

201234009B

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

食品中の有害衛生微生物を対象とした
ライブラリーシステム等の構築

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成25（2013）年3月

目次

I. 総括研究報告	
食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築.....	3
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
II. 分担研究報告	
1. 腸炎ビブリオのストレス抵抗性の解析およびタイピング法の比較研究.....	23
熊谷 進 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)	
2. 病原性大腸菌の病原性マーカーの検索、食中毒原因食品からの 原因菌確保手法の確立.....	55
工藤由起子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
3. 細菌の分子疫学に関する基礎研究.....	63
泉谷 秀昌 (国立感染症研究所 細菌第一部)	
4. 国内動物由来カンピロバクター・ジェジュニのヒト食中毒への 関連性に関する研究.....	71
朝倉 宏 (国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部)	
5. 生食用の国内と畜馬肉および輸入馬肉における ザルコシスティス汚染実態調査.....	83
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部部長)	
6. 真菌リスクプロファイルの作成および新規真菌分類法の確立.....	89
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
7. 地研のネットワーク構築に関する研究.....	113
林 賢一 (滋賀県衛生科学センター)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	127

I. 総括研究報告

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)

食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築
主任研究報告書

主任研究者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

要旨

本研究は、食品流通が多様化・広域化している現状において、食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するため、公衆衛生上重要視されている食品中の有害衛生微生物に関する科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関（国立医薬品食品衛生研究所および国立感染症研究所）と地方衛生研究所（地研）等の食品安全関係機関の間で、効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することを目的とした。

本研究では1) 食品中から分離される食中毒細菌の汚染実態情報、菌株の PFGE 解析等による分子疫学情報、病原性マーカー等の関連性を総合的に解析する手法の開発2) 消費者等から寄せられた食品中のカビ等に関する苦情について、地研が蓄積している情報を解析、リスクプロファイルの作成3) 近年原因不明食中毒の原因物質の一つとされた馬肉中のザルコシスティスの検査法の開発と実態調査4) 1)～3)の情報を集約した効率的なライブラリーシステムを構築するための国立試験研究機関と地研等間での連携モデルの構築の4つの課題を中心に進めた。

まず、食品中から分離される食中毒細菌に関する課題においては腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* の日本国内および国外における分布状況ならびにその特徴について、酸・低浸透圧・凍結・熱に対するストレス抵抗性を調べ、ストレス抵抗性との関連が考えられた遺伝子 (oppAB, EscC, YscO, EnvZ, murQ, fadB, cspA, cadA, mglc) を設定し、その保有状況を調べた。MALDI-TOF/MS 解析等とパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を比較し新しいタイピング手法について検討した。その結果ストレス抵抗性に関しては、環境中において低水温下でも生存できるような株や病原性保有株（特に患者由来株）が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示され、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカーとして検討できる方向性が示された。タイピング法の検討では PFGE 解析単体では比較ができないことが明らかとなったが、株を選別して実施した MALDI-TOF/MS 解析においては、腸炎ビブリオとビブリオ・アルギノリチカスの区別ができ、血清型の同定に有用と考えられるピークが確認された。バイオフェノタイプマイクロアレイ解析においては、酸ストレス抵抗性メカニズムに関わると考えられるアミノ酸を明らかにした。結果、酸抵抗性メカニズムに関連すると考えられるアミノ酸が複数見つかると、これらへの反応の違いによって環境由来株と臨床由来株で異なるクラスターが形成される傾向が認められた。このことから由来の違いによって酸抵抗性メカニズムが異なる可能性が示唆された。腸管出血性大腸菌では、多様な血清群が存在する腸管出血性大腸菌において、高病原性の指標となる要因を解明するとともに、血清群による高病原性について明らかにするために、多数の株を用いて各種病原因子の遺伝子を検出し、その保有性を集

団遺伝学的に解析した。その結果、病原性遺伝子の保有パターンと疫学情報をもとに判定した病原性の強さにより血清型を分類した seropathotype との間に相関が見られ、病原性の有無は病原遺伝子の有無によって決定づけられていることが示唆された。特に eae, espB, tir はヒトに対する病原性の高い seropathotype において高頻度に検出され、高病原性の株を検出する指標として有用であることが示された。カンピロバクターでは、2005-2006 年の間に国内のニワトリ及びウシより分離された *Campylobacter jejuni* 計 112 株について、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法による遺伝子型別を行い、国内ヒト臨床分離株 100 株との比較を通じて、ヒト食中毒との関連性について検討をおこなった。その結果国内ヒト食中毒に関連性を示す *C. jejuni* は遺伝形質に一定の宿主特異性を示すことが明らかとなり、その中でも由来の明確な一群を見出すことができた。本手法はカンピロバクター食中毒事例における原因究明の一助として有効である。サルモネラでは、O 群型別に関する手法の検討、標準法であるパルスフィールドゲル電気泳動法による多様な血清型に関するライブラリーの作成、病原因子パネルの検討および作成を行った。ライブラリーからクラスター解析を行ったところ、血清型ごとにクラスターを形成し、本法によっても血清型の推定に寄与しうることが示唆された。病原因子パネルの検討から、いくつかの血清型については特異的クラスターを形成することが示唆された。サルモネラにおける菌株解析では、血清型を決定することが重要なステップであるため、本手法は抗血清による凝集試験をサポートする遺伝学的な解析法となる。

真菌においては、国立試験研究機関と地方衛生研究所などで食の安全に危害を及ぼすカビのリスクプロファイルネットワークシステムを介して共有することで構築する基礎的研究を行った。食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築では、リファレンスセンターおよび地拠点機関を設定し、ネットワークを形成し、有害カビに関するリスクプロファイル集を作成し、厚労省食中毒調査支援システム (NESFD) 上に公開した。遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究では *Fusarium* 属菌を始めとするヒトに健康被害を与える真菌の同定・カビ毒産生能推定において新規の手法を開発した。黒コウジカビのカビ毒産生能の検討では、今回検討した全ての醸造用株ではいずれのカビ毒産生性も認められなかったが、非醸造用株である *A. niger* 分離株では、株によりフモニシン B2 およびオクラトキシン A の産生性が認められることを見出した。

新規食中毒原因寄生虫であるザルコシスティスに関する研究では、まず食中毒残品より検出されたザルコシスティス (形態的に *S.fayeri* と同定された) を材料に、18SrDNA を部分増幅 (約 1,100bp) し、そのシークエンスについて BLAST 検索を行った。PCR 系は国内 3 ヶ所の地方衛生研究所の協力で実証試験 validation を行い、その性能を確認した。国内で生食用にと畜処理された馬肉および国外からの生食用輸入馬肉について、*S. fayeri* 特異的定量 PCR を行った結果、国内と畜馬肉では汚染は限局的と考えられた。輸入馬肉においては検体である馬肉の部分により汚染の偏りがあることが示された。また生食用メキシコ産馬肉、またペットフード用メキシコ産馬肉で高い汚染がある場合が認められた。

国立試験研究機関と地方衛生研究所との連携ネットワークは、本研究班で解析対象とするサルモネラ、腸管出血性大腸菌および腸炎ビブリオの菌株収集拠点となる地方衛生研究所を選定した。全国の地研におけるサルモネラおよび腸管出血性大腸菌の収去等の調査研究の状況について調べた結果、各地で行われているサルモネラおよび腸管出血性大腸菌に関する調査研究は、主にヒト由来菌株の解析で、食品の汚染状況やその由来株に関する調査研究は少ないことが判明し、食中毒予防に支障をきたす可能性があることが示唆された。そのため、食品中の食中毒菌汚染調査結果を有効的に活用するた

