

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 添加して高压滅菌し、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) もり

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製造販売していた。この血清は食品検査センター関連機関だけでなく（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地方衛生研究所等では便や血清のような人由来の検体の実験室診断にも用いていた。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当局の判断である。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。

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、早急に行政検査に用いる標準品を整える必要があった。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実験室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た。生物学的製剤の標準品と同様に感染研の生物学的製剤及び抗生物質製剤検定協議会で審議、承認されることで行政検査に必要な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品質管理に用いる国内標準品（WHO標準品に標準化済み）に対してマウス中和試験法で標準化した。

### 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・デイッキンソン）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)  
15〜20 g のマウスを用意する。
- 5) ピクリン酸溶液 (マウス標識用)  
適当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

- ープボックス)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原案作成のために、標準試験法検討委員会から要望された検討事項】

#### 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 (NIHSJ-20)」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 3)。PCR 産物のアガロースゲル電気泳動の一例を図 1 に示した。

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。(図 2)

## 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 4-6 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 6)。

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°C で 10 分間、II 群菌では 60°C 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 7)。

## 【食品からのボツリヌス菌検出法原案の作成】

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ボツリヌス菌試験法 (NIHSJ-19) と分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法 (NIHSJ-20) の説明文およびその概略を図 3 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、毒素の抗原性に基つき 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°C)、Ⅱ群菌が最も低い(28-32°C)。芽胞の耐熱性も各群で異なる。Ⅰ群菌は80°C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°C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°C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C<sub>1</sub>は神経毒であるがC<sub>2</sub>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°Cで10分加熱群および80°Cで10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°C、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°C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°C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状を呈して死亡し、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 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. 分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法 (NIHSJ-20)

##### 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):

TGAAAATGGTAGTTGGAAAGTA

Reverse (C26R):

ATATGAATCTTCCATCTCTTAA

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):

ATATGAATCTTCCATCTCTTAA

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

Forward (C12F):

GTTGGTGAAGTAGATAGATTA

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	10x Ex <i>Taq</i> Buffer	5 $\mu$
ブドウ糖	4 g		
酵母エキス	20 g	dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 $\mu$
チオグリコール酸ナトリウム	1 g		
蒸留水	1,000 ml	Sample DNA	5 $\mu$ l
pH 7.0 $\pm$ 0.1		Forward Primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$

#### 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

1) 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。

2) 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。

3) 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。

4) 懸濁液を 100°Cで10分間加熱後、遠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 <i>Taq</i> (5 unit/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l
--	--------------

(final 0.4  $\mu$  M)

Reverse Primer (20  $\mu$  M) 1  $\mu$

(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分

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分

30サイクル

72°C、10分

10°Cに冷却

##### 7-4 判定

1) 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。

2) エチジウムブロマイドなどのDNA染色剤で染色する。

3) バンドを UV トランスイルミネーターにて観察する。

##### 診断用血清の作製

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4)。標準抗毒素に対する相対値として中和抗体価を求めた結果、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

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。

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。

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℃および60℃で10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℃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。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。

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。

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った。

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実績のある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、この分野で世界的に先駆けて研究している大阪府立大学が開発したプライマーを選択した。

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、関係当局と引き続き調整中である。

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。

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。

作製した血清は国内 3 研究所（化血研、大阪府立大学及び感染研）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。従って、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

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。この素案を「食品からの微生物標準試験法検討委員会」に提案し、そこで各委員により議論された意見に基づき修正した原案を再度委員会に提出した。最終的には、ボツリヌス菌試験法は、ボツリヌス菌試験法（NIHSJ-19）と分離菌株の PCR 法によるボツリヌス毒素遺伝子検出法（NIHSJ-20）の二部に分割することになった。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。

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 (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.

9. 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.
10. 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
11. 高橋元秀 (2009) : 品質管理とその定量法、ボツリヌス治療総論-ボツリヌス毒素製剤の基礎知識-、梶龍兒 総監修、診断と治療社
12. 高橋元秀、鎌田洋一 (2010) : ボツリヌス菌と神経毒素、食中毒における毒素産生細菌とその毒素 6, 食品衛生研究、2. 7-14

表1 ボ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 培養 の 条件	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 モニタリング:Ⅰ群菌はTYG モニタリング:Ⅱ群菌はTPGY	中毒検体:クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート PCRテンプレート 作製用: TPGY	クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート PCRテンプレート 作製用: TPGY	中毒検体: クックドミート Ⅲ群菌:強化クックドミート 肝々ブイオン
	加熱温度 (ヒートショック)	Ⅰ群菌:80℃、15~30分 Ⅱ群菌:60℃、15分 非加熱	Ⅰ群菌:80℃、20分 Ⅱ群菌:65℃、20分 Ⅲ群菌:70℃、10~20分 非加熱	Ⅰ群菌:80℃、10分 Ⅱ群菌:60℃、10分 非加熱	Ⅰ、Ⅲ群菌:70℃、10分 非加熱	80℃、10~20分 70℃、10~20分 75℃、10分 60℃、10~30分 非加熱
	培養温度	30℃	30℃および35℃ 一点では30℃	30℃	30℃	30℃
	培養期間	4日と7日	2~10日間	7日間	7日間	1~14日
分離 培養 の 条件	分離培地	卵黄加: GAM、CW CBI	卵黄加: GAM、CW CBI 卵黄加マックラング・トウベ	卵黄加GAM	卵黄加GAM	卵黄加: GAM、CW CBI 変法LV
	培養温度	30℃	30~35℃	30℃	30℃	30℃
	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 ELISA(A型、B型)	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 ボ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	加熱温度 (ヒートショック)	I群菌: 80°C、10~15分 II群菌: 非加熱	80°C、10分 II群菌: 非加熱
	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	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	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-yast extract-beef extract

