

令和元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	国立大学法人徳島大学
研究協力者	山崎栄樹	国立大学法人帯広畜産大学
	奥村香世	国立大学法人帯広畜産大学
	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター
	門間千枝	東京都健康安全研究センター
	河合高生	大阪健康安全基盤研究所
	梅田 薫	大阪健康安全基盤研究所
	幸田知子	公立大学法人大阪府立大学
	小崎俊司	公立大学法人大阪府立大学

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）”では、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。一方、感染時には公衆衛生上極めて高い健康被害をもたらすボツリヌス菌及び同毒素については、NIHSJ法としては作成がなし得ていない。本研究班では国際調和性を持つボツリヌス試験法の策定を目的として検討を行ってきた。本年度は、昨年度までに整備したボツリヌス遺伝子試験法（Technical Specification）の作業部会案（ステージ2）を基本としてバリデーション実施に向けた計画案の構築を行った。作業部会での協議を経て、対象微生物等については法規制が大きく、菌株移動や取扱い施設設備の制限も多いことから、バリデーション作業においても実行可能性を踏まえた計画案の作成が重要と判断された。すなわち、他種の病原体とは異なるスキームの構築が必要となる。検討委員会での議論を経て、ボツリヌス試験法の妥当性評価としては、Collaborative studyとSingle laboratory validationを組合せたバリデーション計画を行うスキームが妥当と考えられた。また、これに先行して対象菌に特有の基礎データを取得すべき項目を抽出した。こうしたスキーム構築は、取扱いに制約を有する病原体等に対する試験法バリデーションのモデルケースとなるものであり、国際整合性を踏まえた食品からの標準試験法構築に重要な知見を与えるものと考えられる。

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、国際調和性の高い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が策定されてきた。

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した。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法で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。

昨年度までに、本研究では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、標準試験法(Technical Specification)の原案(NHISJ-20TS-ST1)を作成・提案し、更に、コラボスタディ(Collaborative study:以下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)の整備を行ってきた。本年度は、3回の検討委員会での議論を通じて、法規制の強いボツリヌス菌の特性を勘案したコラボスタディ計画の立案とその妥当性検証方法について検討したので報告する。

B. 研究方法および結果

NIHSJ-20-ST-ST2を基に、第69回検討委員会(2019年7月22日)、第70回検討委員会(2019年12月16日)および第71回検討委員会(2020年2月18日)にてコラボスタディ計画について審議を行った。また、検討委員会前後にCS参加予定機関より編

成されるワーキンググループ(WG)においてメール会議を実施し、各機関の設備状況等を確認し、CS開始前に準備が必要な項目について精査を行った。以上の議論により決定されたバリデーション計画および、抽出された課題事項を以下に示す。

1. NIHSJ-20TS-ST2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から、CSの実施にあたり各CS参加機関の設備条件を考慮した手順書の整備が必要である。この理由から、WG会議を通して各施設の設備状況を調査し、CSで用いる手順書(NIHSJ-20TS-ST3)の原案であるNIHSJ-20TS-ST2について各施設の設備的な制約を反映した調整が行われた(参考資料)。

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2段階でのバリデーション計画を提案し、検討委員会において承認された。すなわち、NIHSJ-20TS内では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)を同時に実施する事とした。その一方でそれ以外の組合せに関してはSLVによるバリデーションを実施することとなった。以上の様に、法的小および設備的な制限のある中で、これらの事情を勘案したNIHSJ-20TSのバリデーション作業計画が立案・承認された。

3. CSにおける評価指標の設定

CSにおける併行精度を評価する指標の候補として表1に示す複数の国際的に通用性をもつ指標が挙げられた。本研究内で実施するCSで用いる評価指標としての適切性について、検討委員会内バリデーション作業部会に諮問を行った結果、ボツリヌス菌の取扱いの困難さや設備的な制限(設備的な制限により、一度に扱える検体数も制限される)を考慮し、Limit of Detection(LOD:検出下限)を指標としたCSが適切であるとの結論に至った。

本研究で実施するはちみつおよびA型菌を用いたCSにおいては主管機関である帯広畜産大学にてLODを決定した後に、各CS参加機関において上記のLODを再現可能かについて検証を行う(図1)。上記のような二段階のスキームを採用することにより、設備的な制限が理由で多数の検体を一度に処理することが不可能なボツリヌス菌試験法のバリデーションにおいて、時間的効率も加味した現実的なCS案の提案に至った。

4. スパイク菌液作成プロトコールの整備

ボツリヌス菌を添加した食品検体を配布することは、法的規制を踏まえると、極めて実行可能性に乏しい。そのため、各 CS 参加予定機関において個々に食品への菌添加を行わざるを得ないと考えられた。ボツリヌス菌については培養条件により培養液内の Vegetative form と Spore form の割合が大きく変化することが既知であり、異なる試験室でスパイク菌液を作成せざるを得ない本 CS でのスパイク菌液作成法の作成・提示にあたっては、多元的な科学的根拠に基づくことが重要との結論に至った。ボツリヌス菌の食品内動態等を考慮した検討委員会での議論の結果、スパイク菌液として精製芽胞菌液を利用することが適切であるとの結論に達し、これを受けて WG より複数の精製芽胞菌液作成プロトコールについて提案がなされた。なお、ISO/TS 17191:2013 では Annex D (informative)として芽胞菌液作成プロトコールが示されている。しかしながら、当該プロトコールにおいてはバスソニケーターの準備が必要であることや、芽胞菌液の保存に 1 の冷蔵設備が求められている事等の設備要件を含めて、国内施設での CS 実施において障害となる問題点が挙げられた。その一方で、食基発第 0630002 号・食監発第 0630004 号「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」で指定される芽胞菌液作製法については、国内施設での使用実績等の優位性から本研究で実施する CS への適用が適切であると考えられた。しかしながら、当該プロトコールにおいては使用する培養液の種類に関する指定がなく、また、本研究の昨年度までの検討の結果、芽胞形成割合が培地の組成によって大きく異なることが示されている。