めのデータベースの作成を目的として、5 機関の地研で、市販の国産鶏肉（非冷凍）を対象に各機関でサルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌およびウェルシュ菌の汚染実態を調査した。鶏肉 100 検体中からの検出率はサルモネラ 54%、カンピロバクター71%、ウェルシュ菌 37%および黄色ブドウ球菌 47%で、いずれも高い検出率であった。これらの成果により、今後地研の拠点が中心となり、全国的な食品中の食中毒菌汚染調査およびその病原性マーカーの調査を行い、その情報を国立試験研究機関に集約し解析したのち、NESFD 等を通じて情報を公開し、原因食品不明食中毒の発生時等に有効に情報が生かせるライブラリーが構築出来る可能性が示された。

研究分担者

熊谷 進（東京大学大学院）

工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所）

野崎 智義（国立感染症研究所）

泉谷 秀昌（国立感染症研究所）

林 賢一（滋賀県衛生科学センター）

朝倉 宏（国立医薬品食品衛生研究所）

齊藤志保子（秋田県健康環境センター）

堀川 和美（福岡県保健環境研究所）

黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）

李 謙一（東京大学大学院）

渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）

高橋 治男（国立医薬品食品衛生研究所）

陰地 義樹（奈良県保健環境研究センター）

浅野 勝佳（奈良県保健環境研究センター）

橋本ルイ子（千葉県衛生研究所）

久米田裕子（大阪府公衆衛生研究所）

川本 恵子（帯広畜産大学）

島 圭介（株島津製作所）

石川 和彦（滋賀県衛生科学センター）

安田 奈央（滋賀県衛生科学センター）

福島 敬介（滋賀県衛生科学センター）

向井 晃一（滋賀県衛生科学センター）

青木 佳代（滋賀県衛生科学センター）

梅原 成子（滋賀県衛生科学センター）

河野 智美（滋賀県衛生科学センター）

井上 剛彦（滋賀県衛生科学センター）

千葉真知子（秋田県健康環境センター）

和田恵理子（秋田県健康環境センター）

八柳 潤（秋田県健康環境センター）

熊谷 優子（秋田県健康環境センター）

高橋 志保（秋田県健康環境センター）

今野 貴之（秋田県健康環境センター）

村上 光一（福岡県保健環境研究所）

研究協力者

長谷川朗生（東京大学大学院）

加藤 行男（麻布大学）

岡谷友三アレシヤンドレ（麻布大学）

三輪 憲永（東海大学短期大学）

森田 幸雄（東京家政大学）

古茂田恵美子（東京家政大学）

八木田健司（国立感染症研究所）

寺嶋 淳（国立感染症研究所）

黒田 誠（国立感染症研究所）

関塚 剛（国立感染症研究所）

五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所）

小林 直樹（国立医薬品食品衛生研究所）

長尾 清香（国立医薬品食品衛生研究所）

江藤 良樹 (福岡県保健環境研究所)
市原 祥子 (福岡県保健環境研究所)
濱崎 光宏 (福岡県保健環境研究所)
大石 明 (福岡県保健環境研究所)
前田詠里子 (福岡県保健環境研究所)
相川 勝弘 (神奈川県衛生研究所)
渡辺 祐子 (神奈川県衛生研究所)
古川 一郎 (神奈川県衛生研究所)
石原ともえ (神奈川県衛生研究所)
小林 昭彦 (さいたま市健康科学研究センター)
白石 理奈 (さいたま市健康科学研究センター)
加藤 直樹 (さいたま市健康科学研究センター)
小田切正昭 (さいたま市健康科学研究センター)

A. 研究目的

近年、食品流通方式の発展がめざましく、それに伴って食中毒の発生も広域化しやすい傾向にある。また、輸入食品等の増加などに伴って食中毒原因物質も多様化してきており、従来の自治体主体の食中毒監視システムだけでは対応しきれない事例も存在してきている。また、食品貯蔵中も含めてカビ等の混入に関する苦情は、各自治体の食品安全担当部等に日常的に寄せられるが、その専門知識がある担当官は少なく対応に苦慮している。近年、新規の寄生虫性食中毒が報告されていることから、我が国においても未然防止のための対策を整備する必要がある。

このような背景にあつて、我が国の食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、公衆衛生上重要視されている食品中の食中毒細菌、カビおよび寄生虫を対象に、科学的解析情報を集約し、国立試験研究機関と地方衛生研究所等の食品安全関係機関が連携して、効率的かつ効果的に共有するためのシステムを構築することは急務である。

本研究では 1) 食品中から分離される食中毒細菌

(腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター、腸炎ビブリオ等) 2) 消費者等から寄せられた苦情における食品中のカビ等 3) 輸入食品を含む食品中の寄生虫を対象に、市販食品を対象とした実態調査、検査法の確立・普及、分子学的な解析手法の確立、菌株ライブラリーの構築、リスクプロファイルの作成等を行う。これらの成果として得られた情報は、国立試験研究機関において集約され、NESFD を通じて地研等との間で共有を可能とする効率的なライブラリーシステムを構築する。

国内外では、主要な食中毒細菌に関しては食中毒患者から分離された菌株を対象として分子疫学情報システムは構築されつつあるが、食品から分離された菌株を対象としたシステムは例がない。また、食品中の有害衛生微生物に関する体系的ライブラリーシステムの構築及び地研等との連携モデルの構築は、国内外でも初めての試みである。

これらのシステムは、いま行われている各自治体における食品収去試験等での食中毒菌検出よりもアクティブに食品中の食中毒菌に関する情報を集約し、食中毒予防はもちろん、原因食品不明の食中毒事例の対応にも活用されるものである。

B. 研究方法

I. 腸炎ビブリオ

1. 菌体収集および PCR

菌体収集は、環境食品由来および臨床由来の腸炎ビブリオの菌株として計 200 株およびビブリオ・アルギノリティカス 1 株を使用した。*toxR*, *VA*, *tdh*, *trh* 遺伝子を標的とした PCR 法を行った。

2. ストレス抵抗性の評価

ストレスとして、酸・低浸透圧・凍結・熱ストレスを設定した。曝露時間は酸、浸透圧ストレス

では 8 時間、熱ストレスでは 30 分と設定した。ストレス曝露後の抵抗性の評価にあたっては、分離された海域の海水温の差、*tdh* あるいは *trh* の保有状況、病原性保有株について由来の違いについてそれぞれ 1. で得られた結果の差の有意差検定 (Student の t 検定) を行った。また、ストレス抵抗性が由来や採取場所によってどの程度異なってくるかを探る目的でクラスター解析を行った。クラスター解析を行うにあたっては、統計解析ソフトウェア R (R project) の *hlust* 関数を使用した。

3. PFGE 解析

使用菌株として腸炎ビブリオ 135 株とビブリオ・アルギノリティカス 1 株を選別した。条件として通常培養、継代繰り返し、低温下 2 ヶ月培養、薬耐性付与、貧栄養培養を設定した。

4. MALDI-TOF/MS 解析

供試菌株として腸炎ビブリオ 20 株およびビブリオ・アルギノリティカス 1 株を用いた。AXIMA 微生物同定システム (島津製作所) を使用し、マトリックスとして 20 mg/ml CHCA を使用した。測定条件としてレーザー光源: N2 封入型レーザー m 検出イオン: 正イオン、飛行モード: リニアモード、加速電圧: +20kV を設定した。

