

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のための研究」

令和2年～4年度分担総合研究報告書

ボツリヌス試験法に関する研究

研究分担者	山崎栄樹	国立大学法人帯広畜産大学
研究協力者	倉園久生	国立大学法人徳島大学
	奥村香世	国立感染症研究所
	朝倉宏	国立医薬品食品衛生研究所
	門間千枝	東京都健康安全研究センター
	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）”においては、国際調和がとれた微生物試験法の作成が進められている。本研究では同委員会の試験法作成方針に従ったボツリヌス菌に関する試験法（Technical Specification）の策定を目的としている。ボツリヌス菌については法規制等の制限により、試験法作成方針に含まれるバリデーション作業において実施可能な解析が限定的となっているため、これまで検討委員会において本菌を使用したコラボスタディの実施方法について議論がなされてきた。本研究では、先行研究にて整備したボツリヌス遺伝子試験法の作業部会案（ステージ2）について、コラボスタディ（ステージ3）開始前に検討が必要な事項として、スパイク用芽胞液作製プロトコールの検討、簡易DNA抽出法の妥当性確認等を実施し、限定的な設備環境下でも実施可能なコラボスタディ計画の構築に至った。さらに、過去の国内食中毒事例およびISO 16140-3との整合性を勘案したコラボスタディで使用する食品マトリクス種の選定を行い、*C. botulinum* A型菌およびはちみつ試料を用いた室間再現性の検証とA型菌以外を用いたシングルラボスタディによる汎用性検証に作業を分けたコラボスタディ計画を提案し、検討委員会において承認を得た。その後、承認されたコラボスタディ計画に従い4つの試験機関からなる作業部会にて解析を行い、ボツリヌス毒素遺伝子試験法NIHSJ-20TS-ST3の安定性および汎用性が確認された。加えて、NIHSJ-20TS-ST3の記述内容について検討委員会から提出された意見に対応する形で最終調整を行い、試験法最終案（NIHSJ-20TS-ST4）とした。NIHSJ-20TS-ST4案については検討委員会での確認の後に最終稿として承認され、国内の様々な試験所で参照可能な方法として広く公開される事となった。本研究により構築したボツリヌス毒素遺伝子試験法は国際基準に適合する国内微生物試験法として利用可能であり、食品流通の国際化に対応した食品安全行政の進展に寄与するものであると期待している。

## 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原因微生物等の標準試験法の作成が進められてきた。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の策定を行っている。

本研究では、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。国内では食品に関連するボツリヌス菌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す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。これに対して、国際的にはISO/TS 17919:2013 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。先行研究において我々は、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毒素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、これまでに、検討委員会が示す試験法作成方針に従い、ISO法を基に作成した標準試験法（Technical Specification）の原案（NIHSJ-20TS-ST1）を提案し、更に、コラボスタディの実施にむけてNIHSJ-20TS-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。本研究においては研究期間内にコラボスタディを通してNIHSJ-20TSの妥当性・実効性の検証を行い、検討委員会での確認・承認の後にNIHSJ法として広く公開することを目的とした。

## B. 研究方法

## 1. スパイク用芽胞液作製プロトコールの整備

1-1) 芽胞形成に要する培養時間の検討：  
*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*)  
62A 株をクックドミート培地に接種し、37°C、24 時間で嫌気培養を行った増菌液を、TP 培地 (5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH7.0)、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加 TP 培地 (5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, 0.1%チオグリコール酸ナトリウム, pH7.0) および可溶性デンプン加変法クックドミート培地 (0.3%グルコース, 0.2%可溶性デンプン加クックドミート培地) に接種し、37°C で 24 時間、48 時間及び 72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液について、80°C、20 分間の加熱処理を行った後、卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養を行い、発育集落数を求めた (芽胞数)。平行して、培養後の菌液について、加熱処理を経ずに卵黄加 GAM 寒天培地に播種し、嫌気培養後に発育した集落数を求め (芽胞+栄養型の総数)、両者の比から、芽胞形成率を算定した。

