

ポツリヌス試験法に関する研究

**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。倉園ら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ポツリヌス菌について国際整合性を持った試験法を策定することを目的として、ポ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ポツリヌス試験法の整備に向けて、ポツリヌス遺伝子試験法( Technical Specification )の原案( NIHSJ-20TS-ST1 )を提案した。更に、円滑に本試験法の検証を行えるよう、作業部会案( NIHSJ-20TS-ST2 )を整備し、妥当性評価実施計画案を作成した。ポツリヌス菌を取り扱うにあたっては、菌株移動や施設設備要件等の制限が多いため、妥当性評価を実施する上で限定的な解析スキームを構築する必要がある。検討委員会での議論を経て、本試験法の妥当性評価に際してはコラボスタディ Collaborative study と Single laboratory validation を組合せた計画案を構築した。あわせて、本菌の性質を踏まえた基礎データの事前取得すべき事項を整理することができた。これらの知見は今後、ポツリヌスのように取扱い制約を受ける病原体等の試験法を検討する際のモデルとなりうると考えられる。今後、本試験法の妥当性評価を加速化させ、国際調和と実行可能性のとれた標準試験法の作成にあたる予定である。

研究分担者

倉園久生 徳島大学 教授

A. 研究目的

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ポツリヌス菌試験法に着目し、国際整合性を担保しつつ、国内で利用可能な試験法の策定を検討することを目的とした。

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。

倉園ら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 Technical Specification (TS) として整備・公開する事を最終目標とした。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。

## B. 研究方法

### 1. ボツリヌス標準試験法に関する国際動向の調査

国内外で利用されている食品中のボツリヌス試験法および、過去に検討委員会において議論されたボツリヌス標準試験法について調査および整理を行い、検討委員会におけるボツリヌス試験法策定に関する検討事項の整理を行った。

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

上項で得られた情報を確認した上で、ボツリヌス毒素遺伝子試験法原案を作成し、第 65 回 食品からの微生物標準試験法検討委員会(2018年2月22日)に提出した。

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

NHISJ-20TS の実効性検証のためのコラボスタディに使用可能な作業手順書を作成し、NHISJ-20-ST2 として第 66 回検討委員会(2018年9月21日)に提案した。

### 4. バリデーション実施計画の作成

ボ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ボツリヌス菌取扱い実績を考慮してコラボスタディ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を編成した。また、NHISJ-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。

## C. 研究結果

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

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状況を確認した。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。

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公的に示されている唯一の方法である。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。

一方、検討委員会では平成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ー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。

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 回検討委員会（2018 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、国際的な試験法を収集・整理した上で、Technical Specification (TS) として整備を進めることが決定され、第 65 回検討委員会(2018 年 2 月 22 日)において作業手順書を NHISJ-20-ST1 として提案した。

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

NIHSJ-20TS-ST1 を基にコラボレーションスタディに利用可能な標準作業手順書を作成し、更に、ワーキンググループにおいて国内の試験室の状況を加味しながらも、国際

整合性を確保した形での標準作業手順書の調整が行われ、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。

### 3. バリデーション実施計画の作成

ボツリヌス試験の実施にあたっては、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り、単一試験室バリデーション (Single laboratory validation:SLV) とコラボスタディ (Collaborative study: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、2 段階でのバリデーション計画を提案し、第 71 回検討委員会(2020 年 2 月 18 日)にて承認された。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。

### 4. 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。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。

### 5. スパイク菌液作成プロトコルの整備

ボツリヌス菌においては法的制限により菌を添加後の食品検体を配布することが現実的には不可能あり、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を得ない。この制限から、各 CS 参加機関におけるスパイク菌液の作製方法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。食品衛生検査指針 微生物編(2018)および ISO 16140-2:2016 では、定性試験のバリデーションにあたっては、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スキームが提唱されている。NIHSJ-20TS-ST2 では芽胞と Vegetative cell を分けて検出するプロトコルとなっているが、ボツリヌス菌にお

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よく知られており、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 においては、スパイク菌液作成法の厳密な制御が必要であると指摘された。食中毒原因食品中のボツリヌス菌の特性等を考慮した検討委員会における議論の結果、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、これを受けてワーキンググループ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。その結果、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が、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 への適用が適切との結論に至った。

#### 6. DNA 抽出法の妥当性確認

NIHSJ-20TS-ST2 では DNA 抽出法に CTAB 抽出法を当初採用した。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 参加機関の中でも CTAB 抽出法の実施が困難との意見が出され、代替となる簡易法を選定する必要性が提唱された。現在、妥当性確認のとれた市販核酸抽出キットをはじめ、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た複数の方法について確認を進めている。

#### 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。倉園らの研究では食品中のボツリヌス菌に対する試験法案を作成し、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。倉園らの研究ではステージ 2 である作業部会案を作成し、更に、国内の試験室の状況を加味した細かい修正を行い、ISO 法との妥当性を担保した形での NIHSJ-20TS-ST2 の提示に至った。

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、コラボスタディ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。ボツリヌス菌を対象としたコラボスタディ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。倉園らにより実施されるコラボスタディのスキーム構築は、取扱いが制約的な病原体を用いたコラボスタディのモデルケースになりうるものと考えている。そのため、NIHSJ-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らる。

今後、ワーキンググループ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 (TS) 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) 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示された。
- 2) 国際調和の観点から、作業手順書を作成し、ISO 法との妥当性を担保した NHISJ-20-ST2 を提案した。
- 3) NHISJ-20-ST2 の妥当性評価にあたるための作業部会を編成し、ボツリヌス菌に対する法的な制限を考慮した NHISJ-20TS に対する作業計画を構築した。

## 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 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)
4. 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. 4<sup>th</sup>  
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

