

平成29年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「食品微生物試験法の国際調和に関する研究」

分担研究報告書

ボツリヌス試験法に関する研究

研究分担者 倉園久生 国立大学法人帯広畜産大学
グローバルアグロメディシン研究センター
研究協力者 山崎栄樹 国立大学法人帯広畜産大学
動物・食品検査診断センター
奥村香世 国立大学法人帯広畜産大学
獣医学研究部門

研究要旨：“食品からの微生物標準試験法検討委員会”においては、国際整合性を踏まえた主要食中毒細菌の標準試験法の作成が進められている。本研究班では感染時に極めて高い健康危害を顕し国内でも慎重な対策が求められるボツリヌス菌について国際的整合性を持った試験法の策定を目的としている。本年度の研究においては、ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査および、国内法と国際的に利用されている方法の比較検討を行い、国内で利用可能な国際的整合性をもったボツリヌス試験法の整備に向けて、ISO/TS 17191 に基づいたボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の原案（ステージ1）を提案した。

A. 研究目的

コーデックス委員会では食品の衛生に関する国際的な整合性の整備を目的として、各国の食品微生物基準を策定するためのガイドラインを示している。この中で食品微生物試験法に関してはISO法を標準とし、同法もしくは科学的に妥当性を確認した試験法を採用することを求めている。一方で、国内の微生物規格基準は歴史的に独自に開発された試験法を採用してきた。食品流通のグローバル化が進む近年において、本邦で採用される試験法と国際的に利用されている試験法のハーモナイゼーションに対する要求は増しており、国際的通用性を持った標準試験法の国内における整備は急

務の課題となっている。

これらの課題を受け、“食品からの微生物標準試験法検討委員会”において、現在、国際整合性を踏まえた主要食中毒細菌の標準試験法の作成が進められている。これまで、複数の病原微生物・毒素に関する作業部会がデータ収集・解析を行い、同委員会で妥当性確認等を協議することで標準試験法を策定してきた。

本研究では、これまでに食品検査法としての海外で利用される方法との妥当性確認が行われていないボツリヌス菌について国内で利用可能な試験法の整備を行い、国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。研究期間内に試験法の原案を作成

し、検討委員会での議論を経て、将来的に試験法、Technical Specification (TS)、あるいはガイドラインとして整備・公開する事を最終目標とする。本研究により得られる成果は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上での重要性に加え、食餌性ボツリヌス症疑い事例対応への活用も期待される。

本年度の研究においては、ボツリヌス菌に対する国際標準試験法等に関する情報を収集し、国内現行法との相違点や国内現行法の科学的妥当性等について整理を行った。

B. 研究方法および結果

1. ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査

食品中のボツリヌス試験法については ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia (以下、ISO 法) および BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (以下、BAM 法) が国際的に広く利用されている。表 1 に示す様に、ISO 法においてはボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした方法が、BAM 法においてはマウス試験によるボツリヌス毒素検査 (I. および II.)、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査 (III. および IV.) およびボツリヌス毒素遺伝子検査 (V.) が採用されている。

一方で、本邦ではボツリヌスに関する検査法として食基発第 0630002 号・食監発第 0630004 号 (平成 15 年 6 月 30 日) の通知

「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」で示される、食品へのボツリヌス菌添加回収試験が通知法として示されている。本試験法は検査対象食品中にボツリヌス菌が含まれた場合の、食品中でのボツリヌス毒素産生性をマウス試験により検討する試験法であり、食品からのボツリヌス菌の分離・同定法は記載されていない。加えて、衛食第 83 号 (平成 10 年 8 月 26 日) 「イタリア産オリーブ加工品に関わる検査命令について」においてオリーブ加工品からのボツリヌス毒素およびボツリヌス菌の検査方法が通知されている。本試験法においてもマウス試験によるボツリヌス菌の同定法が採用されている。

以上の比較から、国内通知法と国際的に利用されている試験法の間には整合性は見られず、国際調和性の観点から、国内で利用可能な新たなボツリヌス試験法整備の重要性が確認された。