1-2) 芽胞形成に与える培養繰り返し回数の影響の検討：*C. botulinum* 62A 株をクックドミート培地に接種し 37°C、24 時間の嫌気培養を行った後に得られた増菌液を、TP 培地に接種し、37°C、72 時間の嫌気培養を行った。得られた菌液を新鮮な TP 培地に再び接種し、80°C、20 分間の加熱処理を経て、37°C、72 時間の嫌気培養に供した。同操作を更に 3 回繰り返し、それぞれの培養回について、培養開始後 24、48 および 72 時間後の芽胞形成率を上項と同様の方法で評価した。

## 2. 簡易 DNA 抽出キットの妥当性の解析

*C. botulinum* 62A 株または *C. botulinum* Okra 株を TPGY 培地に接種後、24 時間嫌気培養を行い、得られた増菌液の階段希釈液について、CTAB 法のほか、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) 並びに Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) を用いて DNA 抽出を行った (簡易 DNA 抽出キットについては製品添付の説明書に従った DNA 抽出を行った)。CTAB 法では段階希釈液 1 mL を、DNeasy Blood & Tissue Kit では 0.1 mL、Foodproof StarPrep Two Kit では 0.8 mL を DNA 抽出用試料とした。抽出効率の評価は、NIHSJ-20TS-ST3 で示される PCR 法へ DNA 抽出液を適用することに拠った。さらに、芽胞調整プロトコールに従って作製した *C. botulinum* 62A 株芽胞液を 10 倍階段希釈後、はちみつ試料に添加し、NIHSJ-20TS-ST3 に従った培養を行い、得られた培養液に対して CTAB 法および Foodproof StarPrep Two Kit を用いた DNA 抽出およびボツリヌス毒素遺伝子検出を行った。PCR 反応産物の検出には 2.0 % Agarose S (Nippon gene) in 0.5 x TBE buffer および Midori Green Direct を使用した。

## 3. コラボスタディの実施

コラボスタディの開始にあたって NIHSJ-20TS-ST3、芽胞調整プロトコールおよびコラボスタディ実施要領をコラボスタディ参加機関に配布した。併せて、コラボスタディに必要な試薬および食品についても各機関へ同一ロットのものを配布した。各試験機関における添加回収試験においては、各機関にて各機関が保管する菌株を用いて芽胞調整プロトコールに従ってスパイク用菌液を作成したのち、配布のプロトコールに従

って試験を実施した。試験結果については主幹機関に報告され、取りまとめられた。

#### 4. 検討委員会における確認

コラボスタディ開始前に必要な検討事項の解析結果についてコラボスタディ参加機関から構成される作業部会会議にて確認を行った後、コラボスタディ作業計画案を作成し、第72回検討委員会に提出しコラボスタディの開始について審議した。加えて第73回検討委員会にNIHSJ-20ST-ST3を提示した。さらに、コラボスタディで使用する添加菌量および食品の種類について第74回検討委員会に提案を行い、同会議にてコラボスタディの作業計画の改訂が行われた。その後、改定された作業計画に従って作業部会にて解析を実施し、コラボスタディの進捗・結果について第75回、第76回、及び第77回検討委員会にて報告を行い、コラボスタディ結果の評価が行われた。第78回検討委員会においては検討委員会からNIHSJ-20TS-ST3の記述内容に関する意見が出され、同意見に対応した記述内容の変更を行うとともに、様式について他のNIHSJ法との調整を行った後にNIHSJ-20TS-ST4案として第79回検討委員会に提出し、同委員会にてNIHSJ-20TSの最終稿が承認された。