5. バイオフィェノタイプマイクロアレイ解析

供試菌株として、腸炎ビブリオ 48 株を使用した。解析にあたっては、酸抵抗性メカニズムの菌株間の相違を検索するために、統計解析ソフトウェア R (R project) の *heatmap.2* 関数を使用した。

II. 腸管出血性大腸菌

1. 供試菌株とゲノム DNA の抽出

供試菌株は、様々な検体から分離した STX 産生性大腸菌を本研究に供試した。ヒトから分離された 130 株、ウシなどの動物から分離された 135 株、食品から分離された 16 株、由来不詳の 6 株を含む 54 血清群 287 株を用いた。ゲノム DNA の抽出

は熱抽出法にて抽出した。

2. 病原遺伝子の検出

stx パリアントから 6 遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*) 染色体上に存在する病原遺伝子から 5 遺伝子 (*iha*, *espB*, *espD*, *tir*, *eae*) とプラスミド上に存在する 6 遺伝子 (*exhA*, *saa*, *espP*, *katP*, *stcE*, *subA*) を選択し、合計 17 遺伝子を PCR にて保有性の検出を行った。

3. 集団遺伝学的手法による解析

17 種の病原因子保有状況をデータ化し、3 種の集団遺伝学的手法 (1) rarefaction 解析、(2) pairwise fixation index (FST) による解析、(3) population structure 解析によって seropathotype 間および主要血清群間の遺伝子型を比較した。ただし、(1)および(2)については 128 株を供試した。

III. カンピロバクター

1. 菌株及び培地

2005-2006 年の間に国内のニワトリおよびウシより分離された *C. jejuni*、各 61 株および 51 株を供試菌株とした。DNA 抽出および PCR は DNA easy Tissue kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。MLST 解析対象となる 7 遺伝子 (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glnA*, *pgm*, *tkl*, *uncA*) をプライマーを用いて PCR 反応により増幅させ、増幅断片は脱塩・精製後、BigDye Terminator Ver.3.1 を用いた Cycle sequencing により、塩基配列を決定した。

2. MLST 解析

上記により得られた計 1,568 のアレル配列サンプルについて、定法に従いアセンブルした。PubMLST Isolate database において、ST 型ごとに分離由来履歴を収集し、ニワトリ、ウシおよびその他 (ブタ・綿山羊・環境等) に分類してそれぞれの割合を集計し由来宿主の推定確率を求めた。

3. 統計・系統解析

供試株母集団の Complexity を検証するため、

LIAN 3.5 を用いてアレル分布を、START ver. 2.2 を用いて dN/dS 比を算出した。Cluster 分類には最尤法を用いた。遺伝子型毎の系統樹作成にあたっては ClonalFrame を用いた。

4. ゲノム解析

Illumina Genome Analyzer II を用いて、ST-4526 型を示す代表株 3 株(H_0002, H_0089, P_0053)のゲノム配列を解読した。

5. DNA 取り込み試験

Nick translation kit(Roche)で標識した pRY109 DNA と共培養し、菌体中に含まれる標識物を測定した。NCTC11168 の数値を 1.0 とした場合の相対値により、菌株間の DNA 取り込み能を評価した。

IV. サルモネラ

ゲノム配列が有用な血清型 (*Enteritidis*, *Paratyphi A*, *Typhi*, *Choleraesuis*, *Newport*, *Agona*, *Typhimurium* 等) について、Genbank からゲノム配列を入手し、gnd-yegH 遺伝子間の配列を抽出した。得られたゲノム配列を Mauve ソフトウェアにて解析し、各血清型の合成遺伝子群の構造を比較した。O 群間で多様性のある gnd - galF 遺伝子領域を長鎖 PCR にて増幅した。得られた増幅産物を精製し、5 種類の制限酵素 AfeI, EcoRV, MfeI, MluI, SphI でそれぞれ消化し分離した。得られた泳動パターンを目視で比較すると共に、BioNumerics ソフトウェアに取り込み、クラスター解析を行った。PFGE 法を用いて様々な血清型のサルモネラ分離株を解析した。実施条件は、米国パルスネットの標準法に準じて行った。得られた泳動パターンを上記 BioNumerics によって解析した。Huehn ら (AEM, 2009, 75, 1011-1020.) に挙げられた病原因子等を参考に、PCR プライマーを設計し、PCR による (病原) 因子パネルの作成を試みた。

V. 真菌

1. カビリスクプロファイルの作成

各地方自治体試験研究機関 (地研) に苦情食品由来カビ検査体制のアンケートを送付し、検査体制の実態やリスクプロファイルなどやネットワーク形成について要望についての調査を行い、その結果をまとめた。ネットワークシステムのリファレンスセンターおよび地域拠点を設定し、ネットワークを構築した。カビ毒産生性、食品からの検出頻度などを考慮して 26 菌種を選定し、リスクプロファイル個票を作成した。

2. 真菌の遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究

真菌からの DNA 抽出方法の比較検討を行い、*Fusarium* 属菌に対して遺伝子塩基配列の相同性 (ホモロジー) による同定に適した遺伝子マーカーの特定を行った。さらに *Fusarium* 属菌のトリコセレン類を産生する菌種およびその近縁菌種 32 菌株について、産生性が不明な供試菌種の phylogentic relationships 解析によるマイコトキシン産生能の有無の推定を行った。これらの菌株の rDNA、クラスター領域、 β -tub および elongation factor 1 α 遺伝子塩基配列を用いて系統樹を構築した。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生能の検討

チトクローム b の遺伝子配列により正確に同定された黒コウジカビについて、醸造用株 10 菌株 (*A. awamori*, *A. inui*, *A. foetidus*, *A. kawachi*) および非醸造用株 14 菌株 (*A. foetidus*, *A. niger*) 以上の合計 24 菌株について検討した。培養液を用い、LC/MS/MS でフモニシン B1・B2 およびオクラトキシン A の分析を行った。

VI. 新規食中毒起因寄生虫の検査法の確立

1. 検体および実態調査

馬肉試料として食中毒事例残品（以下残品と略）を3検体、市販馬肉商品（以下、市販品と略）を5検体、計8検体を用いた。実態調査として国産馬は全国各地と殺場から収集した41頭の横隔膜、輸入馬肉は生食用冷蔵馬肉9検体（輸入先カナダ）を用いた。

2. 馬肉からのDNA試料の調整

肉試料からQIAamp DNA Mini Kit（キアゲン）を用いてDNAを抽出精製した。ザルコシスティスのシスト陽性対照DNAは、食中毒事例残品より分離回収し凍結保存したザルコシスティス・シストよりDNA精製キットを用いてゲノムDNAを抽出精製し、実験に供した。

3. 定性PCRおよびシーケンス解析

使用プライマーは、18S1F：5'-GGATAACCGTGGTAATTCTATG ならびに 18S11R：5'-TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG を用いた。PCR産物のシーケンス用に以下の4種のプライマー（Sarco2F：5'-cagagtaacaattg-gagggcaag-3', Sarco3F：5'-gcattcgt attaactgtcagag-3', Sarco12R：5'-ct ctgacagttaaatcgaatgc-3, Sarco13R：5'-cttcctccaattgttactctg-3'）を各種ザルコシスティスの18SrDNAシーケンスアライメントに基づき設計し、18S1Fおよび11Rとともに、定性PCR増幅産物のダイレクトシーケンシングを行った。またClustal Wを用いてアライメントを比較した。

VII. 地研とのネットワーク構築

1. 解析対象の有害衛生微生物の特定と収集拠点の決定

全国の地研から発行されている年報に記載されている報告書と厚生労働省が実施する「食品の食中毒菌汚染実態調査」の成績を参考にして、本研究の対象とする衛生有害微生物を特定し、拠点とする地研を選定した。