表3 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4 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5 ボ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6 ボ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7 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

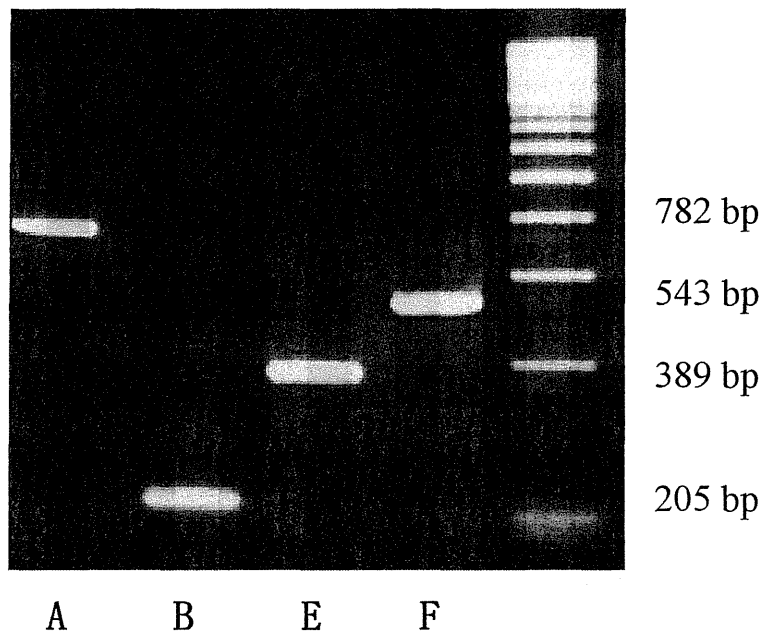


図1 PCR法によるA型、B型、E型、F型ボツリヌス菌の鑑別



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2 PCR法によるC型、D型ボツリヌス菌の鑑別

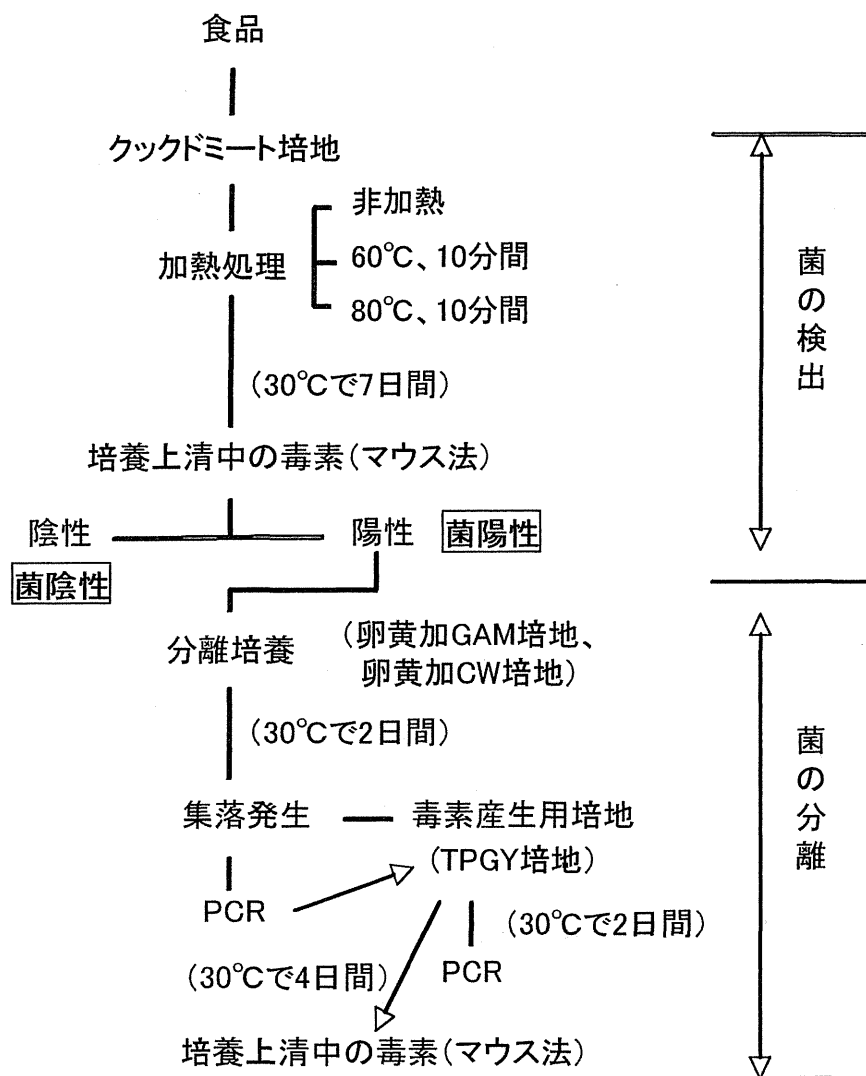


図3 食品からのボツリヌス菌の検出および分離法