2. 標準法検討委員会におけるボツリヌス標準試験法策定に関する検討事項の整理

標準法検討委員会においては平成 24 年 12 月 7 日付けボツリヌス菌標準試験法 (NIHSJ-19) としてステージ 1 (ST1) 案が提出され議論がなされてきた。当該 ST1 案においてはマウス毒性試験、生化学的性状試験、毒素遺伝子検出によりボツリヌス菌の同定を行うプロトコールとして立案された。一方で同委員会においてボツリヌス毒素遺伝子試験法 (NHISJ-20) についても第 30 回委員会にて提案がなされたものの、最終判定をマウス試験により行うためのスクリーニング法としての位置付けが提案され、標準試験法としての取扱いについては議論が進んでいなかった。

平成24年12月7日付けNIHSJ-19-ST1をISO法およびBAM法と比較した結果、1) NIHSJ-19-ST1では段階希釈液の作製、3種類の前処理条件、4種類の分離培養用培地を使用する等、ISO、BAM法と比較して作業がかなり煩雑であること、2) はちみつを検体とした場合、ISO法では芽胞菌のみを検出するプロトコルになっている一方で、NIHSJ-19-ST1でははちみつの場合は敢えて加熱を行わない手順になっていること、3) NIHSJ-19-ST1で使用するブドウ糖・でんぷん加クックドミート培地はISO、BAM法とは異なり、芽胞産生用培地であること等を始めとして、NIHSJ-19-ST1とISO、BAM法の妥当性検証を行う上で大きな問題があることが明らかとなった(表2)。

加えて、動物実験に対する国際的動向を踏まえ、国際的通用性を担保した試験法においてマウス試験の採用は国際的理解を得るのに大きな障害となる問題点も抽出された。

以上の議論から、第64回 食品からの標準法検討委員会(平成30年1月19日)において1)ボツリヌス毒素遺伝子試験法(NHISJ-20)を優先して整備を進めること、2) NHISJ-20の整備にあたっては、ISO/TS 17191:2013を参照法とし、Technical Specification(TS)として整備を進めることが決定された。

3. ボツリヌス毒素遺伝子試験法ステージ1(NHISJ-20-ST1)の作成

ISO/TS 17191:2013 を基に作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST1 として提案した(別紙)。

D. 考察

ボツリヌス感染症は発生時に死亡を含む極めて高い健康危害性を顕す国内でも慎重な対策が求められる感染症である。しかしながら現在、本邦においては食品中のボツリヌス検査法について公定法などの標準化された検査法が存在せず、早急な整備が求められているところである。この社会的要請を受けて“食品からの微生物標準試験法検討委員会”において国際的通用性をもつ試験法の整備が議論されてきた。本研究においては、過去の検討委員会において議論された方法と国際的に利用されているISO法、BAM法との比較検討を行い、ボツリヌス毒素遺伝子試験法(NHISJ-20)をTSとして提案することで合意に至った。今後、NHISJ-20で使用されるプライマーの設定、培養法の国内食品に対する適合性等の検証を行った後に、国立研究機関、大学、地方衛生研究所等の協力を受けながらST1の検討箇所を設定し、実験データから細かいプロトコルの検討を行い、重要な指摘がある場合はそれを考慮したステージ2案を作成する。その後、協力機関とのインターラボラトリースタディを実施し、試験法の実行性を評価し、NHISJ-20法としての公開を目指す。

E. 結論

1)ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査および、国内法と国際的に利用されている方法の比較検討を行い、食品からの標準法検討委員会で整備・提案するボツリヌス検査法としてボツリヌス遺伝子試験法(Technical Specification)が妥当であることが明らかにされた。

2) ISO/TS 17191:2013 を基に作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST1 として提案した。

ISO/IEC17025 認定取得の取り組み .
AOAC INTERNATIONAL JAPAN SECTION 第
20 回記念年次大会, 東京都 (2017.7)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki E, Sakamoto R, Matsumoto T, Maiti B, Okumura K, Morimatsu F, Balakrish Nair G, Kurazono H.: Detection of Cholera Toxin by an Immunochromatographic Test Strip. *Methods Mol. Biol.*, 1600:1-7, 2017.
2. Aryantini, N. P. D., Yamasaki E, Kurazono, H, Sujaya I. N., Urashima T, Fukuda K.: *In vitro* safety assessments and antimicrobial activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from a fermented mare's milk. *Animal Science Journal*, 88(3):517-525, 2017.

