験計画”をインターネット上に公開し、共同実験参加試験室を募る。

ボツリヌス菌試験法について

16. 事務局から、「PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法（案）」について、配布資料を用いて解説があった。
17. 検出法案は、マウス法に代わるものとして培養上清中のボツリヌス毒素遺伝子の「スクリーニング法」として作成したものであり、最終判定はマウス法の結果とする。
18. ボツリヌス中毒が疑われる食品からの菌の分離に有用な試験法で、食品の安全性を担保する目的の他の標準試験法と同列ではない。
19. 標準試験法として独り歩きしないように注意書きを加えておく必要がある。
20. 本試験法は、培養による標準試験法と区別するため NIHSJ の番号の後、末尾に PCR との記載を入れる。
21. PCR で陽性であっても、ボツリヌス菌は条件が整わなければ発育しないため菌の存

在が確認されても、必ずしもその食品が中毒を引き起こすものではない旨を注釈として記載する必要がある。

- 2 2. 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。
- 2 3. 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。
- 2 4. 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。
- 2 5. 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。
- 2 6. 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

- 2 7. 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。
- 2 8. 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。
- 2 9. 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

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

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 高橋元秀	財団法人 日本食品分析センター 国立感染症研究所
研究協力者	小崎俊司 幸田知子 河合高生 見理 剛 吉田信一郎 木村由紀子 山口聡子 岸田一則 石村勝之 小笠原 準 梅田 薫 鈴木荘介 山口 卓 畠山 敬 林 賢一 堀川和美 門間千枝 八柳 潤 石原ともえ 相川勝弘 岡野 洋 須釜久美子 鳥谷竜哉	大阪府立大学 大阪府立大学 大阪府立公衆衛生研究所 国立感染症研究所 日本食品分析センター 日本食品分析センター 日本食品分析センター 千葉県衛生研究所 広島市衛生研究所 大阪市立環境科学研究所 大阪市立環境科学研究所 日本冷凍食品検査協会 日本冷凍食品検査協会 宮城県保健環境センター 滋賀県衛生科学センター 福岡県保健環境研究所 東京都健康安全研究センター 秋田県衛生科学研究所 神奈川県衛生研究所 神奈川県衛生研究所 沖縄県衛生研究所 福島県衛生研究所 愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨

平成 20 年度は、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。通常の商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「食品からの微生物標準試験法検討委員会」へ提出した。平成 21 年度は、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」での議論の結果を踏まえ、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。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。平成 22 年度は、少量の A 型、B 型、E 型、F 型ボツリヌス菌芽胞を増菌培地に接種した結果、原案の試験法の有用性を確認した。C 型、D 型菌およびそれらのモザイク毒素産生菌（C/D 型、D/C 型）については、PCR 法による遺伝子型別が有用であった。ボツリヌス毒素は A～G 型の 7 種類が確認されており、各型毒素を同定する診断用ボツリヌス抗毒素血清のうち、C 及び D 型血清を標準化した。食品中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 月中に配布を予定している。

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。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。

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」に提出することとした。この素案に対する委員会の意見に基づき追加修正した試験法を試験法決定のシステムに従って検討し、最終的な試験法を策定することを目的とした。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作製・標準化し、各地方衛生研究所および食品等の検査機関の試験法の充実・確立を目指す。

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。最終的には、少量のA型、B型、C型、D型、E型、F型ボツリヌス菌芽胞を増菌培地に接種し、試験法の有用性を検討した。

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
-------------	-------