そのため、培養液の選択の根拠となる実証データの取得が必要であると指摘され、現在、WG 内において培地および培養条件の妥当性について検証中である。加えて、ボ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が知られていることから、A 型菌以外を用いる SLV においては各機関において各菌株に適した芽胞液調整条件の実証データを獲得し、芽胞液調整プロトコールの整備を行うこととした。

5. DNA 抽出法の妥当性確認

ISO/TS 17191:2013 に従って DNA 抽出法として CTAB 抽出法を指定している。しかしながら CTAB 抽出法は手技の煩雑さや設備要件の面で、CS 参加予定機関の中にも実施困難な施設がみられた。そのため、CS 実施に先駆けて代替となる簡易法を選定することが必要と考えられた。現在、市販キットや国立感染症研究所レファレンス委員会/地方衛生研究所全国協議会発行の病原体検出マニュアル(ボツリヌス症)に記載の方法を含め、NIHSJ-20TS での使用に係る選定のための資料作成を進めている。次年度前期には速やかに共有する予定である。

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。

ボツリヌス菌については法的な規制が強く、菌株の移動が現実的には困難な状況にある。また、ボツリヌス菌の取扱いに求められる施設・設備要件に起因する制約を理由として、CS 参加機関で実施可能な解析も限定的なものとなっている。本研究で行う CS はこの様な制限の下に実施される解析であるため、取扱いが容易な他種の病原体に対して行われる解析とは異なったスキーム構築が必要となった。本研究で実施するスキーム構築は、取扱いが制約的な病原体を用いた CS のモデルケースになりうるものと考えている。そのため、NHISJ-20TS については最終的に試験法自体の公開に加え、試験法のバリデーション手法についても公開可能なものとなるように取りまとめたい。本研究により得られるこれらの成果は、食品の衛生試験法の国際調和を図る上で重要なモデルになるものと考えている。

E. 結論

- 1) NHISJ-20TS-ST2 について CS 参加予定機関間での議論を行い、実行可能性を踏まえ、試験法原案へ修正案を反映させた。
- 2) ボツリヌス菌に対する法的な制限を考慮した NHISJ-20TS に対するバリデーション作業計画を構築した。
- 3) CS 実施に先立ち、検証が必要な基礎データの抽出を行った。

F. 研究発表

論文発表

1. Yahiro K, Ogura K, Terasaki Y, Satoh M, Miyagi S, Terasaki M, Yamasaki E, Moss J.: Cholix toxin, an eukaryotic elongation factor 2 ADP-ribosyltransferase, interacts with Prohibitins and induces apoptosis with mitochondrial dysfunction in human hepatocytes. *Cell Microbiol.*, 2019, 21:e13033.

学会発表

1. 八尋錦之助、小倉康平、寺崎泰弘、宮城聡、山崎栄樹. ヒト肝臓細胞における新規 Cholix 結合膜蛋白質の同定と細胞致死機構の解明. 第 93 回日本細菌学会, 名古屋市 (2020.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 バリデーションに利用される評価指標例

指標	定義*
Probability of detection (POD)	Proportion of positive analytical outcomes for a qualitative method for a given matrix at a given analyte level or concentration.
Level of detection (LOD _x)	Measured analyte concentration, obtained by a given measurement procedure, for which the probability of detection is x. EXAMPLE: LOD ₅₀ is the level of detection for which 50 % of test give a positive result.
Limit of detection	The lowest quantity of an analyte that can be distinguished from the absence of that analyte with a stated confidence level.

*ISO 16140-1:2016 Microbiology of the food chain - Method Validation- の定義に従った

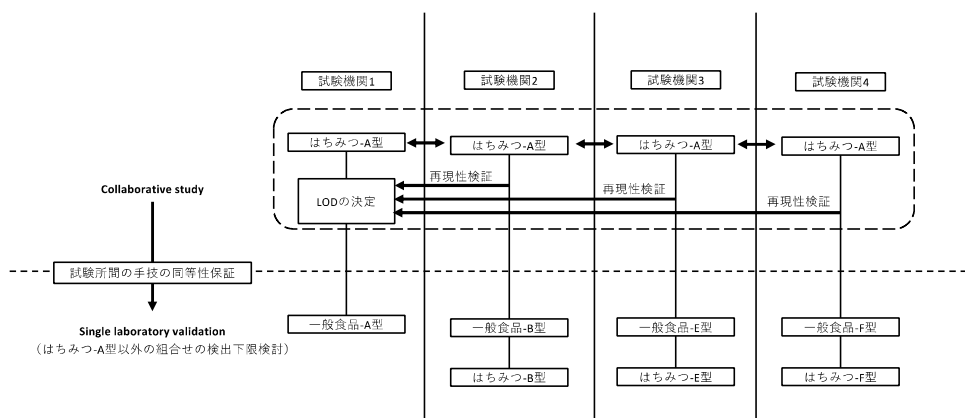


図1 ボツリヌス菌取扱いに要求される設備条件の特殊性や菌株移動の困難さを考慮したNIHSJ-20TSのバリデーション実施計画