2. 市販鶏肉を対象とした主な食中毒菌の汚染調査

平成24年7月2日～11月30日の間に、本研究に参加している5機関の地研が、国産の凍結されていない市販鶏肉を20検体ずつ、計100検体（モモ肉49検体、ムネ肉36検体、ササミ12検体およびその他（モモ肉+ムネ肉、切り身）3検体）を購入し、調査対象とした。

3. 調査対象とした食中毒菌と検査法

調査対象とした有害衛生微生物は、サルモネラ、カンピロバクター、ウェルシュ菌および黄色ブドウ球菌とした。

サルモネラおよびカンピロバクターについては「食品の食中毒菌汚染実態調査」で用いられている方法（以下、厚生労働省法）により、黄色ブドウ球菌およびウェルシュ菌については食品衛生検査指針による方法（以下、指針法）により行った。なお、分離されたサルモネラについては血清型を、カンピロバクターについては菌種を、ウェルシュ菌についてはエンテロトキシン産生遺伝子（CPE遺伝子）を、および黄色ブドウ球菌についてはエンテロトキシン産生遺伝子（SEs遺伝子：A～E、一部についてはG～Iの遺伝子）についてPCR法によって調べた。

C. 研究結果および考察

I. 腸炎ビブリオ

1. ストレス抵抗性の評価

水温15℃以下（冬季）において採取された菌株45株と水温20℃以上（夏季）において採取された菌株18株のストレス抵抗性について比較したところ、水温15℃以下で採取された株は酸・低浸透圧ストレスに対して有意に高い抵抗性を示した（ $p<0.05$ ）。一方凍結・熱ストレスに対しては抵抗性に有意な差は認められなかった。

tdhあるいはtrhを有する菌株39株といずれも

保有しない菌株 103 株のストレス抵抗性について比較した場合、tdh あるいは trh を有する株は酸ストレスに対して高い抵抗性を示す一方、低浸透圧・凍結ストレスに対しては低い抵抗性を示した ($p < 0.05$)。しかし tdh あるいは trh 保有株については患者由来の株が環境由来株と比較して酸に対して高い抵抗性が認められた ($p < 0.05$)。クラスター解析では、大きく 6 つのクラスターに分かれ、この 6 つのクラスター間において、臨床由来株の割合が 11%~43%と大きく分かれる結果となった。本研究において、特に酸ストレス抵抗性、について差が出た結果となり、環境中において冬季でも生存できるような株や病原性保有株 (特に患者由来株) が、酸ストレスに対して特に強い傾向があることが示された。この結果を踏まえると、酸ストレス抵抗性メカニズムの解明が食中毒リスクとなる株のマーカーとして検討できる方向性が示された。

2. ストレス耐性遺伝子の存否

今回設定した 23 株においては envZ, yscO, murQ, fadB, cspA, cadA はいずれの株も保有した。一方で oppA, oppB, escC, mglc は保有に株間の差異が認められた。ストレスに弱い株であっても、ストレス耐性遺伝子を保有している株もあり、ストレス抵抗性メカニズムにおいては、様々な遺伝子が複合的に関連している可能性が示唆された。

3. PFGE 解析

系統樹は大きく 8 群に分かれ、多彩な菌が分布していることが明らかとなった。これらの群について地域やストレス耐性、採取温度との関連は認められなかったものの、それぞれの群間で tdh 保有株の割合にばらつきが認められた。類縁度による地理的分布やストレス抵抗性との関連については、バンドパターンが極めて多様となることを反映し、PFGE 解析結果との間に一定の関連が認められなかった。また、解析前の条件を変更した

株でも、同じ機関番号内では同一のクラスターに分類され、極めて安定的な解析手法である可能性が明らかとなった。ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を確かめる試験においては、いずれの株も、解析前に貧栄養培地を使用した際に異なるクラスターに分類された。ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響は認められず、それぞれ同一のクラスターに分類されることが明らかとなった。

4. MALD-TOF/MS 解析

個別の腸炎ビブリオごとにピークを並べて比較し、株間でピークの検出に差が認められた範囲を抽出した。これを再キャリブレーションした結果、 $m/z9472$ は $m/z9466$ 、 $m/z9575$ は $m/z9569$ (30S ribosomal protein S17 と考えられる) となったため、こちらの値を採用して比較した。これまで今回の解析に使用したサンプル全てをあわせてマスペクトルのクラスター分析を行った結果、PFGE クラスターと MALDI-TOF/MS 解析の結果は一定程度対応する傾向が認められ、ビブリオ・アルギノリティカスは単体で一つのクラスターを形成した。MALD-TOF/MS 解析は腸炎ビブリオにおいて Dieckmann, R.らの報告 (J. Applied Microbiol. 109:199-211) がある。本法においては、腸炎ビブリオの株を特異的に同定することができ、同種株間の違いを識別できる可能性が明らかとなった。今回用いた方法では、ビブリオ・アルギノリティカスと腸炎ビブリオは明確に別々のクラスターが形成されただけでなく、腸炎ビブリオの株毎のクラスターが細かく分かれた。

以上より、本解析法は同一種内の同定に関しては他のタイピング法と組み合わせるなど、より一層の研究が求められるものの、ストレス曝露や薬剤耐性獲得の影響を受けない、安定的な解析法である可能性が示唆された。

5. バイオフィェノタイプマイクロアレイを用いた解析

バイオフィェノタイプマイクロアレイの結果からヒートマップを作成したところ、3つのクラスターが形成された。さらにこのクラスター間での臨床由来株の占める割合を比較したところ、クラスター2において0%となり、環境食品由来株だけで形成されるクラスターが出現した。本解析においては、酸抵抗性メカニズムに関連すると考えられるアミノ酸への反応が、環境食品由来株と臨床由来株で異なることが明らかとなった。従来リシンとアルギニンに関しては、腸炎ビブリオにおいてリシン脱炭酸酵素の関与 (Tanaka, Y. 2008. J. Appl. Microbiol. 104: 1283-1293) やシュードモナス属菌やバシラス属菌で認められるアルギニンデイミナーゼを介した機構など、アミノ酸と酸抵抗性メカニズムとの関連が指摘されている。これまでの報告にない、 β -ヒドロキシ-グルタミン、オミニチン、ジアミン-ピメリン酸も酸抵抗性メカニズムに関わる新たなアミノ酸候補である可能性がある。今後はこれらのアミノ酸に関わる遺伝子の発現や、当該アミノ酸の発現と酸抵抗性の高低との関連を検索することが求められる。

II. 腸管出血性大腸菌

1. 各 seropathotype 間での病原遺伝子保有率の比較

17の標的病原遺伝子について seropathotype ごとに保有率を算出して比較した。*stx* のバリエーション6遺伝子のうち、*stx1* は seropathotype B で、*stx2* は seropathotype A で高い保有率を示した。*stx* 以外の病原遺伝子については、*eae*, *espB*, *espD*, *tir* が seropathotype A および B で高い保有率を示し、seropathotype C および D・E では低い保有率であった。本研究に供された 287 株の EHEC を seropathotype 別に分類し、病原遺伝子保有率を比較した。その結果、*stx* バリエーションの中では *stx1* が高い病原性を示す seropathotype A および B で

共に保有率が高く、高病原性に関与する可能性が示唆された。

stx 以外の遺伝子については、*eae*, *espB*, *espD*, *tir* が検出され、これらは病原性を誘起する因子と考えられた。これらの遺伝子はいずれも、病原性遺伝子座 LEE に存在する。LEE には腸管上皮細胞への初期接着に関わる約 40 の遺伝子がコードされており、これらの遺伝子の高病原性への関与が示されたことで、高病原性に細胞接着が重要であることが強く示された。

2. 集団遺伝学的手法による解析

1) Rarefaction 解析

Seropathotype 間で rarefaction 曲線を比較したところ、seropathotype A が最も遺伝的多様性が低く、次いで seropathotype B の遺伝的多様性が低かった。Seropathotype C および seropathotype D・E の遺伝的多様性はほぼ同等であり、seropathotype A および B に比べて遺伝的により多様であった。

2) Pairwise fixation index (F_{ST}) による解析

Seropathotype 間の pairwise F_{ST} は、seropathotype C および D・E 間を除いた全ての組み合わせで 0.30 以上であり、各 seropathotype 間での遺伝的分化が非常に大きいことが示された。Rarefaction 解析および pairwise F_{ST} から、STEC の遺伝的多様性は、seropathotype A で最も低く、次いで seropathotype B で低く seropathotype C および D・E では比較的高いことが示された。

3) Population structure 解析によるクラスタリング

17 病原遺伝子の保有パターンを指標にした population structure 解析結果を $K=7$ におけるクラスタリング結果をもとに考察を行った。 $K=7$ における population structure 解析結果を seropathotype ごとに並べ替えた。Seropathotype A ではすべての株においてクラスター1に属する確率が最も高くなった。seropathotype B では 38 株 (41%) はクラスター2に、49 株 (53%) はクラスター3に対す

る Q 値が最も高くなった。Seropathotype C では 7 株 (30%) はクラスター4 に、12 株 (52%) はクラスター5 に対する Q 値が最も高かった。最後に seropathotype D・E は、クラスター4, 5, 6 に属する確率が最も高くなる株が全体の 9 割を占めた。287 供試菌株は病原遺伝子の保有パターンから 7 つのクラスターに分けることができ、seropathotype A の株はすべてクラスター1 に分類され、seropathotype B の株のうち 88 株 (96%) はクラスター2 もしくは 3 に、seropathotype C および D・E の株のうち 148 株 (89%) はクラスター4, 5, 6 のいずれかに分類された。クラスター1, 2, 3 に分類される病原遺伝子保有パターンは病原性を示す可能性が高く、特にクラスター1 の保有パターンは最も強い病原性を示すと考えられた。

4) 各クラスター間での病原遺伝子保有率の比較

stx バリエントのうち、*stx1* はクラスター2 および 5 で 95%以上の高い保有率を示した。*stx2* はクラスター1 で最も高い保有率 (89%) を示し、次いでクラスター4 (73%) となった。*stx* 以外の病原遺伝子については、*aeae*, *espB*, *tir* はクラスター1, 2, 3において、*katP*はクラスター1と2で95%以上の保有率を示したが、その他のクラスターではほとんど検出されなかった。また、*stcE* はクラスター1のみで高い保有が見られた。病原性を示す可能性の高い遺伝子保有パターンであるクラスター1, 2, 3において保有率が高く、その他のクラスターにおいて保有率の低い遺伝子である *aeae*, *espB*, *tir* は病原性の発揮に強く関与する可能性がある。さらに、*stcE* はクラスター1のみで保有率が高く、特に強い病原性を付与する因子として機能している可能性が考えられた。病原遺伝子保有パターンによるクラスター分けと seropathotype の相関が示された一方で、seropathotype C または D・E に分類される株の中に、病原性を発揮する可能性の高いクラスターに

分類される株が存在した。特に、seropathotype C において、クラスター1 に属する株が存在しており、全て血清群 O165 であった。O165 は、検出頻度は高くないものの HUS などの重症患者から分離された報告が多数ある。また、seropathotype D・E に分類される株の中にクラスター2 や 3 に分類される株が存在した。含まれる血清群は O14, O16, O45, O63, O74, 119, 128, OUT であったが、これらの株は中程度の病原性を示す可能性が考えられた。これまで病原性との関与が示されていない血清群においても高い病原性を有する菌が存在する可能性が示された。これらの結果から潜在的高病原性株の可能性が指摘された。

III. カンピロバクター

1. MLST データの系統解析と食中毒関連性

本研究では、ニワトリ由来 61 株、ウシ由来 51 株の *C. jejuni* を研究対象とした。MLST 解析により、これらはヒト臨床分離株を併せて計 62 の Sequence Type(ST 型)と 19 の Clonal Complex(CC) に分類された。これらの数値はアメリカにおけるデータとほぼ一致しており (データ未載)、国内情報を勘案するにあたって、一定の有効性を指し示すデータと考えられた。ニワトリ由来 62 株は 28 の ST 型を含む 10 の CC(Clonal Complex)に分類された (うち、8 種の ST 型 (ST-4615~ST-4618, ST-4620~ST-4623) については新規遺伝子型としてデータベース上へ登録を行った。アレル情報を基に最尤法による系統解析を行ったところ、ヒト・動物由来株計 212 株より検出された、計 62 の ST 型は計 5 群 (Cluster I-5) に大別された。更に、個別塩基配列を用いた ClonalFrame 解析の併用により、Cluster I および II は更に subtype A, B に分類された。Cluster I-a には、ST-21CC を示すヒト・ニワトリ・ウシ由来株計 51 株が含まれた。Cluster I-b には、ヒトおよびニワトリ由来株のみ

が含まれた。ST-443CC に属する ST-440 はヒト・ニワトリ由来株内に共通に認められた。ST-4615 はニワトリにのみ認められた新規 ST 型であった。Cluster II-a には、ヒト (12 株)・ニワトリ (5 株)・ウシ (9 株) 各由来株が認められた。Cluster II-b には、ヒト (13 株) およびニワトリ由来株 (13 株) のみが含まれた。Cluster III には、ヒト (23 株)・ニワトリ (9 株) およびウシ (9 株) 由来株が含まれた。これらは ST-48CC および ST-22CC を中心とした計 9ST 型からなっていた。Cluster IV には、ST-2276 および ST-4612 のみが独立して分類された。これらはいずれもヒト分離株においてのみ認められた。Cluster V は、ST-42CC および ST-45CC を含む計 10 の ST 型からなっており、ヒト (15 株)・ニワトリ (11 株) およびウシ (12 株) 由来株が含まれた。カンピロバクター食中毒原因食品推定根拠として用いた各種動物由来菌株の遺伝情報は国内情報の不足により海外情報を参照せざるを得ない状況であったため、その推定値が国内の食中毒に直接的に適用できるかについては疑問が残った。そのため本研究では国内のウシおよびニワトリ由来株を解析して各動物由来株の食中毒との関連性を検討し、MLST による原因推定手法が一定の有効性を示すことを実証した。

2. 動物由来株の宿主特異性

ニワトリ分離株を構成する ST 型について個別にその分離履歴を *C. jejuni* MLST データベースを参照したところ、概してニワトリ分離履歴が高い割合を示した。ウシ分離株を構成する ST 型については、全体としてはウシ宿主に特異性が高い傾向を示したが、ST-50 や ST-257 等はニワトリに対してより高い特異性を示す傾向が認められた。これらの結果は、ニワトリ宿主に由来する菌株の一部は広く環境に拡散・分布するため、その過程でウシ等の他宿主体内に侵入・通過しうることを示

唆している。また、T-21 や ST-806、ST-61 はヒトからも多数検出される遺伝子型であり、特に ST-61 はヒト以外ではウシ・ヒツジ等反芻獣に分離が限定されることから、本遺伝子型はウシに由来するヒト食中毒の原因菌であると考えられた。このように宿主特異性を示す遺伝子型の特定を通じて、ヒトの食中毒に関わる *C. jejuni* 群集を推定し得たことは、国内食中毒事例における原因究明の一助として、本手法が一定の有効性を示すことを実証している。

3. ST-4526 の進化系統解析

ST-21CC に属する ST-4526 はヒト臨床分離株 7 株とニワトリ由来 3 株から検出された。PubMLST データベース上での分離履歴を検索したところ、同じく日本のニワトリから分離されていた一方で、海外からの報告は皆無であった。そのため、我々は本遺伝子型がどのように我が国に侵入し、流行を示すようになったかを明らかにするべく、日本、韓国、中国の 3 カ国より PubMLST データベースへ登録された ST 型について検索したところ、19 の ST 型が登録されていることが判明した。これらを、ST-21 を起源として有根進化系統樹を作成したところ、ST-4526 はその他の複数の ST 型と共に一つの Cluster を形成した。それらの多くは、上記 3 カ国でのみ報告のある遺伝子型であったことから、これらが東アジア地域で進化を遂げた可能性が示唆された。

4. ST-4526 は DNA 取り込み能を喪失した形質を有する。

NCTC11168 株 (標準株) のゲノムを参照配列として、ヒトおよびニワトリ由来 ST-4526 株、計 3 株 (H_0002, H_0089, P_0053) のゲノム配列を比較し、他株に比べて、ST-4526 型 3 株間のゲノム相同性は極めて高いことが明らかとなった。また、SNP 解析を通じて、本遺伝子型を示す 3 株はいずれも 2 型分泌装置関連遺伝子に変異を生じ

ていることが示された。実際に、DNA 取り込み能は他の ST 型株に比べて、ST-4526 型株は著しい減少を示した。以上の結果より、ST-4526 型は遺伝子変異に関わる DNA 取り込み機能を喪失したため、Clonal な流行を示したと考えられた。

IV. サルモネラ

血清型 Enteritidis, Agona, Choleraesuis の O 抗原合成遺伝子領域を Mauve で比較した結果、それぞれの O 群は O9, O4, O7 であった。この結果から増幅可能なプライマーとして gnd および galF 遺伝子内にプライマーを設計し、長鎖 PCR を試みた。最終的に KOD FX Neo を使用した際に最も増幅効率がよかった。得られた増幅産物を精製し、制限酵素 AfeI, EcoRV, MfeI, MluI, SphI でそれぞれ消化し電気泳動を行い確認した。上記 5 つの制限酵素によるバンドパターンを BioNumerics 上で組み合わせてクラスター解析を行ったところ、O 群によってグループが形成されることが明らかとなった。対象の血清群を拡大して解析した結果、5 種類の制限酵素切断パターンを組み合わせてクラスター解析を行ったところ、試験した血清群において、完全に一致するものはなく、各群を区別することが可能であることが示唆された。通常は血清を使用して O 群を決定することが定法であるが、対応できないものもあるので、本研究のような遺伝子を用いたシステムを構築して選択肢を増やしておくことは、ライブラリーに提供する方法として重要な知見となる。

PFGE 解析では研究協力者より供された約 250 株の、サルモネラ分離株について XbaI 消化による PFGE 解析を行った。供試菌株の中では血清型 Enteritidis, Infantis, Oranienburg が多く、それぞれが血清型に特異的なクラスターを形成した。(病原) 因子パネルの解析では invA など SPI に含まれる代表的な遺伝子のほか、SGI1 (Salmonella

Genomic Island-1) など耐性遺伝子群にかかわる遺伝子、プロファージ、線毛などの遺伝子も含まれた。およそ 30 血清型からなる 150 株について解析した。invA などの主要な SPI に含まれる遺伝子は全ての株に共通に保有されていた。亜種 IV に属す株では sseC などが欠けており、最も離れたグループを形成した。Enteritidis, Saintpaul など複数株試験した血清型の大半は、血清型ごとにクラスターを形成した。これらの血清型についてはより多くの菌株を試験し、典型的なグループを見出していく必要があると考えられる。S. Infantis も血清型特異的なクラスターを形成した。S. Infantis のクラスターには、irp2 遺伝子の有無によって分けられる 2 つのグループの存在が示唆された。

V. 真菌

1. 食品中の有害カビを対象にしたライブラリーシステム等構築

77 の地研を対照にアンケートを配布し、現状の問題点・要改善点が明らかとした。ネットワークシステムのリファレンスセンターを国立衛研、地域拠点を大阪府、東京都、千葉県 of 各地方衛研の真菌担当者に設定し、ネットワークを構築した。26 菌種のリスクプロファイル個票を作成した。

2. 真菌の遺伝子塩基配列解析による同定・カビ毒産生能推定に関する研究

DNA 抽出収量を比較したところ、CTAB 法とビーズ破碎の併用法では、大量の DNA 抽出が可能であることを示した。真菌からの大量かつ高品質な DNA の抽出に適した方法は、CTAB 法とビーズ破碎の併用法であることが示された。

食品由来分離株の遺伝子手法を用いて同定した結果、 β -tub および lys2 では、全ての分離株で塩基配列ホモロジーを指標とした同定が可能であった。これら 2 遺伝子領域の塩基置換速度は早

く、今回供試した近縁な菌種間の差異を識別するのに十分な塩基配列特異性が蓄積していたものと考えられた。よって、4つの遺伝子のうち、*Fusarium* 属菌の分離株同定に相当であるのは β -tub および *lys2* であることが示された。さらに *Fusarium* 属菌の分子系統樹およびマイコトキシン産生性マトリックスをもとに *phylotoxic relationships* 解析を行い、マイコトキシン産生能の有無の推定を行った。その結果、*Fusarium* 属菌の進化の歴史において、産生能の獲得・喪失が起こった頻度が最も高かったものは *TriA* で、最も頻度が低かったものは *MON* および *ZEN* であり、マイコトキシンの種類間で獲得・喪失の起こり易さに差が認められた。これらの菌種が食品を汚染した場合には注意が必要である。

3. 黒コウジカビのカビ毒産生能の検討

醸造株では、全ての菌株においてフモニシン B_2 、オクラトキシン A の産生性は認められず、いまのところ醸造株はこれらのカビ毒を産生しない安全な菌種であることが示された。一方、非醸造株では、株によりオクラトキシン A、あるいはフモニシン B_2 の産生が認められた。*A. niger* は、クエン酸やアミラーゼを含む酵素剤の製造など食品製造に広く利用され、食品工業利用株にカビ毒産生性が認められたとの海外の報告もあることから、今後、安全性の確認が重要と言える。また、条件によってマイコトキシン産生能が上昇することも明らかにした。本検討の結果から、このカビによる汚染食品、特に糖添加食品ではフモニシン汚染の可能性があり、今後注意をはらう必要があることを示唆した。

VI. 新規食中毒起因寄生虫の検査法の確立

1. ザルコシステイス属プライマーを用いた定性的 PCR および増幅産物のシーケンスと系統解析

各肉試料につき1ヶ所より DNA 試料を調整し、PCR を行い、食中毒事例残品、市販品 1 検体そして陽性対照から約 1,100bp の DNA が増幅された。一方、陰性の市販品のからの DNA 増幅は見られなかった。各検体より増幅された DNA のダイレクトシーケンスの結果、検体および陽性試料のシーケンスはいずれも一致した。他種のシーケンスの中で一致するものはなく、最も高い相同性を示したのは *S. fushiformis* の登録株で、その相同性は 91%であった。

