

平成30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
獣医学研究部門
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（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、昨年度までに整備したボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の原案（ステージ1）の実効性の検証を目的として、検討委員会の試験法検討案作成方針に従い専門家より構成される作業部会を編成し、試験法のバリデーションに使用される作業部会案（ステージ2）の整備および、バリデーション実施に必要な基礎データの獲得を行った。これらの成果は試験法検討案作成方針に従った標準試験法の整備において重要なステップであり、今後、編成された作業部会において方針に従った検証作業を進めることで、公開可能なボツリヌス遺伝子試験法の整備を目指す。

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」（以下、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海外で利用される方法との妥当性確認が行なわれていないボツリヌス菌について国内で利用可能な国際的整合性を持った試験法の策定を目的とする。国内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」で食品中でのボツリヌス毒素産生性評価法が通知法として示されており、また、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」においては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が、いずれの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。一方で、国際的には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）が広く知られており、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、免疫学的手法によるボツリヌス毒素タンパク質検査およびボツリヌス毒素遺伝子検査が採用されている。本研究において昨年度までに、これらの国内外の試験法の比較検証を行い、検討委員会において整

備・提案するボツリヌス検査法としてボツリヌス遺伝子を検出指標とした試験法が妥当であるとの結論に至り、ISO法を基に作成した標準試験法（Technical Specification）の原案（NHISJ-20TS-ST1）を提案した。本年度の研究においてはコラボスタディ（Collaborative study:CS）の実施にむけてNIHSJ-20ST-ST1を元にした標準作業手順書（NIHSJ-20TS-ST2）の整備を行い、バリデーション（妥当性確認）実施に必要な基礎データの獲得を行った。

B. 研究方法および結果

1. ボツリヌス毒素遺伝子試験法ステージ2(NHISJ-20TS-ST2)の作成

CSに利用可能な標準作業手順書を作成し、第66回検討委員会（2018年9月21日）にてNIHSJ-20TS-ST2として承認された。NIHSJ-20TS-ST2の作成においては、可能な限りISO/TS 17191:2013に準ずる事でISO法との妥当性を確保した形での整備をおこなった。

2. バリデーション実施計画の作成

ボツリヌス菌においては試験実施に要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さから、これらを考慮したバリデーション実施計画の作成が重要である。新規試験法のバリデーションはその実施形態によって、単一試験室バリデーション（Single laboratory validation:SLV）とCSに大別されるが、検討委員会での議論の結果、NIHSJ-20TS-ST2についてはSLVとCSを組合せた形でのバリデーションの実施が妥当であるとの結論に至り、図1に示す体制でのバリデーション計画を提案した。すなわ

ち、ポツリヌス試験法においては NIHSJ-20TS-ST2 内で試料調整方法が異なる 2 種の食品(はちみつおよび、はちみつ以外の一般食品)と 4 種類の毒素型(A 型、B 型、E 型および F 型)の組み合わせにより計 8 パターンの添加回収試験の実施が必要であるが、この中ではちみつに A 型菌を添加した試料を用いて CS を実施することで併行条件での NIHSJ-20TS-ST2 のバリデーションおよびベリフィケーション(性能検証)を同時に実施し、その一方でそれ以外の組合せに関しては SLV による検証を行うことで、試験室間の菌株移動を最小限に抑えた形態でのバリデーション実施計画を作成した。加えて、ポツリヌス菌を取扱う試験実施に要求される設備条件およびポツリヌス菌取扱い実績を考慮して CS に参加可能な組織の選定を行い、大学 2 施設および地方衛生研究所 2 施設からなる作業部会(WG)を編成した。

3. バリデーションに使用する添加菌液調整プロトコールの作成

WG において NIHSJ-20TS-ST2 の検証を行い、国内の試験室の状況を加味しながらも ISO 法との妥当性を担保した形で NIHSJ-20TS-ST2 の修正が行われ、また同時に WG で実施するバリデーションにおいて検討が必要な項目について抽出を行った。食品衛生検査指針 微生物編(2018)および ISO16140-2:2016 において定性試験のバリデーションでは食品試料に菌レベルが無菌(検出率 0%)、低レベル(検出率 25-75%)、高レベル(検出率 100%)となるように添加し検証を実施する様に提言されている。NIHSJ-20TS-ST2 では芽胞と Vegetative cell を分けて検出するプロトコールとなっているこ

と、および菌を添加後の食品検体の配布が困難であり各 CS 参加機関において個々に食品への菌添加を行わざる得ないことから、各 CS 参加機関における添加菌液の制御について慎重な検討が必要である事が指摘された。培養条件が芽胞形成割合に与える影響を検証した結果、添加菌液調整に使用する培養液の組成および培養条件によって芽胞形成割合が大きく異なることが明らかとなり(図 2)、CS 参加機関間で添加菌レベルを同水準に制御するためには添加菌液調整プロトコールの整備の必要性であることが明らかとなった。本解析の結果に基づき、添加回収試験における菌レベルの制御が可能な CS 実施に向けて、同一組成の培地を利用した添加菌液調整プロトコールの原案を下記の様に提案した。ポツリヌス菌においては毒素型間で発育性状に差が見られること及び、CS において各機関で由来の異なる菌株を使用せざる問えない現状から、今後、下記のプロトコールを基本としながら CS 参加機関間でのデータ比較を実施し、安定した添加菌液を調整可能なプロトコールの整備を進める。

