

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05904

研究課題名（和文）国際的整合性を満たした食品衛生検査の技能試験に利用可能なボツリヌス菌標準株の開発

研究課題名（英文）Development of internationally acceptable quality verification procedure for standard method for Clostridium botulinum detection

研究代表者

山崎 栄樹（Yamasaki, Eiki）

帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・准教授

研究者番号：40514708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：国際的通用性をもった微生物検査の運用においては、国際的整合性を満たした標準試験法の構築に加えて、精度管理（技能試験）方法の整備も不可欠である。本研究では国内ボツリヌス菌標準試験法に関して、技能試験の実施に必須である標準試験品（標準試験菌株）の作成プロトコルの構築および、ISO規格に示される技能試験評価に必要な評価基準値（LOD50）の算出を行った。これらの成果は、国内において精度管理を実施しようとする試験所に対して、技能試験に必須となる試験実施手順および基準値を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品衛生検査およびその精度管理に関する国際的整合性の確保は、食品流通のグローバル化等に対応するために、本邦の食品衛生行政において大きな課題となっている。本研究で得られた成果は、ボツリヌス菌標準試験法に対する国際基準を満たした技能試験の国内での実施を可能とするのみならず、法的制限により取り扱いが困難な菌種に対する技能試験実施方法のモデルケースとなるものであり、本邦の食品衛生行政の国際化対応に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：In addition to development of standard method, construction of procedure for quality control is required for internationally acceptable microorganism testing system. In this study, we developed standard procedure for preparation of inoculum which can be used in recovery test for standard method of Clostridium botulinum detection. In addition, we assessed LOD50 for the standard method which required in implementation verification described in ISO 16140-3. This information enables internationally acceptable quality verification of testing results produced in laboratories they use domestic standard method for Clostridium botulinum detection.

研究分野：食品衛生学

キーワード：標準試験法 食品からの微生物標準試験法検討委員会 ボツリヌス菌 技能試験 LOD50

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食品流通のグローバル化や、食品衛生法の大幅改正を契機として本邦では食品衛生検査及び、その精度管理に対する国際的・社会的要請が高まりをみせている。これらの要請に応えるべく、これまでに我々は国際的通用性を持った食品微生物検査法の整備を進めてきた。

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、本邦においては食品中のボツリヌス菌に関し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。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」(以下、検討委員会)においてボツリヌス菌についても国際的通用性を持った標準検査法の整備が進められてきた。我々はこれまでに、ISO 法、FDA-BAM 法といった海外で広く利用されている試験法と同等性を持ったボツリヌス菌検査法案を検討委員会に提案し、更に、同検査法案の国内試験機関での実効性について国内の複数の試験機関によるコラボスタディを通じた調査を進め、国際的通用性を持った食品からのボツリヌス菌標準検査法 (NIHSJ-20TS) を構築してきた。

国際的通用性を持った微生物検査の運用においては、各試験施設における技能試験(検査精度管理)の実施が不可欠である。この理由から、微生物検査法の構築においては検査法を構築する段階で、それらの取り組みと並行して精度管理法の整備も進められることが望ましい。技能試験(検査精度管理)の実施においては、技能試験提供者より配布された標準試験品(技能試験品目)を利用した添加回収試験が最も基本的な方法であるが、国内においては多くの検査項目において標準試験品の供給が困難となっている。特に、ボツリヌス菌検査においては、感染症法に規定された本菌の取扱い制限から、標準試験品の配布が現実的には不可能な状態となっており、標準株を利用した技能試験が実施できないという問題を抱えている。

2. 研究の目的

本研究では、法的制限に対応した形でのボツリヌス標準検査法に対する技能試験方法の構築を目的とした。技能試験の実施においては、添加回収試験のための標準試験品(標準試験菌株)および、技能試験結果を評価するための基準値の提示が必要となる。このため本研究では、標準試験品の作製に加え、ISO より提案された国際的通用性をもつ技能試験結果の評価方法に対応した試験結果評価のための基準値についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 標準試験品作製方法の構築

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(平成 15 年 6 月 30 日)」を基準とし、安定的にボツリヌス菌芽胞液を作成する手順について検討を行った。検討においては、*C. botulinum* 62A 株を基準株として選定し、同株について培地および培養時間、培養の繰り返し回数等の培養条件について様々な組み合わせを検討し、安定的に芽胞形成が観察される条件の検索を行った。

(2) 技能試験評価のための基準値 (LOD₅₀) の算出

1.0% Agar を模擬食品マトリクスとして利用し、同マトリクスに段階希釈した *C. botulinum* 62A 株芽胞液を添加した後に、ボツリヌス菌標準検査法 (NIHSJ-20TS) 参考資料 1 に従った添加回収試験を行った。試験結果に対しては <https://www.wiwiss.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html> にて提供される LOD 算出用の EXCEL プログラムを利用し、LOD₅₀ の算出を行った。

4. 研究成果

(1) 標準試験品作製プロトコールの構築

ボツリヌス菌標準検査法における技能試験の実施においては、感染症法の制限から、標準試験品の配布が現実的には不可能であるため、技能試験を実施したいと考える各々の試験所が個別に添加回収試験用の菌液を調整する必要がある。本研究では、独立した試験所における添加回収試験において同一の回収率を示す添加回収用菌液を安定的に作成するプロトコールの構築を試みた。