2. 実態調査

本研究で得られた検体はほとんどが軽種馬（サラブレッド）で全 41 検体のうちの 39 検体（95.1%）を占めた。他にポニー 1 検体および重種馬である道産子 1 検体であった。軽種馬についてみると、性別は雄 57%、雌 38%、去勢 5%であった。定量 PCR による検体馬肉の *S. fayeri* 量の測定を行った結果、全体的に見ると同一検体でも 5 つの DNA 試料の間で大きな差が認められることが多く、特にその傾向はカナダからの輸入馬肉で強かった。国内と畜馬肉と輸入馬肉を比較すると、輸入馬肉で高濃度の DNA が検出とともに定量 PCR でも *S. fayeri* 量が多かった。国内と畜場で 1 検体の中の 1 試料だけが検出された。

3. 事例残品の *S. fayeri* DNA 量を基準とした調査馬肉検体の汚染度評価

食中毒の馬肉残品 2 検体について行った定量 PCR の結果より、その DNA 量は 700–4,000 コピー/ μ l と算出されており（前年度研究班報告）、この残品測定 DNA 量を基準として検体馬肉の汚染を評価した。その結果、カナダからの輸入馬肉では高い確率で、残品測定 *S. fayeri* DNA 量と同等の量が検出された。馬肉は日本の他にヨーロッパ諸国のいくつかの国であるが、生食あるいはそれに近い形で食されてきた歴史がある。その中で馬肉に感染するザルコシステイスがヒトの健康

被害を起こすという事例は、わが国の *S.fayeri* による食中毒発生が明らかになるまでひとつの報告もなかった。ゆえに *S.fayeri* による食中毒は極めてユニークな問題であると言えるものであり、発生原因の解明、そしてリスク要因の解明とリスク評価など今後の課題が多数残されている。本年度研究では、日本とカナダ以外の馬肉生産国より生産される馬肉中に *S.fayeri* を探索し、カナダ産馬肉の一部に見られる食中毒残品と同等の汚染が、メキシコ産馬肉でも見られることを明らかにした。国外の複数国（現状ではカナダとメキシコ）で食中毒リスクのある *S.fayeri* 汚染が見られる現状は、各国間で生体馬体および馬肉が牛、豚とそれらの肉と同様、活発に輸出入される貿易状況がその背景にあり、*S.fayeri* 汚染もそれに伴って移動、拡散する可能性を示すものである。日本が経験したこれまでになかった馬肉食中毒が、馬や馬肉製品の消費と流通の変化により世界の馬肉消費国でも起こりうることは、現状で想定範囲内のことと考える必要があるであろう。馬肉の安全性確保の面からは *S.fayeri* 汚染の地域特定、拡散防止は将来的な問題になると思われる。

VII. 地研とのネットワーク構築

1. 解析対象の有害衛生微生物と収集拠点の策定

地研ネットワークで対象とする食中毒菌を、サルモネラ、EHEC および腸炎ビブリオとし、それぞれの地研に収集拠点機関を置いた。さらにサルモネラ（拠点：滋賀県衛生科学センター）で保管しているサルモネラのうち 219 株を選定し、同じ研究班（国立感染症研究所、泉谷秀昌分担研究者）で解析する菌株として提供した。

2. 全国の地研における食品についてのサルモネラおよび EHEC の試験研究報告

全国の地研で行われているサルモネラに関する

報告は、ヒト由来菌株についての検討報告が多くを占めていたが、食品類からの検索成績も数件みられた。食品類についての報告では、殆どが鶏肉（内臓肉を含む）を対象として調査しており、鶏肉からは 39～78% と高率であったが、生食用鶏肉では 0～31% という報告であった。鶏肉からの分離株の中で、最も分離頻度の高かった血清型は *S.Infantis* であったが、他にも地域によって様々な血清型が分離されていた。

EHEC に関する報告については殆どが患者由来株についての分子疫学解析の報告であったが、食品類からの検索成績も 2 か所から報告されていた。EHEC が検出された食品類は牛内臓肉と牛レバーで、血清型は O157:H7, O159:H19 等であった。

3. 市販鶏肉を対象とした主な食中毒菌の汚染調査

上記の調査結果を基に、汚染が多く、血清型に流行がある鶏肉について、地研 5 機関において 100 検体から主な食中毒菌の検索を行った。

サルモネラの検出状況について血清型別も調査した結果、平成 21～23 年度に厚生労働省事業として行われた「食品の食中毒菌汚染実態調査」由来のサルモネラの血清型に、今回の調査成績を加えて、サルモネラ血清型のライブラリーモデルを作成した。カンピロバクターの検出は、*C.jejuni* が *C.coli* より優性に検出された。また、両菌種の検出検体が認められた。ウェルシュ菌の検出状況について培養方法（直接分離法あるいは増菌培養法）によって検出率が異なっていた。直接分離法あるいは増菌培養法によって分離された 91 株のウェルシュ菌について CPE 遺伝子を調べたが、すべて保有していなかった。黄色ブドウ球菌の検出状況は、増菌培養法からのみ検出された。汚染菌数は本調査では 1 g 当たりの汚染菌数が 10^2 個未満の検体が多く、最も高濃度の検体でも $6.2 \times$

10³であった。SEs 遺伝子について調べた結果、黄色ブドウ球菌陽性検体の 40.4%から分離された黄色ブドウ球菌株が SEs 遺伝子を保有していた。SEs 型では、A、C 単独型のほか A/B 型などの複数の遺伝子保有株も分離された。

食品中の有害衛生微生物を対象としたライブラリーシステム等を構築するにあたっては、国の試験研究機関と地研が連携していくことと同時に、地研間で共有可能な連携モデルを構築することが不可欠である。全国の地研では、食中毒事例や有症苦情事例において食中毒細菌の検査を行うとともに、食中毒予防の基礎資料とするため市販食品等からの有害衛生微生物についての汚染調査も行っている。したがって、地研ではこれらの食品等から分離された菌株を多数保管しており、また、血清型の推移、パルスフィールドゲル電気泳動などによる細菌学的疫学解析も行っている。本研究班でライブラリー構築のために使用する食中毒細菌として、サルモネラ、腸炎ビブリオおよび腸管出血性大腸菌とすることが決定され、それぞれの菌株収集拠点の地研として3機関の地研を選定した。全国の地方衛生研究所は、食中毒の原因究明あるいは食中毒予防の資料に活用するため、種々の有害衛生微生物の解析を行っている。しかし収去検査等での食品等からの検索成績に関する報告書は少なかった。地研間のネットワークの構築のためには、共通した目的や手法等により、調査を行うことが重要である。今回、5機関の地研が協力し、統一した検出方法を用いて市販の国産非冷凍鶏肉 100 検体を対象として、サルモネラ、カンピロバクター、ウェルシュ菌および黄色ブドウ球菌の汚染調査を行った。調査対象とした有害衛生微生物はいずれも主な食中毒菌であり、今回の調査によっても、市販の鶏肉中にはこれらの食中毒菌が高い頻度で汚染されていることが再認識された。サルモネラやカンピロ

バクターの汚染に関する成績は、厚生労働省による「食品の食中毒菌汚染実態調査」でも示されているとおり、平成 21 年度～23 年度の成績を通して、鶏肉（ミンチ肉）ではサルモネラは 48.6～55.3%、カンピロバクターは 30.1～37.7%の検出率で、対象品目中では最も検出率が高かったことが示されている。

今回の調査成績では、サルモネラは 100 検体中 54 検体（54.0%）の鶏肉からサルモネラが検出され、先の厚生労働省事業における調査成績とほぼ同様の傾向であることが伺えた。調査部位別の成績では、モモ肉、ムネ肉ササミの順で検出率が高く、それぞれの処理工程における汚染の機会を反映している可能性があると考えている。また、生産地域別に集計したところ、四国・九州地域、北海道・東北地域、近畿地域の順で検出率が高かったが、大きな差異は認められず、鶏肉への汚染は全国的であることが再確認された。

今回の試験的実態調査は、全国的な汚染を明らかにすることができ、かつ、必要に応じて病原性マーカーを検査することにより、食中毒予防の啓発並びに食中毒原因食品の絞り込みに活用できることが明らかになった。

E. 結論

本研究は我が国の食中毒予防に有用なリスク管理手法を確立するために、国立試験研究機関と地方自治体の食品衛生関係部署が連携してネットワークを構築し、地方衛生研究所が行う収去検査等の食品中の食中毒菌サーベイランス機能を、より高度化し有機的に活用することを目的としている。

食品中の食中毒菌には、ヒトへの病原性が高い株から低い株まで、様々存在する。また、自然界では病原性が低い、食品に汚染する過程で又は加工中に病原性を獲得する可能性も否定できな

い。やみくもに食品中から食中毒菌を検出したとしても、その病原性を予測するツールがないと、その情報は食中毒予測には結びつかない。そのため、本研究事業では、食品から検出される食中毒菌の病原性を的確に判断できる病原性マーカーの特定を課題として挙げた。また、自然界や他種の動物腸管内に存在する食中毒菌がどのようなストレスや系統差で病原性を獲得していくかのメカニズムも検討課題とした。この3年間の研究期間で対象とした食中毒菌は、サルモネラ、カンピロバクター、腸炎ビブリオ、病原性大腸菌の4種類であった。サルモネラにおいては、PEGE タイピング手法から血清型を推定できる方法を開発出来た。(病原) 因子パネルの解析では *invA* など SPI に含まれる代表的な遺伝子のほか、SGII (Salmonella Genomic Island-1) など耐性遺伝子群にかかわる遺伝子、プロファージ、線毛などの遺伝子も含まれた。およそ 30 血清型からなる 150 株について解析を行った。病原性大腸菌の病原性マーカーの検索から、病原性の強さに比例して新しいマーカー遺伝子の存在を明らかにした。カンピロバクターは現在細菌性食中毒菌の起因菌として最も発生率が高いが、そのオリジンとなる遺伝子型について、病原性マーカーも含めて明らかにしている。腸炎ビブリオを対象としては、同菌が病原性を有するに必要なストレスを推測した。また、MALDI-TOF/MS 解析やバイオフェノタイプマイクロアレイ解析など新しいタイピング法の検討を行い、その有効性について一定の成果を得た。食中毒菌の病原性マーカーに関する知見は、これから策定するライブラリーデータとして、重要であり、原因食品が不明である食中毒事例についてのメルクマールになると考えられる。

次に真菌であるが、地方衛生研究所で対応する苦情の中で最も多いのが食品中のカビの相談である。しかしながら、現在カビの専門家が年々減ってきており対応出来ない地方自治体も増加している。このような現状を踏まえ、食品中に汚染

するカビのリスクプロファイルを作成し、地方自治体の担当者に役立つライブラリーを策定することを目標とした。国立衛生研と3カ所の地方衛生研が連携してカビリスクファイルを作成し、NESFD に情報を開示した。この成果は NESFD を介して地方衛生研および地方自治体食品安全関連部署で閲覧でき、活発に活用されている。さらに、最近マイコトキシン産生カビの新たな発見があり、我が国の伝統的発酵食品等への汚染も検討した。現在のところ発酵食品製造に関わるカビからはマイコトキシン産生の報告はないが、条件によっては産生する恐れがあることを明らかにした。

ザルコシスティス食中毒に関しては、PCRを中心とした検査法を確立して、各地研のネットワークを用いその妥当性を検証した。この成果は平成23年8月に厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長より発出された通知法「*Sarcocystis fayeri* の検査法について(暫定版)」の科学的根拠となっている。さらに、実態調査を行い、国産馬肉では汚染が比較的少ないこと、カナダ産を代表とする輸入馬肉では食中毒事例で検出された量と同等の *S. fayeri* が検出されることがあることが示された。また、ペットフードにも汚染が見られるため、終宿主である犬を介して、我が国に生活環が根付くことが危惧された。

地研ネットワークの構築に関しては、食品中の食中毒菌を対象としたサーベイランスが各自治体でどのように行われているのかを調査し、食中毒対応を通じて、国立試験研究機関との連携になにが必要であるかを、5カ所の地研代表者と検討した。その結果、全国各自治体の食品中の食中毒菌を対象としたサーベイランス体制には温度差があること、情報の公開には見解の違い等があることが問題点としてあげられたことから、まず主要食中毒菌の種類別に4カ所の地研を拠点として設定することとした。そしてこれらの拠点を中心にサーベ

イランスを行い、その結果を国立衛生研で集約する試行を行った。将来的には自治体のサーベイランス結果を広げていき、国立試験研究機関で集約し、血清型や病原性マーカー等の高度的情報を解析したのちNESFDを介して地研に還元するネットワークを構築していく。

F. 研究業績

【論文】

- 1) Watanabe, M., Lee, K., Goto, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. *Journal of Food Protection*. 73, 1077-1084, 2010.
- 2) Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Kumagai, S. Survival of Salmonella strains differing in their biofilm-formation capability upon exposure to hydrochloric and acetic acid and to high salt. *J. Vet. Med Sci.* in press.
- 3) Lee, K.I., French, N.P., Hara-Kudo, Y., Iyoda, S., Kobayashi, H., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Multivariate Analyses Revealed Distinctive Features Differentiating Human and Cattle Isolates of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in Japan. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 49, 1495–1500, 2011.
- 4) Asakura, H., Kawamoto, K., Okada, Y., Kasuga, F., Makino, S., Yamamoto, S., Igimi, S. Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. *Infect Genet Evol.* 12(1), 94-101, 2012.
- 5) Lee, K.I, French, N.P., Jones, G., Hara-Kudo, Y., Iyoda, S., Kobayashi, H. Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Variation in stress-resistance patterns among stx genotypes and genetic lineages in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3361-3368, 2012.
- 6) Hara-Kudo, Y., Saito, S., Ohtsuka, K., Yamasaki, S., Yahiro, S., Nishio, T., Iwade, Y., Otomo, Y., Konuma, H., Tanaka, H., Nakagawa, H., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Characteristics of a sharp decrease in *Vibrio parahaemolyticus* infections and seafood contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 95-101, 2012.
- 7) Izumiya, H., Terajima J., Yamamoto, S., Ohnishi, M., Watanabe, H., Kai, A., Kurazono, T., Taguchi, M., Asai, T., Akiba, M., Matsumoto, Y. Tamura, Y. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg. Infect. Dis.* in press.
- 8) Watanabe, M., Yonezawa, T., Sugita-Konishi, Y., Kamata, Y. Utility of the phylotoxigenic relationships among trichothecene-producing *Fusarium* species for predicting their mycotoxin producing potential. *Food additives and contaminants.* in press.

【学会発表】

- 1) Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. Stress tolerance of environmental isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Vibrio* 2011. Santiago, Spain, 2011.11.
- 2) 朝倉宏、江川智哉、関塚剛、黒田誠、五十君静信. *Campylobacter jejuni* 国内分離株の遺伝学的多様性解析. 第4回日本カンピロバクター研究会総会. (2011. 12.)
- 3) Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., Hara-Kudo Y.