### C. 結果

#### 1. スパイク用芽胞液作製プロトコルの整備

ボツリヌス菌においては法的制限により通常のコラボスタディで実施される菌を添加後の食品検体の配布が実施不可能あり、各コラボスタディ参加機関に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、先行研究において、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、第71回検討委員会にて、食基発第0630002号・食基発第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」に記載の方法に基づき作製された芽胞液をスパイク用菌液として使用することについて承認を得た。しかしながら、同法では芽胞産生用培地の組成が示されておらず、この問題に対して本研究では3種類の培地（TP培地、0.1%チオグリコール酸ナトリウム加TP培地、可溶性デンプン加変法クックドミート培地）を使用した際の芽胞産生性を比較し、安定的な芽胞産生が可能な条件の検討を行った。3種類の培地について、芽胞形成に要する培養時間および、芽胞形成に与える培養の繰り返し回数の影響について検討した結果、芽胞産生用培地としてTP培地が最も適していると判断され、また、継代培養は繰り返し行っても安定的な芽胞形成に寄与しないことが示された。以上の結果より *C. botulinum* 62A株について別添2に示す芽胞調整プロトコルを整備し、コラボスタディでは同プロトコルに従って各機関で調整した芽胞菌液を食品試料添加用菌液として使用する事で合意された。さらに、同プロトコルに従ってコラボスタディ参加機関（4機関）が個別に保管する菌株からのスパイク用菌液の作成を実施した結果、A型菌（62A株）のみならず、同プロトコルに従ってB型菌（Okra株）、E型菌（Biwako株）およびF型菌（Langeland株）について添加試験に十分な芽胞量（ $1 \times 10^7$  spore cfu/mL程度）が得られる事が確認された。

#### 2. NIHSJ-20TSに簡易DNA抽出キットを適用

### した際の検出感度の解析

NIHSJ-20TS で示される DNA 抽出法においては ISO 法と同様に CTAB 法を採用している。しかしながら CTAB 法は手技が煩雑であり、クロロホルムの使用等、取扱い制限の多いボツリヌス菌を用いたコラボスタディ実施にあたっては最適とは言い難いことが作業部会で議論された。先行研究では検討委員会にこの問題点を提起し、第 71 回検討委員会においてコラボスタディに DNA 抽出キットを用いることが承認された。本研究では予備実験としてグラム陽性菌に対して使用可能であることが確認されている複数の市販の簡易 DNA 抽出キットについて検討を行い、そのうち Foodproof StarPrep Two Kit (BIOTECON Diagnostics) についてボツリヌス菌純培養液からの DNA 抽出効率が CTAB 法と比較して 1,000 倍以上高いことを示した。さらに、同キットを NIHSJ-20TS に適用した際のボツリヌス毒素遺伝子検出効率について検討を行った結果、Foodproof StarPrep Two Kit を使用した場合においても CTAB 法を用いた場合と同様に 10 spore cfu/25g はちみつ試料の濃度で安定的に添加回収試験陽性となり、同キットが CTAB 法の代替法として使用可能である事が確認された。本結果については第 74 回検討委員会にて報告を行い、コラボスタディにおいて Foodproof StarPrep Two Kit を使用することが承認された。

### 3. コラボスタディで使用する一般食品種の選定

NIHSJ-20TS では、はちみつと一般食品に対して異なる試料調製プロトコールを指定している。このため、コラボスタディにおいては一般食品に対する添加回収試験をはち

みつとは別に実施しなくてはならない。ボツリヌス菌については今後国内で試験対象となり得る食品種の推定が困難であるため、現時点で NIHSJ-20TS が様々な食品種に対して使用可能かの検証はあまり意味を持たず、また、本検討で実施するコラボスタディの期間・規模に見合ったものではないと考えられた。そこで、コラボスタディにおいては、使用する食品種を各菌種あたり 1 種類のみとし、NIHSJ-20TS に記載の一般食品用の増菌方法が適切に実施可能であるかについての検証を目的とすることとした。スタディに使用する食品として A, B, F 型菌に対しては過去に国内のボツリヌス食中毒事例で問題となったために行政対応がなされている食品種であり、かつ、ISO16140-3:2021 の Annex A でボツリヌス菌に対する試験に適した食品カテゴリー (Multi-compornent food or meal components, Ready to (re)heat food: refrirated) とも合致する「容器包装詰低酸性食品」を、E 型菌に対しては過去に多くの国内ボツリヌス食中毒事例が報告されている「いずし」を選定し、第 74 回検討委員会にて提案を行い、同食品を用いたコラボスタディの実施について承認された。作業部会での検討の結果、コラボスタディで使用する容器包装詰低酸性食品としては、過去に国内での食中毒事例が報告されているもののなかで取扱いの簡便さからハヤシライスソース (保存方法: 10°C 以下にて冷蔵保存、喫食方法: 熱湯で約 5 分沸騰させた後に喫食、pH: 5.2、水分活性: > 0.98) が選択された。