【添加菌液調整プロトコール(原案)】試供菌株の保存液をクックドミート培地に接種し、 37 ± 1 で 3 日間、嫌気条件下で培養した培養液 0.06 mL を新しいクックドミート培地 6 mL に接種し 37 ± 1 で 7 日間、嫌気条件下で培養する。この培養液 0.06 mL を新しいクックドミート培地 6 mL に接種し 80 で 20 分間加熱処理後、 37 ± 1 で 7 日間、嫌気条件下で培養する。この加熱処理および 7 日間培養の操作をさらに 2 回繰り返し得られた培養液を 50%グリセロール溶液と 1:1 で混和し-80 で凍結保存する。

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菌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。本研究では研究期間内に試験法案を作成し、検討委員会での議論を経て Technical Specification として整備・公開する事を最終目標としている。検討委員会においては試験法のバリデーションおよびベリフィケーションをステージ1からステージ4の4つの手順に従い実施する方針を表明している。本研究においてはステージ2である作業部会案を作成し、WGにおいて詳細なプロトコルの検討の結果、国内の試験室の状況を加味した複数の指摘が挙げられ細かい修正がなされたが、本作業においても検討委員会の基本方針に従い、ISO法に準じて作成された NIHSJ-20TS-ST2 に対する大幅なプロトコルの変更を行うこと無く、ISO法との妥当性を担保した形での NIHSJ-20TS-ST2 の合意に至った(参考資料)。今後、WGにおいて同法のベリフィケーションに重点をおいた検証作業を進め、最終的に Technical Specification としての公開を目指す。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。

E. 結論

- 1) ISO/TS 17191:2013 を基にコラボスタディに使用可能な作業手順書を作成し、NIHSJ-20-ST2 として提案した。
- 2) NIHSJ-20-ST2 のバリデーション及びベリフィケーションを実施する作業部会を編成し、ボツリヌス菌の特性を考慮したバリデーション進行案を作成した。
- 3) 作業部会におけるバリデーションおよびベリフィケーションに必要な基礎データの獲得を行った。

F. 研究発表

学会発表

1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、佐藤守、山崎栄樹。Cholix による細胞致死機構における新規結合タンパク質の同定と機能解析。第65回トキシシンポジウム、金沢市(2018.7)
2. Eiki Yamasaki, Hisao Kurazono, Myo Thura Zaw, Kayo Okumura, Shingo Yamamoto. *Uropathogenic specific protein* gene, highly distributed in extraintestinal uropathogenic *Escherichia coli* isolated from both humans and companion animals, encodes a new member of H-N-H nuclease superfamily. 4th International Conference on One Medicine One Science, チェンマイ, タイ(2019.1)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H . 引用文献

- ・ ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- ・ 食品衛生検査指針 微生物編 (2018) 第 1 章 4. 試験法の妥当性確認と性能検証

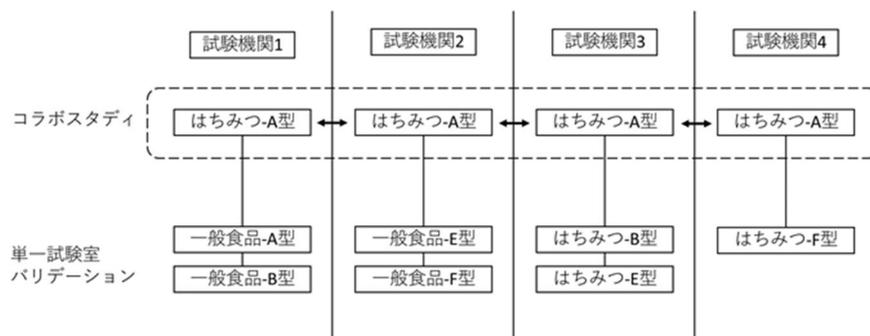


図1 ボツリヌス菌取扱いに要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さを考慮したNIHSJ-20TS-ST2のバリデーション実施計画

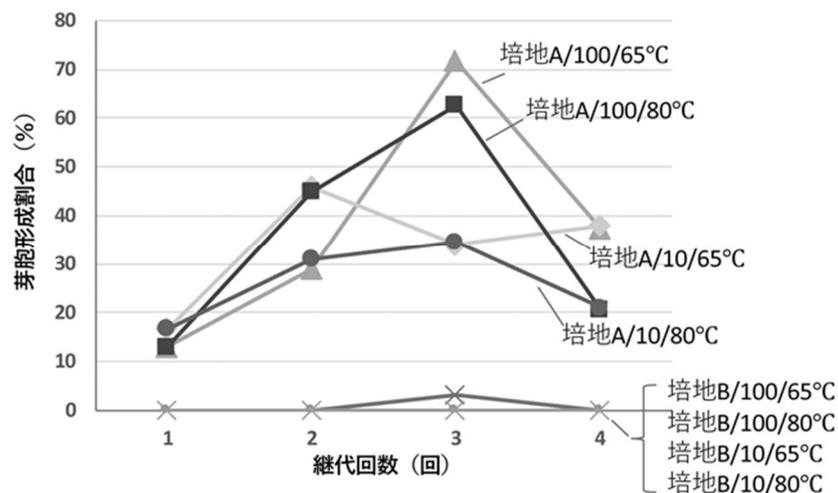


図2 ボツリヌス菌の芽胞形成に対する培養条件の影響
組成の異なる培地 A および B で増菌した Okra 株を 100 倍もしくは 10 倍容の新鮮な培地に接種後、65℃, 10 分間もしくは 80℃, 20 分間で加熱処理した後に、嫌気条件下 (37℃) で 7 日間の培養を行った。同様の処理を 1-4 回繰り返した培養液に対して、グラム染色観察を行い、芽胞形成割合を算出した。