2. 学会発表

1. 山崎栄樹, 楠本晃子, 七戸新太郎, 福本晋也, 菅沼啓輔, 奥村香世, 倉園久生, 森松文毅. ISO/IEC17025 認定に基づく大学における検査精度管理への取り組み. 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡市 (2018.3)
2. 山崎栄樹, 楠本晃子, 七戸新太郎, 福本晋也, 菅沼啓輔, 横山直明, 五十嵐郁男, 玄学南, 倉園久生, 石井利明, 森松文毅. 大学における ISO/IEC17025 認定取得の取り組み. 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 徳島市 (2017.10)
3. 山崎栄樹, 福本晋也, 菅沼啓輔, 楠本晃子, 七戸新太郎, 横山直明, 五十嵐郁夫, 玄学南, 倉園久生, 石井利明, 井上昇, 森松文毅. 大学における

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. 引用文献

- ・ ISO/TS 17191:2013 Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia
- ・ BAM chapter 17 *Clostridium botulinum* (<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070879.htm>)

表 1 Clostridium botulinum 標準試験法の国内外の動向

区分	規格番号	規格名	規格構成	試験法の概要
国外試験法	ISO/TS 17191	Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia	-	ボツリヌス毒素遺伝子をターゲットとした PCR, real-time PCR 法
	BAM Chapter17	Clostridium botulinum	I. Mouse Bioassay for Clostridium botulinum Toxin II. Mouse Screening Procedure for Clostridium botulinum Type E Spores in Smoked Fish III. Amplified ELISA Procedure for Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F from Culture IV. Detection of Type A, B, E, and F Clostridium botulinum Toxins Using Digoxigenin-labeled IgGs and the ELISA (DIG-ELISA) V. Specific Detection of Clostridium botulinum Types A, B, E, and F Using the Polymerase Chain Reaction (PCR)	マウス試験によるボツリヌス毒素検査法(IおよびII)、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査法(IIIおよびIV)、およびボツリヌス毒素遺伝子検査法(V)
国内通知法	食基発第0630002号・食監発第0630004号(平成15年6月30日)	容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について	-	食品へのボツリヌス菌添加回収試験法
	衛食第83号(平成10年8月26日)	イタリア産オリーブ加工品に関わる検査命令について	-	食品からのボツリヌス菌分離法およびマウス試験によるボツリヌス菌の同定法

表 2 NIHSJ-19-ST1 案と ISO,BAM 法の比較

試験法	NIHSJ-19 (H24.12.7 案)	ISO/TS 17191	BAM (Alternative Method I)
所要日数	12~20 日間	5 日間	17~27 日間
行程数	23	23	26
完全試験項目	マウス毒性試験 生化学的性状試験 毒素遺伝子検出	毒素遺伝子検出	マウス試験 卵黄加寒天培地での発育
供試食品量 (食品換算)	未定	はちみつ:25g(全量) はちみつ以外の一般食品:0.1g	固形食品:1g 液体食品:2g
マウス使用数	260 <	0	208 <
増菌培養条件	ブドウ糖・でんぷん加クッドミート培地	TPGY 培地	クッドミート培地 TPGY 培地

<p style="text-align: center;">NHHSJ-20-ST1</p> <p style="text-align: center;">ポツリヌス毒素遺伝子試験法 (定性法) [ステージ 1]</p> <p>1. はじめに 本試験法は ISO/TS 17919:2013 に準じた、A, B, E および F 型ポツリヌス毒素遺伝子を PCR 法により検出するための Technical specification (TS) である。本 TS においては、毒素ではなく遺伝子検出を目的としているため、本試験で毒性であったとしても、その結果が必ずしも試料中にポツリヌス毒素の存在を示すものではない。</p> <p>2. 試験の概要 本試験法は、はちみつを試料とする場合は試料中の芽胞を、はちみつ以外の食品を試料とする場合は芽胞および生菌の存在を A, B, E および F 型ポツリヌス毒素遺伝子特異的 PCR 法により判定する定性試験法である。はちみつを試料とする場合は、50℃で加熱殺菌した試料 25 g に 1% polysorbate 80 含有滅菌蒸留水を加えて均質化し、遠心分離により得られた上清を 0.45 μm ニトロセルロースフィルターでろ過してフィルター上に捕集された菌および、遠心分離により得られた沈渣を TPGY 培地に懸濁し、65℃で 10 分間処理後に 30℃で嫌気培養する。はちみつ以外の食品を試料とする場合は、試料 25g に 0.1% ベプトン加生理食塩水を加えて均質化した試料溶液を TPGY 培地に加え、65℃で 10 分間の処理 (芽胞測定) および非処理 (生菌測定) の後に、30℃で嫌気培養する。いずれの試料においても、24 時間後の増菌液から DNA 抽出を行い、ポツリヌス毒素遺伝子特異的 PCR 法によりポツリヌス毒素遺伝子の存在を確認する。24 時間後の増菌液でポツリヌス毒素遺伝子陰性であった場合には、更に 48 時間の嫌気培養を行った後に、培養液 1 mL を新鮮な TPGY 培地 9 mL に加え、30℃で 18 時間の嫌気培養を行い、得られた培養液に対して DNA 抽出およびポツリヌス毒素遺伝子特異的 PCR を行い、ポツリヌス毒素遺伝子の存在を確認する。</p> <p>3. 使用機器および器具 省略</p> <p>4. 培地および試薬 ① 0.1% ベプトン加生理食塩水 ② tryptone-peptone-glucose-yeast extract broth (TPGY 培地) ③ リン酸緩衝液 ④ 緩衝 TPGY 培地 ⑤ CTAB 抽出緩衝液 ⑥ CTAB 沈殿緩衝液 ⑦ プロアアーゼ K 溶液 ⑧ TE buffer</p>	<p style="text-align: center;">NHHSJ-20-ST1</p> <p>5. 試験手順 5-1 試料液調製 (はちみつ以外の一般食品) ① ストマッキング袋に試料 25±0.1 g を取り分け、0.1% ベプトン加生理食塩水 225 mL を加え、1 分間のストマッキング処理を行う。 ② ①で得られた試料 1 mL を、30±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※1} 9 mL と混和する (生菌測定用試料)。 ③ ①で得られた試料 1 mL を、65±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※2} 9 mL と混和し、65±1℃で 10 分間インキュベートする。その後、30±1℃の水浴で急冷する (芽胞測定用試料)。 ④ ②および③で得られた培養液を 30±1℃で 24±2 時間の嫌気培養後、1 mL を分取し「5-3. PCR 検査」を実施する。残りの培養液については引き継ぎ嫌気培養を行う。 ⑤ ④で得られたサンプルが PCR 検査陰性の場合には、更に 48±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) 後、培養液 1 mL を 30±1℃の水浴で加熱した 9 mL の新鮮な TPGY 培地^{※2} に加え、18±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) を行った後に、再度「5-3. PCR 検査」を実施する。 ^{※1}: TPGY 培地は使用前直前に沸騰水浴で 15 分間の加熱により脱気したものを使用する。また、酸阻性の高い食品に対しては、緩衝 TPGY 培地を使用する。</p> <p>5-2 試料液調製 (はちみつ) ① はちみつが入った容器を 50±1℃の水浴で 30 分間加熱する。加熱後に容器を数回転倒混和して均一化する。 ② 滅菌した遠心管に試料 25±2 g を取り分け、50±1℃に加熱した 1% polysorbate 80 含有滅菌蒸留水 50 mL を加え、よく均一化する。 ③ 12,000 x g で 30 分の遠心分離後、上清と沈渣をデカンテーションにより分離する。沈渣は 5±3℃で使用まで保管する。 ④ ③で得られた上清を 0.45 μm の滅菌ニトロセルロースフィルターでろ過する。フィルターが目詰まりした場合は、新しいフィルターに交換し、全ての上清をろ過する。なお、得られたフィルターが複数存在する場合は、その全てを 1 試料としてまとめて取り扱う。得られたフィルターに 65±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※2} 10 mL を加え、65±1℃で 10 分間インキュベートする。 ⑤ ③で得られた沈渣を 65±1℃の水浴で加熱した TPGY 培地^{※2} 10 mL に懸濁し、65±1℃で 10 分間インキュベートする。 ⑥ ④および⑤で得られた培養液を 30±1℃で 24±2 時間の嫌気培養後、1 mL を分取し「5-3. PCR 検査」を実施する。残りの培養液については引き継ぎ嫌気培養を行う。 ⑦ ⑥で得られたサンプルが PCR 検査陰性の場合には、更に 48±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) 後、培養液 1 mL を 9 mL の 30±1℃の水浴で加熱した新鮮な TPGY 培地^{※2} 培地に加え、18±2 時間の嫌気培養 (30±1℃) を行った後に、再度「5-3. PCR 検査」</p>
--	---

<p style="text-align: center;">NIHSJ-20-ST1</p> <p>を実施する。</p> <p>*注：TRG 培養は使用前に沸騰水浴で 15 分間の加熱により脱気したものを使用する。</p> <p>5-3. PCR 検査</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 1 mL の培養液を 1.5 mL 遠心チューブに分取し、12,000 x g で 5 分間の遠心分離後、マイクロピペットを利用し上清を完全に除去する。 ② 沈渣（菌塊）に 65 °C に加熱した 0.5 mL の CTAB 抽出緩衝液を加え、沈渣を完全に懸濁する。 ③ 65 °C で 30 分間、攪拌しながらインキュベートする。 ④ 20 µL のプロテアーゼ K 溶液を加えて穏やかに臨期攪拌後、更に 65 °C で 30 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートする。 ⑤ 12,000 x g で 10 分の遠心分離後、上清を新しい遠心チューブに回収する。 ⑥ 回収した上清に 0.7 – 1 倍容のクロホルムを加え、数秒間ボルテックスにより攪拌する。 ⑦ 12,000 x g で 15 分間の遠心分離後、上層（水層）を新しい遠心チューブに回収する。 ⑧ 回収した上層に 2 倍容の CTAB 沈殿緩衝液を加え、室温にて 60 分間静置する。12,000 x g で 10 分間の遠心分離後に得られた沈渣を 350 µL の 1.2 mol/L NaCl 溶液に溶解する。350 µL のクロホルムを加え、激しく攪拌後、12,000 x g で 10 分間の遠心分離を行い、マイクロピペット等を用いて、得られた上層（水層）を新しい 1.5 mL 遠心チューブに回収する。*注③ ⑨ 回収した上層に 0.6 倍容のイソプロパノールを加え、ボルテックス等により激しく攪拌後、室温で 20 分間、静置する。 ⑩ 12,000 x g で 15 分間の遠心分離後、上清を廃棄する。 ⑪ DNA の沈殿に 0.5 mL の 70% エタノール溶液を加え、チューブを数回颠倒しチューブの内壁を洗浄する。 ⑫ 12,000 x g で 10 分間の遠心分離後、上清を廃棄し、沈渣を室温で乾燥させる。 ⑬ 沈渣を 100 µL の TE buffer に懸濁し、顕微 DNA 溶液とする。 ⑭ 得られた顕微 DNA 溶液に対して PCR 検査を実施し、得られた顕微 DNA 溶液は 20 °C で保存する。 <p>*注③：行程⑧（CTAB 沈殿）は必須ではないものの、タンパク質やポリリサッカライドに富む食品マトリクスを利用した場合には推奨される。また、スピノグラムを用いた同種 DNA 抽出法も使用可能である。</p> <p>6. 結果の解釈</p> <p>本試験は液体中のポツリヌス毒素遺伝子を保有する菌体の検出を目的としているため、上述の PCR 検査の結果が必ずしも検体中のポツリヌス毒素の存在を反映していない。</p>	<p style="text-align: center;">NIHSJ-20-ST1</p> <p>るわけではないことに注意が必要である。ポツリヌス毒素の確認には毒素タンパク質あるいは活性を測定可能な方法を用いた追加試験を行わなくてはならない。</p>
---	--