### 4. コボスタディ作業計画の改訂

先行研究では、法規制等で多くの制限の下に実施されるボツリヌス菌を用いたコラボ

スタディにおいては取扱いが容易な他種の病原体とは異なるスキーム構築の必要性を示し、コラボスタディパートとシングルラボスタディパートを組み合わせたコラボスタディ計画案を提案してきた。本研究においてはコラボスタディ計画の詳細について更に検討を行った。

NIHSJ-20TS は ISO/TS 17919 に基づき作成されたプロトコールであり、国際整合性についての妥当性を満たしている。このことから、コラボスタディ計画内のコラボスタディパートの目的を「NIHSJ-20TS を複数の試験室で使用した場合の室間再現性の検証」とする事が妥当であると考え、コラボスタディパートでははちみつ試料に対する 62A 株添加回収試験のみを実施することを第 74 回検討委員会にて提案した。さらに、コラボスタディ作業計画内のシングルラボスタディパートにおいては過去の食中毒事例の発生状況等を勘案し、B 型菌 (Okra 株) についてははちみつと一般食品について、E 型菌 (Biwako 株) 及び F 型菌 (Langeland 株) についてははちみつの喫食を通じた健康被害との関連性が見受けられない実態を踏まえ一般食品についてのみ添加回収試験を実施し、「NIHSJ-20TS が複数の菌型-食品種の組み合わせについて利用可能なプロトコールであることの検証」を行うこととした。これらの提案については第 74 回検討委員会にて承認され、コラボスタディ計画を改訂した。

## 5. コラボスタディ結果

コラボスタディ計画に従ったコラボスタディを完了し、以下の結果を得た。

### 5-1. コラボスタディパートの結果

コラボスタディ参加機関 (4 機関) にて、

はちみつ-62A 株を用いた検討を実施した結果、添加菌量 0 - 100 spore cfu/25 g の範囲で全ての機関において同等の結果が得られた。以上の結果から、NIHSJ-20TS の室間再現性が示され、NIHSJ-20TS のプロトコールとしての安定性が確認された。

### 5-2. シングルラボスタディパートの結果

#### 5-2-1. A 型菌に対するシングルラボスタディの結果

一般食品 (容器包装詰低酸性食品 : ハヤシライスソース) に対する A 型菌 (62A 株) 添加回収試験を実施した結果、少なくとも 1000 spore cfu/25 g 食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られることが確認された。

#### 5-2-2. B 型菌に対するシングルラボスタディの結果

はちみつ試料に対する B 型菌 (Okra 株) 添加回収試験を実施した結果、A 型菌と同様に、少なくとも 10 spore cfu/25 g 試料の添加で陽性の結果が得られることが確認された。加えて、一般食品 (容器包装詰低酸性食品 : ハヤシライスソース) に対する B 型菌添加回収試験を実施した結果、A 型菌と同様に、少なくとも 1000 spore cfu/25 g 食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られることが確認された。

#### 5-2-3. E 型菌に対するシングルラボスタディの結果

一般食品 (いずし) に対する E 型菌 (Biwako 株) 添加回収試験を実施した結果、A 型菌と同様に、少なくとも 1000 spore cfu/25 g 食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られることが確認された。

#### 5-2-4. F 型菌に対するシングルラボスタディの結果

一般食品（容器包装詰低酸性食品：ハヤシライスソース）に対するF型菌（Langeland株）添加回収試験を実施した結果、A型菌と同様に、少なくとも1000 spore cfu/25 g食品試料の添加菌量で安定的に陽性の結果が得られることが確認された。