食品中のボツリヌス菌に関する国内公定法として食基発第 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(平成 15 年 6 月 30 日)」(以下、国内通知法)が厚生労働省より通知され、国内のボツリヌス食中毒事件発生時に利用されている。同通知では、原因食品にボツリヌス菌芽胞液を接種した際に、同食品マトリクス中でボツリヌス菌からのボツリヌス毒素の産生が観察されるかを検証する方法が示されており、同試験に必要な食品添加試験用ボツリヌス菌芽胞液の作製方法が示されている。一方で、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 において添加回収試験用ボツリヌス菌芽胞液の作成方法が

示されている。本研究では国内における技能試験実施にむけた標準試験品作製方法の構築を目指していることから、国内の保健所等にて馴染みの深い国内通知法に基づいたボツリヌス菌芽胞液作製手順について検討を行った。

国内通知法では芽胞産生用培地の組成が示されておらず、独立した個々の機関にて安定的な性状をもつ添加回収用芽胞菌液を作成するための十分なプロトコールが示されていなかった。そこで、本研究においては、国内でボツリヌス菌に対して広く利用されている3種類の培地について、それぞれの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観察される条件の検討を行った。ボツリヌス菌の基準株として国内外で広く利用されている *C. botulinum* 62A 株 (62A 株) を用いて、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を検討した結果、TP 培地 (5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH7.0) が芽胞産生用培地として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たとしても安定的な芽胞形成に寄与しないことが示された。以上の結果に基づき、62A 株を用いた詳細な芽胞液調整プロトコールを作成した。さらに、複数の検査機関の協力のもと、同プロトコールの安定性について検討を行い、同プロトコールを用いて独立した別々の試験機関で安定的に添加回収試験用の芽胞菌液を調整可能であることを確認した。

(2) 技能試験評価のための基準値 (LOD₅₀) の算出

食品からの微生物試験の技能試験の評価方法については2021年に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が発行され、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行する能力を持っているかを検証するための手順が示された。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定性的試験法を使用した際に、適切な結果を得る能力があるかを検証 (Implementation 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% : LOD₅₀ (当該試験法を用いた際に50%の確率で陽性の結果を与える検査対象食品中の菌量) 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 Implementation verification の基準値となる LOD₅₀ を提示していくことが重要となる。本研究においてはボツリヌス菌標準試験法について ISO16140-3:2021 に示された国際的に認められる形での技能試験が可能となるように、ボツリヌス菌標準試験法の LOD₅₀ の算出を行った。

LOD₅₀ は試料とする食品マトリクス成分により影響を受ける場合があることが知られている。ボツリヌス菌においても、国内食中毒事例でしばしば原因食品となる「いずし」はその食品成分がボツリヌス菌の増殖に影響を与える場合があることが報告されている。本研究では技能試験の基準値となる LOD₅₀ の算出を目的としているため、実食品を LOD₅₀ 算出のための食品マトリクスとして用いることは妥当ではないと考えられた。そこで本研究では、1.0% Agar を模擬食品マトリクスとして LOD₅₀ の算出を行うこととした。LOD₅₀ 算出においては、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%) となるように検体に添加し添加回収試験を実施する事が求められる。本研究においては、事前に濃度を決定した 62A 株芽胞液の段階希釈液を 10²~10^{-0.5} cfu/g となるように 1.0% Agar に混釈し、非接種 1.0% Agar とともにボツリヌス菌接種疑似食品とした。各希釈段階について5~10回の繰り返し試験を実施し、希釈段階ごとの陽性試験数を記録した結果、非接種試料では検出率 0% となり、また、高濃度接種試料では検出率 100%、中濃度接種試料では検出率 14~55% の範囲に収まり、LOD₅₀ 算出に妥当な試験結果が得られたことが確認された。試験結果については ISO 16140-2:2016 にて提供されるスプレッドシートを利用することで LOD₅₀ 算出を行い、技能試験評価のための基準値として使用可能な LOD₅₀ 値を得た。

本研究では、ボツリヌス菌標準試験法に対する技能試験実施に必須である標準試験品の作製方法と技能試験評価のための基準値の算出を行った。本研究の成果として得られた標準試験品作製プロトコールおよび LOD₅₀ 値については、今後、ボツリヌス菌標準試験法を利用しようとするユーザーに広く提供する計画となっている。本研究で得られた成果はボツリヌス菌の様な法的制限により取り扱いが困難な菌種に対する技能試験実施方法のモデルケースとなるものであり、本邦の食品衛生行政の国際化対応に寄与する成果であると考えている。

<参考資料>

ボツリヌス毒素遺伝子試験法 (定性法) NIHSJ-20TS, 食品からの微生物標準試験法検討委員会, <http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/protocol.html>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 YAMASAKI Eiki, FUKUMOTO Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Prevalence of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in Yezo sika deer (<i>Cervus nippon yesoensis</i>) in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okumura Kayo, Kaido Masako, Yamasaki Eiki, Akai Yasumasa, Kurazono Hisao, Yamamoto Shingo	4. 巻 9
2. 論文標題 Genomic Sequences of Uropathogenic Escherichia coli Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00199~e00120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00199-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Eiki, Matsuzawa Shigeru, Takeuchi Kaoru, Morimoto Yo, Ikeda Tetsuya, Okumura Kayo, Kurazono Hisao	4. 巻 18
2. 論文標題 Rapid Serotyping of Salmonella Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a Salmonella-Specific Gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 31~40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/fpd.2020.2823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	茅野 光範 (Kayano Mitsunori) (20590095)	帯広畜産大学・畜産学部・准教授 (10105)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	奥村 香世 (Okumura Kayo) (70415561)	国立感染症研究所・安全実験管理部・主任研究官 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関