以上の結果から、NIHSJ-20TS が複数の食品-菌型の組み合わせについて利用可能であることが明らかとなり、NIHSJ-20TS の汎用性が示された。

#### D. 考察

国内における食品に対するボツリヌス菌試験についてはこれまでに、容器包装詰食品を原因としたボツリヌス菌食中毒発生時に原因食品から分離された菌株のボツリヌス毒素産生性を評価する方法が通知法として示されており、加えて、イタリア産オリーブ加工品に対するボツリヌス毒素及びボツリヌス菌の検査法が通知されている。加えて、国立感染症研究所においても病原体検出マニュアルが示されており、国内でボツリヌス菌の試験を行おうとする場合にはこれらの試験法を参照して試験が実施されている。これらの試験法についてはいずれ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、ISO法ではボツリヌス毒素遺伝子を指標とした検出法が示されており、このため、ボツリヌス菌に対する国内での評価結果を海外の結果と比較することは困難な状況となっていた。本研究ではこの問題に対して、ISO法に対して妥当性を確保した国内試験法の構築を行うことで食品微生物検査の国際整合性の確保へ貢献することを目的とし、食品からのボツリヌス菌検出方法としてボツリヌス毒

素遺伝子試験法（定性法）：NIHSJ-20TS-ST4を作成した。ISOは現在、ボツリヌス試験法としてISO/TS 17919をTechnical Specificationとして示している。このため、本研究でISO/TS 17919に基づき作成した試験法についても技術仕様書（TS）として食品からの微生物標準試験法検討委員会では作成した。今後、ISO/TS 17919の改訂の動きに合わせて適宜改訂を行うことも必要であろう。

ボツリヌス菌及び同毒素については法的規制が強く、菌株等の移動が現実的に困難な状況にある。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た。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であった。本研究では上記の課題に対して、通常のコラボスタディにおいて実施される標準試験品配布の代替法としてスパイク用菌液作成プロトコールの標準化により菌株移動を行うことなくコラボスタディを実施可能なスキームを構築した。加えて、コラボスタディの目的を明確にしてコラボスタディパートとシングルラボスタディパートを組み合わせたコンパクトかつ効果的なコラボスタディ作業スキームを構築した。これらのスキーム構築は、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であり、本研究により得られた成果は、食品の衛生試験法構築の際にバリデーション

を行う上で重要なモデルになるものと考え  
る。

2021年1月に示された ISO 16140-3  
Microbiology of the food chain -Method  
validation- Part3: Protocol for the  
verification of reference methods and  
validated alternative methods in a

single laboratory では標準試験法あるい  
は妥当性確認された方法を利用しようとす  
る試験室が適切な感度で当該試験を実施す  
る能力をもっているかを検証するための手  
順が示されている。文書内の Clause 5

(Qualitative methods - Technical  
protocol for verification) には、各試  
験室が妥当性確認されている標準試験法

(定性法) を使用した際に、適切な結果を  
得る能力があるかを検証 (Implimentation  
verification) するための具体的な手順が  
記載されており、3種類の選択可能なプロ  
トコール (Protocol 1, 2 および 3) が提  
示されている。このうち Protocol 1 およ  
び 2 においては、利用しようとする試験法

の Level of detection 50% (LOD<sub>50</sub>) に対  
して 1~9 倍濃度の添加菌量で添加回収試  
験を行った際の結果に基づき試験室の能  
力を評価する事となっている。上記の  
様な国際的な動きに対応するためには、  
国内においても試験法を公表した後に  
同試験法を利用しようとするユーザー  
に対して

Implimentation verification の基準値と  
なる LOD<sub>50</sub> を提示していくことが重要  
となる。作業部会では現在、NIHSJ-20TS  
の利用性向上のために、同試験法の  
LOD<sub>50</sub> の算出を行っている。また、  
検討委員会においては ISO 16410-3  
に基づく国内向けベリフィケーション  
ガイドラインを作成中であ

り、今後、同ガイドラインと本研究で得  
られる成果を連携し、国内でのベリフィ  
ケーションのモデルケースを示したいと  
考えている。これらの活動は本邦の食品  
微生物検査の進展に寄与する新たな取  
り組みであると考ええる。

#### E. 結論

ボツリヌス菌に対する食品からの標準  
検査法として、ISO/TS 17919:2013  
を参照しつつ、NIHSJ-20TS:2023  
ボツリヌス毒素遺伝子試験法 (定性  
法) を作成した。

同法は国際調和のとれた試験法であり、  
国内での食餌性ボツリヌス症疑い事例  
への対応にあたり、原因食品のスクリー  
ニング等への活用が期待される。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし





