

201234039A

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

国内侵入のおそれがある
生物学的ハザードのリスクに関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書
(H24-食品-一般-007)

研究代表者 近藤一成

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究	-----	1
近藤一成		
II. 分担研究報告		
1. サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析	-----	19
泉谷秀昌 国立感染症研究所		
[資料] 表 1, 図 1, 図 2		
2. 各国におけるリステリア症発生状況及び <i>Listeria monocytogenes</i>	-----	23
による食品汚染実態に関する研究		
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所		
[資料] 表 1, 表 2, 図 1, 別添 1		
3. 微生物・ウイルス関係の食品安全情報の収集解析に関する研究	-----	41
豊福 肇 国立保健医療科学院		
[資料] 表 1, 表 2, 別紙 1, 別添		
4. フグ類と巻貝類のフグ毒中毒	-----	59
長島裕二 東京海洋大学大学院		
[資料] 表 1, 図 1		
5. パリトキシン (PTX) 様毒に関するリスク情報の集積	-----	65
荒川 修 長崎大学大学院		
[資料] 図 1~5		
6. 植物毒の毒性評価と毒成分分析	-----	73
紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所		
7. 食中毒事例が多いキノコの分子系統樹解析と迅速同定法開発	-----	77
近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所		
[資料] 図 1~8		
8. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析	-----	87
登田美桜 国立医薬品食品衛生研究所		
[資料] 表 1, 表 2		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	105
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	108

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）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」

総括研究報告書

研究代表者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

食品に混入する生物学的ハザードの中で、細菌と自然毒由来成分についてリスクに関する調査研究を行った。調査研究は、以下の大きく3項目に分けて分担した。

1) 細菌のリスクに関する調査研究

水系細菌感染症であるサルモネラ症、赤痢、コレラなどは国内外でさまざまな汚染ルートを紹介して多くの患者を発生させており、公衆衛生上対策が必要な重要な感染症である。これら細菌感染症を対象に、海外の流行情報を収集するとともに、国内侵入防止のために分離菌株の解析手法の検討を行った。サルモネラは、国内外で多くの食中毒を起こしており、欧米では国際的な流行に発展することもある。本年度ではインドから輸入されたマグロが原因で食中毒が発生した。また、細菌性赤痢は途上国を中心に発生しており、わが国では海外渡航者による輸入例が多い。本年度はトルコツアーによる発生した集団事例について解析した。また、汚染食品の摂取により人に媒介されるリステリア症は、グラム陽性短桿菌である *Listeria monocytogenes* (リステリア) を原因とする。本菌は自然界に広く分布しており、動物の腸管内、河川水、土壌等から分離されるため、農産物の一次汚染を防止することは困難である。また、低温や高食塩濃度等への抵抗性が強く、食品製造環境における汚染の排除が難しいことが知られている。そのため、生ハム・サラミ等の非加熱食肉製品やナチュラルチーズ等の輸入食品や、水産加工品等の国内産食品からは一定の割合で本菌の検出が報告されている。リステリア症の集団感染事例は、日本国内ではほとんど見られていないが、欧米諸国では頻繁に起こり、非加熱食肉製品、乳製品、サラダ類などがその原因食品として知られている。一方日本国内で発生しているリステリア症はその大半が散发例であり、潜伏期間が長期にわたるため、その原因食品が同定されず、ほとんどの症例が原因不明となっている。現在国内では、腸管出血性大腸菌症や赤痢等において、集団事例の同定や原因食品特定のための分子疫学的解析が実施されて、国際的にも同様の手法が米国 CDC を中心に行われている。そこで、今回海外から食品を通じて国内に侵入しうる感染症の一つとしてリステリア症に着目し、CDC で用いられている手法に基づくプロトコールを作成して輸入食品、国内産食品及び患者由来菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析を実施した。その結果、得られたクラスターが血清型との相関が高いことが示された一方で、同一検体由来の複数の菌株においても識別が可能であり、株の同一性を高感度に示せることが明らかとなった。

生物学的ハザードのリスクの事例研究として、2012年から2013年2月に INFOSAN Emergency から緊急情報が提供された4事例について、疫学、微生物学的情報を調査し、国内侵入を水際で阻止できるか、また国内侵入後の対策の課題等について事例研究を行ったが、4事例とも水際の侵入防止は事前情報なしでは困難と考えられ、侵入後のリスクを最小に

とどめるための課題が明らかになった。既存のリスク評価モデルである「Risk Ranger」を用い、国内に侵入する可能性のあるハザードと食品の組み合わせについて、相対リスクを推定することによるリスクランキングを行い、水際対策の優先順位決定に役立てることができると考えられた。

2) フグ・巻貝類のリスクに関する調査研究

自然毒食中毒事例の第一位を占めるフグとフグ毒を含有する巻貝類のリスクを研究するために、海外におけるフグおよび巻貝類中毒事例を調査した結果、フグ毒は世界中で発生すること、中国ではムシロガイ科の巻貝の毒性が夏季に上昇することが報告されていた。また、フグ毒テトロドトキシン (TTX) の蓄積能を検討するため、トラフグとハコフグの肝組織を用いて TTX 含有緩衝液中 8 時間 *in vitro* で培養したところ、TTX 蓄積能に違いがみられ、経時的に TTX 量が増加するトラフグ肝組織に対して、ハコフグ肝組織では TTX 量増加は認められず、ハコフグ肝臓は TTX を蓄積しないか蓄積しにくいことが示唆された。

一方、ハコフグ中毒原因物質として考えられているパリトキシン (PTX) 様毒について調査研究するために、共通の横紋筋融解症を発症するハフ病と比較検討しながら解明を試みた。中国ハフ病の現地調査を実施するとともに、横紋筋融解症研究のために培養筋細胞の樹立を試み、PTX 作用を検討した。2010 年の 8 から 9 月に中国江蘇省南京市を中心に発生したザリガニの喫食によるハフ病について、同省の人民医院、淡水水産研究所、水産卸売市場などを訪問して聞き取り調査を行った結果、中国、特に江蘇省周辺では、ザリガニは一般に広く消費されているが、今回のような中毒例はごく希で、原因食品ザリガニの毒化は養殖用飼料に混入した毒物質に起因するものと推察された。一方、ラット大腿部骨格筋から結合組織を除去後、酵素処理・破砕したものにつき、上皮細胞増殖因子、インスリン様増殖因子などを添加した DF5 (5% のウシ胎児血清を含む DMEM/F-12 培養液) 中で培養することにより、筋芽細胞、線維芽細胞、および筋管が混在する初代培養細胞を樹立できた。細胞を PTX (10 ng/ml) に曝露したところ、経時的な変形、萎縮、融解、細胞死が観察された。今後、さらに検討を行い、横紋筋融解症を直接的評価可能なアッセイ系の確立や PTX 様毒の作用機序解明が可能であると考えられた。

3) 植物性自然毒のリスクに関する調査研究

植物性自然毒 (植物毒およびきのこ毒) が原因で起きる食中毒被害低減のために、植物毒では 2012 年 4 月北海道函館市において発生したトリカブトによる食中毒について現地調査を行い、事故の詳細の調査、原因植物の入手、有毒成分の定量分析等を行った。きのこ毒では形態学的に判別が難しいクサウラベニタケについて、国内より広くサンプリングし、食用のウラベニホテイシメジとともにリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列を解析した。この結果をもとに、分子系統解析を行った。分子系統樹解析結果をもとに、数時間で判別・同定可能な PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 開発し、食毒の判別やクサウラベニタケ近縁種の判別が容易に行うことが可能になった。また、植物及びきのこを対象にした情報収集として、欧州各国や豪州及びニュージーランドにおいて食品及びフードサプリメントへの使用が懸念あるいは混入が禁止されている高等植物及びきのこのリストを基に、今後の我が国の輸入食品監視において優先的に注意を向けるべき高等植物及びきのこ類を特定した。

研究分担者

泉谷秀昌	国立感染症研究所 室長
岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官
長島裕二	東京海洋大学大学院海洋科学系 食品生産科学部門 教授
荒川 修	長崎大学大学院水産・環境科学 総合研究科 教授
豊福 肇	山口大学共同獣医学部病態制御 学講座 教授
紺野勝弘	富山大学和漢医薬学総合研究所 客員教授
登田美桜	国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

A. 研究目的

細菌のリスクに関する研究

(1) 細菌性食中毒の上位を占めるサルモネラは、2,500 種以上の血清型から成り、海外でも多様な原因食品を介して多くの食中毒が発生している。特に、サーベイランス体制が確立されている欧米からの報告が多い。また、細菌性赤痢は赤痢菌に汚染された食品や水を介して感染する。国内の患者発生数は年間 100 名前後でほとんどが散発事例であるが、近年海外で発生した集団事例の中には国外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。細菌性赤痢は主として途上国で発生しており、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは重要な工程である。このような現状から、本研究では、海外で発生した食中毒の情報収集とともに、分離菌株の解析を通じて国内外の流行菌型を特徴づけ、そのデータベースの構築を行う。前者についてはサルモネラを、後者については赤痢菌を主な対象とする。

(2) 発症時致死率の高いリステリア症原因菌リステリア (*Listeria monocytogenes*) は低温、高塩濃度でも生育できるなど環境に強いことから、食品汚染を制御することは困難である。

2008 年カナダでのローストビーフ、2012 年アメリカでのカンタロープメロンを原因食品とする集団事例が発生している。わが国では、集団事例は報告されておらず、2001 年にナチュラルチーズを原因食品とする 1 例がある。潜伏機関が長いことからこれまで汚染食品が特定されることはなかった。これまでの国内流通食品の実態調査から、非加熱食肉製品から一定割合でリステリア菌が検出されていること、輸入非加熱食肉製品での検査も一部にとどまっている。そこで、本研究ではリステリア症発症状況等情報収集に努めるとともに、国内外のリステリア菌株分子型別データを収集、蓄積することにより、国内発生事例の原因食品同定に役立つことを目的として、研究室保有の輸入食品、国内産食品及び患者由来株を用いた *L. monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による解析を実施した。

(3) 国内に侵入する恐れのある致死性の高い細菌・ウイルスの検査、監視対策、リスク管理に役立つ情報に役立つため情報収集及び分析法開発を行うことを目的とした。特に、世界保健機関 (WHO) と世界農業機構 (FAO) が行っている INFOSAN : 国際食品安全当局ネットワーク (The International Food Safety Authorities Network) において、国際的な緊急 (alert) 情報が関係国に送信された事例を基に、我が国における国内侵入の可能性、侵入後の対応の課題等について検討した。

フグ・巻貝類のリスクに関する研究

フグ毒テトロドトキシン (以下 TTX と略記) は、フグ以外の動物からも検出されており、2007~2008 年に九州地方で腐肉食性のムシロガイ科 (オリレヨフバイ科) キンシバイによるフグ毒中毒が発生し、わが国では初の事例となった。キンシバイの毒性は極めて高く、筋肉部でもフグの毒性でいう“猛毒”レベルに相当する。そこで、本研究では国内侵入のおそれのある生物学的ハザードのリスク管理のために、

フグおよび巻貝類の海外食中毒事例を調査した。また、フグのリスク管理は、「フグの衛生確保について」で定められた「処理等により人の健康を損なうおそれがないと認められるフグの種類及び部位」に基づいて行われているが、元来TTXをもたない“無毒種”フグも食用可能な部位が制限されている。もし“無毒種”フグはTTXで毒化しないのであれば、今後食用の禁止や制限を見直す必要もある。そのため、研究分担者らが構築した *in vitro* 組織培養法でトラフグとハコフグの肝組織におけるTTX蓄積能を検討した。

近年、ハコフグ類の喫食により、原因物質不明の横紋筋融解症を主徴とする食中毒が発生しているが、生化学的ないし薬理的性状がパリトキシン (PTX) に類似していることからPTX様毒と考えられている。一方、2010年中国において、横紋筋融解症を主徴とする食中毒が発生した。原因食材として淡水産のザリガニが疑われており、中国当局により「ザリガニの喫食を原因とするハフ病」とされた (Zhang et al., Intern. Med. 51, 487-489, 2012)。本研究では、このハフ病とアオブダイ/ハコフグ中毒との関連解明を目指し、中国江蘇省南京市にて、発生状況や原因食品ザリガニの養殖、消費の状況などに関する現地調査を実施した。また、ハフ病の原因物質ないしPTX様毒など、横紋筋融解症誘起物質の特定、作用機序解明や高感度検出・定量法の開発を目指し、培養筋細胞の樹立を検討した。

植物性自然毒のリスクに関する研究

植物性自然毒には、トリカブトやニリンソウなどの植物毒と、クサウラベニタケやツキヨタケのようなきのこ毒がある。植物毒による食中毒は、食用のものとの誤食であることが多く、中毒被害低減のために、中毒事故の発生した現地へ赴き、関係者と接触することで現地でしか得られない情報を得、中毒発生原因を明らかにすることである。きのこ毒については、日本では夏から秋を中心に各地で多様な食用や毒き

のこが発生する。一方で、きのこは、その年の気候など生育条件により同一きのこであってもその形態は変化し、一定ではない。そのため、9-10月は、食用きのこの誤食による食中毒事例が多く報告される。注意喚起にもかかわらず、毎年一定件数の食中毒事例が報告され、根本的な食中毒低減のための施策が求められている。日本で中毒事例が多いきのこは4つ程度であるが、ツキヨタケとクサウラベニタケの上位2つが大部分を占める(8割以上)。その中でも、クサウラベニタケ(イッポンシメジ属)は、同じような大きさの食用ウラベニホテイシメジとの判別は特に専門家においても難しく、確実な判別ができない。さらに、毒きのこは、毒成分が明らかでないものや、特有の成分が知られていないこと、および標準品が存在しないことなど、分析上の問題を抱えている。

そこで、本研究では形態学的な判別が困難で、かつ近縁種が多く存在するクサウラベニタケについて、同属間での比較によく用いられる核リボソームRNAをコードする遺伝子(rDNA)のITS領域を解析し、遺伝学的に分類するために系統樹解析した。この結果をもとに、迅速に食毒判別や近縁種の判別同定が可能なPCR-RFLP法を検討したので報告する。

また、食品の多様化及び流通の拡大を受けて、海外から侵入する可能性がある自然毒ハザードに対して監視を強化する必要がある。海外で健康リスクの観点から食品への混入が懸念されている、あるいは食品への使用が禁止されている自然毒ハザード(高等植物、きのこ)についての情報を収集し、今後我が国で注意が必要と思われる自然毒ハザードの検討を行う。

B. 研究方法

細菌のリスクに関する研究

(1) 情報収集・リスク分析

論文雑誌・米国CDC、欧州CDC、国内では食品安全関係情報及び日報などから、細菌に関する情報収集を行った。また、2012~2013年にINFOSAN Emergencyから緊急情報が提供

された4事例について、疫学、微生物学的情報を調べるとともに、我が国への侵入を水際で阻止できるか、国内でこれらの食品による食中毒を検出できるか、また国内侵入後の対策の課題等について、事例研究を行った。既存のリスク評価モデルである「Risk Ranger」を用い、国内に侵入する可能性のあるハザードと食品の組み合わせについて、相対リスクを推定することによるリスクランキングを行った。

(2) 菌株情報収集・解析

菌株の収集、解析について、赤痢菌分離株に関しては、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)、もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA) を使用した。得られたデータを BioNumerics ソフトウェアに取り込み、データベースの構築、並びにクラスター解析を行った。リステリア菌 (*L. monocytogenes*) に関しては、PFGE 解析法の標準的プロトコールを作成した (分担報告書 2-別添 1)。この方法により、研究室保有株の PFGE プラグを作成し、制限酵素 *AscI* で切断後に電気泳動を行い、得られた画像は BioNumerics ソフトウェア (ver.6.1) を用いて解析した。系統樹作成には、非加重結合法 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA 法) を用い、tolerance は 0.6 に設定した。リステリア菌株は、日本国内で分離された *L. monocytogenes* 64 菌株を解析に使用した。

フグ・巻貝類のリスクに関する研究

(1) 情報収集・現地調査

フグおよび巻貝類のフグ毒食中毒事例は、PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)、SCIRUS (<http://www.scirus.com/>)、Google scholar (<http://scholar.google.co.jp/>) を用いて検索した。

また、ハコフグ中毒との関連を調べるために、破風病現地調査を行った。2012年中国江蘇省人民医院 (Jiangsu Province Hospita)、同淡水水産研究所 (Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province)、南京惠民橋水産卸売市場、迎賓菜市场を訪問し、2010年中国江蘇省南京市を中心に発生した横紋筋融解症を主徴とする食中毒、その原因食材であるザリガニについて聞き取り調査を行った。

(2) ハコフグ肝臓 TTX 蓄積能

試料にトラフグとハコフグから肝組織切片を調製した。肝組織切片を培養プレートの各ウェルに入れ、TTX を含む transport buffer 中で混合ガス (5% CO₂) をバブリングしながら、20°C で 8 時間培養した。経時的に肝組織切片を取り出し、TTX を抽出、定量した。また、実験に先立ち、養殖トラフグおよびハコフグ肝臓には TTX は検出されないことを LC-MS 分析で確認した。

(3) パリトキシン様中毒の検討のためのバイオアッセイ法の検討—培養筋細胞の樹立とそれに対する PTX の作用

SPF ラット大腿部から採取した骨格筋を、結合組織を除去後、ウシ胎児血清を含む DMEM/F-12 中で一晩冷蔵保存した。次に、筋 1~2 g 程度を Collagenase II、DNase 含有ハンス平衡緩衝液 HBSS に分取し、組織を破砕した。得られた懸濁液は、ナイロンメッシュでろ過後、遠心分離し、培地で再懸濁した。5% CO₂ インキュベーター中、3 時間培養し、上清を除去したものを初代培養細胞とした。これに上皮細胞増殖因子、インスリン様増殖因子-I および 1% ITS-X を含む培地を加えてよく攪拌し、35 mm のシャーレで 3 日間の前培養を行った。パリトキシン PTX 標準品を 10 ng/ml の濃度で添加し、筋肉細胞の形態の変化を顕微鏡下で観察した。

植物性自然毒のリスクに関する研究

(1) トリカブト中毒の調査・研究

ニリンソウと間違えてトリカブトを摂取したことによる食中毒事例について、函館保健所での調査結果や報道資料を収集した。中毒患者が採取した植物を調べるために、成分を LC/MS (ThermoFisher LTQ·Orbitrap XL) を用いて分析、定量した。また、誤認するに至った現場の植物相を検証するため、聞き取り調査で得られた情報をもとに、採取地と考えられる函館市郊外の山林の植物相を調査した。

(2) きのかきの迅速判別法の開発

国内で中毒事例が多いきのかきの中で、とくに形態学的判別が困難であるクサウラベニタケについて行った。

試料は、遺伝的なバリエーションを考慮して国内各地より採集した。誤食の原因となる食用のウラベニホテイシメジも採集した。採集したきのかきは DNeasy Plant mini kit を用いて DNA を抽出し、核リボソーム RNA 遺伝子の Internal transcribed spacer (ITS) 領域を増幅した。増幅産物を精製後、シークエンス解析を行った。ClustalW2 を用いてアライメントを行い、分子系統樹解析を行った。

使用したプライマー対

rDNA ITS 領域 (ITS) 解析用として

ITS1F:5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS4B:5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'

得られた結果をもとに、PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を行うための制限酵素を検討した。食毒判別が可能な制限酵素部位と種類を、*In silico* simulation of molecular biology experiments (<http://insilico.ehu.es>) および遺伝子解析ソフト Genetyx を用いて行った。さらに、迅速な分析法とするために、簡便な抽出法を検討した。生または乾燥したきのかきを、よ

く洗浄する。これに PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400 μ L を加え、100°C、10 min 処理し、遠心 13,000 \times g、2 min して上清を取る。これを、PCR 反応の鋳型とした。PCR 反応液 50 μ L あたり、制限酵素 10 unit を用いて、1h~3h、37°C で処理した。制限酵素処理は、次の3種を用いた。クサウラベニタケと食用のウラベニホテイシメジを区別するために *MspI*、*DdeI*、*HincII*・*HaeIII* を用いた。酵素反応後、2%アガロースゲルを用いて得移動して、その泳動パターンの違いによる判別した。

情報収集・解析として、海外で健康リスクの観点から食品への混入が懸念されている、あるいは禁止されている高等植物及びきのかきに関する情報の有無について、米国、カナダ、欧州各国、豪州、ニュージーランド等の公的機関の公表資料を中心に調査した。

C. 研究結果と考察

細菌のリスクに関する研究

・サルモネラおよびシガテラに関して

今年度を中心に最近海外で発生したサルモネラ食中毒の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例を表1(分担報告書1)にまとめた。起因菌の血清型はほぼ全て異なっていた。推定原因食品は果物・魚介類などがあつた。わが国では、ヒトから分離される血清型の多くを Enteritidis が占める(分担報告書1-図1)。また、国内のサルモネラ食中毒としては、血清型 Enteritidis と鶏卵を原因食品とする事例がよく知られているが、海外では多様な血清型-食品の組み合わせで食中毒が発生していることが窺える。殊に、2012年1-7月にかけて米国で発生したマグロ(キハダマグロ)の中落ちによる事例では、原因食品がインドから輸入されており、2つの血清型の菌に汚染されていた。マグロはわが国でも身近な食品であり、こうした事例が発生したことは注目すべきであろう。

2012年に解析した *Shigella sonnei* は97株であつた。うち、輸入例は45株で、南アジア

16 株、東南アジア 6 株であった。これらについて、MLVA による解析を行った。上記輸入例はそれぞれ、これまでに収集したデータベース上にて各地域に相応するグループに振り分けられた。2012 年夏にトルコツアーに関連した集団事例が発生した。当該事例関連の 12 株は MLVA において結果が一致し、単一の菌の暴露であることが示唆された。データベース上で類似の菌株の検索を行ったところ、2004 年にトルコ渡航者（散発例）から分離された菌株と 2 遺伝子座ちがいであることが判明した（分担報告書 1-図 2）。これまで中東地域からの輸入例は少なかったが、2004 年および 2012 年の菌株が同じグループに含まれ、本解析法の有用性が示唆された。

・リステリアに関して

1. PFGE による分子型別

国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の PFGE 解析の結果を図 1 に示した。その結果、64 菌株は 3 つのクラスターに分類された（分担報告書 2-図 1）。クラスター I には血清型 1/2b 及び 4b を中心に構成され、特に血清型 4b 株は全て同一のサブクラスター内に分類された。クラスター II は血清型 1/2a を中心とするサブクラスターと血清型 1/2c を中心とするサブクラスターに分類された。フランス産チーズ由来株（血清型 1/2a）は、他の 63 菌株とは大きく離れた独自の PFGE パターンを示した（similarity 27.0%）。3 株の患者由来株の内、1 株は生ハム由来株と高い相同性を示したが、他の 2 株については現時点で相同性の高い株は見られなかった。また、今回の解析では、フランス産チーズ以外では菌株の由来食品やその原産国でクラスターが分かれる結果にはならなかった。

2. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

平成 24 年 4 月から平成 25 年 3 月までの期間に諸外国で発生したリステリア症集団事例

は 3 例見られ、その原因食品は主にチーズであった（分担報告書 2-表 2）。

・リスク情報分析

1. INFOSAN

2012 年から 2013 年 2 月に緊急情報が提供された、病原微生物による 4 事例はサルモネラ 3 件、ノロウイルス 1 件であった（分担報告書 3-表 1）。これらの食品は我が国には輸入されていなかった。仮に我が国に輸入されていた場合、事前情報無しでは、これらの食品と微生物の組み合わせに関する微生物規格はないため、輸入時の検査を実施していないこと等から、輸入時に国内侵入を阻むことはいずれの事例でも困難と考えられた（分担報告書 3-表 2）。また、国内でのこれら食品によるリスクの上昇を検出するためには、WHO や関係国からの早期情報の入手、Salmonella 分離菌の血清型別、PFGE 解析情報の集約・解析、食品及びヒトから分離された Norovirus のシーケンス解析の実施とその情報集約・解析が重要と考えられた。

2. Risk Ranger

結果については別紙 1（分担報告書 3）のとおりであった。

今回、評価対象にした 9 つの食品—ハザードの組み合わせ中、相対リスクが一番高かったのは輸入二枚貝の Norovirus であり、逆に一番低かったのは輸入ナチュラルチーズのリステリアであった。同じ RTE で喫食直前に加熱工程が無いにもかかわらず、この差が生じたのは、食品中で少ないウイルスコピーでも感染する可能性があるノロウイルス感染症の特徴によるものと考えられた。リステリアは対象にした 4 つの RTE 食品とも相対リスクは 22 から 28 と低かった。これは問 10 で、発症に要する菌数を 10^{10} と想定していることが原因と考えられ、この数値を 10^{10} から 10^9 、 10^8 と変化させることにより、相対リスクは 24 から 30、35 とそれぞれ増加した。一方、質問 6 の汚染率を

元の 4.1%から、10%、20%と上昇させてもリスクは元の 24 から 26、28 に変化したに留まった。

輸入鶏肉のサルモネラとカンピロバクターは加工工程で加熱し、さらに喫食直前の加熱を想定した場合にはともに相対リスクは 52 であったが、これを喫食直前に加熱しないと想定した場合には相対リスクはサルモネラとカンピロバクター、それぞれ 63、69 と増加し、輸入二枚貝の *Norovirus* の相対リスクを上回った。同じサルモネラでもエビと鶏肉で相対リスクにわずかな差 (それぞれ 49、52) であったが、これは原材料の汚染率の差によるものと考えられた。

今年度は、1つのリスク評価ツールを用いてリスクランキングを行ったが、米国 FDA が公開した *i-risk* 等他のモデルも公開されているが、入力しなければならない *parameter* が増えたと、より詳細な解析は可能になるが、逆に、データがない場合には、仮定値を入力せざるを得なくなり、不確実性が増す要因になると考えられた。

INFOSAN Emergency で *Norovirus* 汚染食品の健康被害に伴う緊急情報があったこと、また *Risk Ranger* での推定により、対象食品は異なるものの、*Norovirus* が最もハイリスクとランキングされたこと、並びに欧州において、食品中の *Norovirus* 検査法が確立した場合には食品の *Norovirus* 規格設定を目指す方針があるなかで、2013 年食品中の *Norovirus* の検査法が ISO 法として ISO/TS 15216-1:2013 (定量)、ISO/TS 15216-2:2013 (定性) として承認されたことから (David Lee, Personal Communication, 2013)、今後、我が国においても、食品中の同ウイルス検査及び基準値設定の必要性、その公衆衛生上の効果、費用対効果等を検討する必要があると考えられた。

フグ・巻貝類のリスクに関する研究

・文献等調査

情報検索においてヒットした海外におけるフグ食中毒事例のうち 2000 年以降の例を表 1 (分担報告書 4) に示した。検索された件数は多くないが、フグ食中毒はアジアだけでなく、オセアニア、中東 (地中海)、南北アメリカでも発生し、世界中で発生していることが分かった。フグは毒魚として有名だが、その認識が乏しかったり、フグ自体を鑑別できないことが海外でのフグ食中毒の原因と考えられた。中毒原因のフグ種が判明しているものは少ないが、センニンフグ *Lagocephalus scleratus* がイスラエルとオーストラリアで報告されている。その他、淡水フグの *Colomesus asellus* やヨリトフグ (*Sphoeroides*) 属でも中毒を起こしている。国内へのフグの輸入は厳しく制限されているので、商業的な海外からのフグのハザード侵入は現状の体制で確保されていると考えられる。これに対し、海流など自然によるフグの国内侵入については、ドクサバフグの例があるように、今後も起こりうる可能性が危惧される。特に、温暖化あるいは環境の変化の影響のためか、日本沿岸のフグが高毒化していることも指摘されており、大型で筋肉も有毒なセンニンフグは、南太平洋、インド洋から地中海にも生息域を広げているので、日本沿岸での出現が懸念される。南方産フグの分布と毒性の実態調査が必要と考えられた。

巻貝のフグ毒中毒については、最近起こった事例が少なかったが、中国連雲港で 2007 年 5~8 月に採取されたムシロガイ科 (オリレヨフバイ科) *Nassarius* 属は高濃度のフグ毒が検出され、この時期の消費はハイリスクであると指摘されていた。

・肝組織培養法によるハコフグ肝臓の TTX 蓄積

トラフグ肝組織切片を 50 μM TTX を含む *transport buffer* で培養したところ、インキュベート 2 時間後に TTX が検出され、TTX 蓄積量 (平均値 \pm 標準偏差) は $0.33 \pm 0.12 \text{ nmol/mg protein}$ であった (分担報告書 4-図 1)。TTX

蓄積量はインキュベート時間に伴い増加し、8時間後には 1.51 ± 0.13 nmol/mg protein に達した。一方、ハコフグ肝組織切片の場合は、インキュベート 2 時間後に 0.08 ± 0.05 nmol TTX /mg protein が検出されたものの、その後 TTX 蓄積量は変化せず、4~8 時間後の値は 0.1 nmol TTX /mg protein 以下であった。

以上の結果から、TTX で毒化するトラフグは、*in vitro* 培養実験において肝組織切片の TTX 蓄積量が培養時間に伴って増加したのに対し、ハコフグ肝組織切片では顕著な TTX 蓄積量の増加はみられなかった。比較のために、一般魚のアイナメ、イシダイ、ウマヅラハキ、カワハギの肝組織切片を用いて同様の実験を行ったところ、これらの肝組織切片では、TTX の蓄積はみられなかったので、ハコフグ肝臓は一般魚と同様に TTX を蓄積する能力が低いと推測された。

・中国におけるハフ病の現地調査

江蘇省人民医院での聞き取り調査の結果、同省南京市を中心に 2010 年 8~9 月に発生したザリガニ中毒は、南京市の中国疾病予防控制中心（Centers for Disease Control and Prevention (CDC)）が事後調査を行い、中毒原因個体の種や履歴、原因物質等はいずれも不明であるとの情報が得られた。今後は中毒の発生状況や原因物質等に関する調査体制が必要との認識に基づき、その整備を急いだが、その後、同様の中毒はまったく発生していないとのことであった。一方、同省淡水水産研究所での調査では、中国に生息するザリガニは 4 種ほどが知られているが、同省で養殖されているザリガニは主に 1 種であることがわかった。餌はトウモロコシや大豆の残渣であるが、天然の個体も僅かながら市場に出回っているとの情報が得られた。今回のザリガニ中毒の原因が養殖の個体であるか否かは明確ではないとのことであった。他方、南京惠民橋水産卸売市場（築地市場の仲卸のような関連業者を対象とした市場）での調査では、ザリガニの販売は 30 軒近

いザリガニ専門の仲卸業者により、生きたままの状態で行われていることがわかった。販売されているザリガニはザリガニの養殖が最も盛んな湖南省洞庭湖で養殖されたものであった。一般的に消費者がザリガニを喫食する際には必ず加熱調理を行っているとの情報が得られた。

Zhang et al., Intern. Med. 51, 487-489, 2012 に記載された情報に基づけば、2010 年 8~9 月に発生したザリガニ中毒の症状は、本邦で発生しているアオブダイ/ハコフグ中毒と酷似しており、両中毒の原因物質は共通の生理活性をもつものと判断される。ハフ病に共通する原因食材は、中国産のザリガニを含め、これまで淡水ないし汽水産の魚介類のみであり、海産魚介類で同様の症状を示す例は本邦のアオブダイ/ハコフグ中毒のみである。フグ毒テトロドトキシンや麻痺性貝毒同様、PTX 様毒も淡水、海水の両水域に分布するのか調査を進める必要がある。今回の現地調査により、中国、特に江蘇省周辺では、ザリガニは一般に広く消費されているにもかかわらず、今回のような中毒例はごく希で、2010 年の事件以後まったく発生していない。今回の PTX 様毒中毒に関しては、原因魚への毒の蓄積は食物連鎖による外因性との見解があるが、これと同様に、偶然、養殖用飼料に有毒物質が混入し、それを摂取・蓄積した個体をヒトが食べて中毒した可能性がある。すなわち、ザリガニの毒化は餌由来であり、養殖飼料への横紋筋融解症誘起物質〔ドクニンジンやニセクロハツの毒成分(コニイン、2-シクロプロペンカルボン酸) など] の混入の可能性についても調べる必要があると考えられた。

・培養筋細胞の樹立とそれに対する PTX の作用

ラット大腿部筋肉より初代培養細胞(筋芽細胞、線維芽細胞、および筋管が混在)を樹立することができた(分担報告書 5・図 5A)。筋芽細胞と線維芽細胞は培養皿に接着して高密度

で広がっており、相互の区別は困難であった。一方、筋芽細胞由来と思われる筋管は、典型的なチューブ形状をしており、容易に識別できる。これらにPTX標準品を10 ng/mlの濃度になるよう添加したところ、筋芽細胞／線維芽細胞は次第に細胞構造が変形して丸くなり、最終的には細胞死に至った（分担報告書5-図5B～D）。他方、筋管には経時的な萎縮／融解が見られたが、形態変化の程度が比較的小さいものもあった。筋管には筋原線維様の構造が形成されている可能性が高く、このため形態への影響が出にくい場合があるものと推察された。現段階でPTXの作用機序（細胞死や筋管萎縮／融解の機構）は不明であるが、CPKの放出等を指標として当該作用の定量的評価やPTX濃度依存性などを明確にすることができれば、横紋筋融解症を直接的に評価しうるアッセイ系の確立が可能と考えられた。PTXやPTX様毒を含めて種々の横紋筋融解症誘起物質を対象に培養筋細胞への作用機序を究明することで、ハフ病やアオブダイ／ハコブグ中毒の原因物質や発症機構を解明することができると期待される。

植物性自然毒のリスクに関する研究

・植物毒トリカブトによる食中毒

1) 事故の経過

2012年4月初旬、家族3名（A: 71歳、男性、B: 42歳、男性、C: 41歳、男性）が、Bがニリンソウとして採取してきた野草をおひたしにして、夕食のおかずとして食べた。食後、1.5～2時間後から、全員食中毒症状（吐き気、倦怠感、胸のもやもやなど）を呈した。3時間後、救急車で病院へ搬送。Bは、到着時に心肺停止状態、食後約5時間後に死亡を確認。Aは、5時間後に心肺停止、翌日死亡が確認された。Cは、応急処置の後入院、数日後回復して退院した。

2) 採取植物の同定

患者の死亡に際し、病院は道警（北海道警察）へ検視依頼している。道警は、検視のため遺体

を引き取ると同時に、患者自宅への立ち入りと、残されていた野草の全量、採取者Bが使っていた山菜図鑑、携帯電話などを収集した。採取された野草は、北海道衛生研究所によりトリカブトと鑑定された。我々はこの野草を譲り受け観察したところ、すべてトリカブトで、採集したとされるニリンソウやその他の植物種は全く入っていなかった。

3) 有毒アルカロイドの定量および患者のアルカロイド摂取量

譲り受けたトリカブトについて乾燥重量1g当りのジエステルアルカロイド類の含有量を定量したところ、アコニチン0.43 mg、メサコニチンは0.55 mg、ヒパコニチンは0.04 mg、ジェサコニチン0.89 mgで、これらの和（ブシジエステルアルカロイド量）は、1.9 mgであった。この結果から推計すると、患者の摂取した総アルカロイド量は14.4 mgと考えられる。すなわち、一人当たり5 mg程度摂取したことになる。アコニチンの致死量については、およそ3-6 mgという値が知られているので、この摂取量は、致死量を十分含んでいたことになる。

4) 採取地の植物相観察

誤認するに至った現場の植物相を検証するため、聞き取り調査で得られた情報をもとに、採取地と考えられる函館市郊外の山林の植物相を調査した。トリカブトは林道基点近くの沢筋に小群落を1つ見つけたのみで、その近辺及び上流部には全く見つける事はできなかった。トリカブトのすぐ近くにはニリンソウがまばらに生えていた。ニリンソウは、林道の基点から終点まで林道沿いの林床に群生していたが、尾根筋となる林道終点以北には観察されなかった。その他、川沿いの植林された針葉樹の林床には、アキタブキ、マイヅルソウ、バイケイソウ、モミジガサ、チゴユリ、ミツバ、エゾニユウ、オニシモツケ、ドクニンジン、ウマノミツバ、広葉樹林の林床には、バイケイソウ、エ

ンレイソウ、オニシモツケ、モミジガサ、オオウバユリ、タンポポなどが観察された。

最近 20 年余の日本国内における高等植物による食中毒事例の統計調査によれば、トリカブトによる食中毒に関して、誤認した植物としてはニリンソウが最多で、ついでモミジガサが多いと報告されている（登田ら，食衛誌，2012:53, 105）。野草を採取したとされる現地の植物相調査でも、トリカブトの周辺にニリンソウ、モミジガサが生育していた。以上のことから、トリカブト中毒を未然に防止するには、まず原植物の正確な鑑定、あるいは似た植物との適切な見分けが重要である。

・クサウラベニタケの迅速判別法

クサウラベニタケとその他のきのこ ITS 領域を用いた系統樹比較

各きのこについて公共データベース (NCBI) 記載の ITS 領域を分子系統樹解析比較したところ、図 1 (分担報告書 7) に示すように、食用のウラベニホテイシメジ、クサウラベニタケ、イッポンシメジは近い関係にあることがわかる。クサウラベニタケをはじめこれらのきのこは、植物の根と共生する菌根菌であり、近縁種も多く形態学的にも多様であることから、遺伝子配列からこれらきのこの確実な判定法が確立できれば大きな意義があると考えられる。

1) クサウラベニタケの ITS 領域を用いた分子系統樹解析

プライマー対 (ITS1、ITS4) を用いて 5.8S リボソームを含む ITS1 から ITS2 の領域 (分担報告書 7-図 2) 約 1,200 bp を PCR により増幅し、ゲルより切り出し精製した。増幅産物のシーケンス解析をし、1,016 bp について clustalW でアライメントを行い、分子系統樹解析をした。また、outgroup として、*Clitocybe dealbata*、*Collybia tuberosa*、*Tricholoma matsutake*、*Rhodocybe trachyspora* を用いた。系統樹解析の結果、一部のサンプルは、データベース上のクサウラベニタケ (*E.*

rhodopolium、GenBank: AB301602.1) に一致したが、東京近郊で形態的にクサウラベニタケと判別された一部は、遺伝子配列から、同じイッポンシメジ属のイッポンシメジ (*E. sinuatum*、GenBank: GU289652.1) に分類された。さらに、一部のサンプルは、データベース上一致するきのこがない新しいグループに分類された。また、食用のウラベニホテイシメジは、データベース上のウラベニホテイシメジ (*E. sarcopum*、GenBank: AB301603.1) に一致した。以上の結果から、形態学的にクサウラベニタケと判定されたものを ITS 領域を解析したところ、クサウラベニタケ、イッポンシメジ、新たなグループの 3 つに分かれたことから、これまでクサウラベニタケと考えていたものの一部はイッポンシメジなど別のきのこであることが今回初めて分かった (分担報告書 7-図 3)。

2) PCR-RFLP 法に用いる制限酵素の選定

得られたシーケンス結果をもとに *In silico* 検索した結果、図 4 (分担報告書 7) に示したように、*MspI* は食用ウラベニホテイシメジのみ切断され、*DdeI* もウラベニホテイシメジが特異的な泳動パターンを示すとともに、3 グループに分類されたクサウラベニタケ間でも差のある泳動パターンが推定された (イッポンシメジグループのみ他と違う)。さらに、*HindIII*-*HaeIII* 2 重切断処理では、グループに分類されたクサウラベニタケ間の内で、データベース上に一致するものがないグループのみ特異的な泳動パターンを示した。したがって、これら 3 つの結果を合わせて判断すれば、食毒判別は、*MspI* と *DdeI* 両方で確認でき、かつ 3 つのクサウラベニタケ近縁種全ても判別できることと考えられた。

3) PCR-RFLP 法を用いた迅速判別法

PrepMan Ultra Reagent で抽出したきのこサンプルを、ユニバーサルプライマー対で増幅した結果、すべてのサンプルできれいに予測さ

れる大きさ約 1.2 kb の増幅断片を得た（分担報告書 7-図 5）。このことから、先のシーケンス解析に用いた DNeasy Plant mini kit のようなカラム精製をすることなく検査に使用できることが分かった。次に、この増幅断片を、各制限酵素で処理して電気泳動した結果、制限酵素に *MspI* を用いた時には、食用のウラボニホテイシメジのみ切断され、その他のクサウラベニタケとその近縁種は全く切断されなかったことから、*MspI* 処理で食毒判別が可能であることが示唆された（分担報告書 7-図 6）。さらに、*DdeI* で処理した時には、食用のウラボニホテイシメジは特異的な切断パターンを示したほか、イッポンシメジに分類されるきのこだけが他 2 つのクサウラベニタケとその近縁種と異なったパターンを示した（分担報告書 7-図 7）。また、*HincII*・*HaeIII* の同時処理では、クサウラベニタケ近縁種の中でデータベースに一致するものがないグループだけが特徴的な泳動パターンを示した（分担報告書 7-図 8）。これらの結果から、上記の 3 つの制限酵素を用いて泳動パターンを比較すれば、食毒の判別だけでなく、形態学的に判別が困難なクサウラベニタケ近縁種の判別も行うことが可能であることと考えられ、煩雑なシーケンス解析をきのこサンプルごとに行うことなく迅速簡便に判定が可能であることが分かった。

例年食中毒事例が多い、ツキヨタケ、クサウラベニタケ、ニガクリタケ、カキシメジのうち、クサウラベニタケは、食用のウラボニホテイシメジとの判別（特に大きさが同じような場合）は専門家においても難しいとされてきた。形態学的な判別の困難さの他に、クサウラベニタケはさらに分類すべき近縁種があるとこれまで考えられてきた。しかしながら、これらを詳しく検討した研究はこれまでなかった。今回の研究結果から、2 つの成果を得ることができた。一つは、形態学的にクサウラベニタケと判定されていたきのこの一部は、イッポンシメジや未同定の近縁種であること、そして、2 つ目は判別が困難なこれらきのこの迅速で確実な判別

同定法である PCR-RFLP 法を開発できたことである。本法により、少なくとも採取した生きのこについての判別に非常に有用であると考えられた。

・国内侵入の可能性がある自然毒について調査し、ハザードの特定を行った。

1) 資料調査

自然毒ハザードのうち、特に高等植物及びきのこに着目し、輸入食品に混入する可能性がある有毒な高等植物及びきのこに関する資料を調査した。その結果、有用な資料として資料①、②（分担報告書 8）が確認された。これらの資料は、欧州各国及び豪州・ニュージーランドにおいて、食品及びフードサプリメントに使用又は混入する可能性があり、健康への有害影響が懸念されている高等植物及びきのこのリストである。これらリストの中には、これまで我が国では注意が向けられていなかった可能性がある高等植物もあった。

以上のことから、本研究では、資料調査に次いで、これらの資料をもとに我が国の今後の輸入食品監視において食品への混入を特に懸念すべき高等植物及びきのこの特定を試みた。

2) 海外から侵入する可能性がある自然毒ハザード（高等植物）の特定

我が国の今後の輸入監視において、食品への混入を特に懸念すべき高等植物を特定するための資料として、資料①及び②を使用した。さらに、我が国でも自生又は栽培されている可能性がある有毒な高等植物のリストとして資料③（分担報告書 8）を使用した。これらの資料（①～③）を比較することにより、食品への混入を懸念すべき高等植物を特定するだけでなく、優先順位もつけることができる。よって、資料①～③を比較し、2 つ以上の資料に記載されていた高等植物を「特に注意すべき高等植物」として選択し、その結果を表 1（分担報告書 8）に示した。ただし、同じ属のものは同類の成分を含む可能性があるため、1 つの資料のみしか

記載されていなくても選択した。

表 1 では、各資料に記載されている高等植物について、資料番号の列にマル印「○」を記入し、各資料において属で記載されていたもの (spp.) にはコメ印を付した「○*」。表の記載内容は各資料の原文に従い、各資料に記載されていない科、属、和名等については、「植物分類表 第 2 版, 大場秀章 (著), アボック社」に従ってわかる範囲で記入した。

表 1 において、3 つの資料にマル印が記入された高等植物については、我が国で従来有毒なものとして認識されているだけでなく、海外でも有害影響が懸念されているものであることから、今後のリスク管理において食品への混入の可能性を考慮して優先的に注意を向けておくべきものである。その中で、トウアズキ含有成分のアブリン (abrin) 及びトウゴマ含有成分のリシン (ricin) については、米国の食品及びフードチェーンにおけるバイオテロへの予防措置を目的とした「2002 年市民の健康安全保障及びバイオテロリズムへの準備・対応法 (The Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act of 2002: 通称バイオテロ法) に基づき、公衆衛生、動物及び動物製品の安全性への脅威から保管、使用及び輸送を制限する対象リスト (42 C.F.R. Part 73; 米国保健社会福祉省 (HHS)) にも掲載されている。

さらに、資料③にはマル印がなく、資料①、②にマル印があるものについては、海外では監視対象になっているが、我が国ではあまり警戒されていない、或いは自生・栽培されていない高等植物である。

3) 海外から侵入する可能性がある自然毒ハザード (きのこ) の特定

我が国の今後の輸入食品監視において食品への混入を特に懸念すべききのこを、資料①及び②をもとに表 2 (分担報告書 8) にまとめた。表 2 では、各資料に記載されているきのこについて、資料番号の列にマル印「○」を記入し、

各資料において属で記載されていたもの (spp.) にはコメ印を付した「○*」。表の記載内容は各資料の原文に従い、各資料に記載されていない一般名、和名等については、「原色・原寸世界きのこ大図鑑, Peter Roberts and Shelley Evans (著), 東洋書林」に従ってわかる範囲で記入した。

表 2 によると、資料①及び②において記載されているきのこは重複しているものが多く、海外において食品及びフードサプリメントへ混入する可能性があり健康への有害影響が懸念されているきのこ (特に属として) は類似していることが分かる。特に幻覚性きのこは一致している。

野生きのこが輸入される可能性は低いと考えられるが、国に関係なく、外観が似ている食用可能なきのここと有毒きのこを誤認して採取されることが多いことから、今後の輸入食品のリスク管理においても有毒きのこの混入の可能性は認識しておくべきである。さらに、有毒とされるきのこの種類は多いが、その中でも表 2 に示したきのこは監視対象の優先度が高いと考えられる。

D. 結論

本研究において、国内で発生する可能性がある生物学的ハザードである、細菌、魚・巻貝類の毒、植物毒、きのこ毒について、それぞれの分担研究者により調査研究を行った。

細菌のリスクに関して

近年の食および人のグローバル化により、海外から様々な食品および人が国内に入りやすくなっている。と同時に、サルモネラ菌など食中毒菌により汚染された食品が入ってくる機会も増加していると考えられる。そのため、海外の発生状況の情報収集および国内の監視体制の整備、ならびに分離菌株のデータベースの拡充を図る必要がある。リステリア菌に関しては、本研究の結果、リステリアの *AscI* 切断による PFGE 解析を用いた分子疫学的解析は、

クラスターと血清型に高い相関がみられた。一方で、同一検体由来株について泳動パターン結果が一致しないことがあり、株の同一性を高い感度で検出できることが明らかとなったため、今後 CDC の手法に基づいた今回の標準的 PFGE 解析法を使用し、国内データの蓄積を行うこととした。

情報収集の重要性として、現在の我が国の輸入時の食品の監視・輸入体制では、事前の情報なしで、これらの汚染した食品を水際で留めることは困難であると考えられた。従って、このような食品によるリスクを最小限にするためには、2 国間及び IOFOSAN EMERGENCY 等の国際的な枠組みを通じての迅速な情報の入手並びに平常時から *Salmonella* 分離菌の血清型別、PFGE 解析情報の解析能力の向上、食品及びヒトから分離された *Norovirus* のシーケンス解析の迅速な実施とその情報集約・解析能力の向上が重要であると考えられた。

魚・巻貝類のリスクに関して

海外におけるフグおよび巻貝類の食中毒事例を調査した。わが国では、フグの輸入に関して国内基準と同等の基準で規制しているので、輸入フグの安全性確保については現行の方法で対応可能と考えられる。問題は海流等によるフグの移動、国内侵入である。地中海やオーストラリアにおける中毒原因種となったセンニンフグはわが国沿岸でも出現しているので、センニンフグを含めた南方産フグ類については今後も注意が必要である。フグ毒蓄積能評価では、*in vitro* 培養実験においてハコフグ肝臓は TTX を蓄積する能力が低いと示唆された。このことから、本法はフグの TTX 蓄積能評価に有効で、今後、サバフグ類およびハリセンボン科フグでの検討が望まれる。マリトキシン様毒と中国ハフ病との関連について、現地調査により、原因食品ザリガニの毒化はアオブダイやハコフグ以上に希なものであることがわかった。一方、ラット骨格筋の培養細胞を樹立し、予備的に筋芽細胞／線維芽細胞と筋

管に対する PTX の作用を示すことができた。今後、さらに検討を行い、横紋筋融解症を直接的に評価しうるアッセイ系の確立や PTX 様毒の作用機序解明が期待できる。

植物性自然毒のリスクに関して

ニリンソウなどと誤認してのトリカブト中毒は、死に至ることも多いので、特に注意が必要である。誤食を防止することがきわめて重要である。個々の植物によって、特徴や見分け方が違うので、それぞれに応じたけきめ細かい注意喚起、啓蒙活動が必要と考えられる。また、見た目によらない判別法の検討も必要と考えられた。

きこの毒について、クサウラベニタケとその近縁種について、国内より広くサンプルを採取して、ITS 領域の塩基配列をもとに分子系統樹解析したところ、形態学的にクサウラベニタケと判定された中には、クサウラベニタケの他に、イッポンシメジと未同定の近縁種の少なくとも 3 グループに分類することが分かった。これら形態学的にも専門家でも判別が困難なきのである、クサウラベニタケ及びその近縁種と食用のウラベニホテイシメジの確実で迅速な判別同定法を開発した。今後は、地域との連携を行い、開発した分析法をどのように活用するかが重要である。

海外で食品への使用又は混入が懸念されている自然毒ハザード（高等植物及びきのこ）を特定するための資料を入手し、今後の我が国の輸入食品監視においても注意を向けるべき自然毒ハザードをリスト化した。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Izumiya, J. Terajima, S. Yamamoto, M. Ohnishi, H. Watanabe, A. Kai, T. Kurazono, M. Taguchi, T. Asai, M. Akiba,

- Y. Matsumoto, and Y. Tamura:
Multilocus variable-number
tandem-repeat analysis of *Salmonella*
enterica serovar Typhimurium
definitive phage type 104. *Emerg. Infect.*
Dis. (in press)
- 2) 豊福肇、第44回コーデックス食品衛生部
会参加報告：食品衛生研究2013年3月号
 - 3) 高橋正弘、池田恵、中村丁次、日佐和夫、
豊福肇. *Campylobacter* 食中毒における
原因施設および原因食品のリスクランキン
グ設定への疫学的アプローチ. *医疫学雑*
誌. 2012. 16(1). p.52-60
 - 4) I. Shimada, H. Toyofuku, K. Hisa, S.
Numata, M. Kawamura.: Analysis of
Risk Management Reports in Food
Service Practical Training Course.
Proceeding of the 1st International
Conference on Asian Food Safety and
Food Security. Osaka, Japan.
September 2012
 - 5) Y. Nagashima, T. Matsumoto, K.
Kadoyama, S. Ishizaki, S. Taniyama, T.
Takatani, O. Arakawa, M. Terayama:
Tetrodotoxin poisoning due to
smooth-backed blowfish *Lagocephalus*
inermis and toxicity of *L. inermis*
caught off the Kyushu coast, Japan.
Food Hyg. Saf. Sci., 53 巻, 85-90 (2012)
 - 6) H. Lin, Y. Nagashima, P. Jiang, X. Qin,
Y. Lu, C. Zhang: Screening for toxicity
and resistance to paralytic shellfish
toxin of shore crabs inhabiting at
Leizhou peninsula, China. *Mar.*
Environm. Res., 78, 48-52 (2012)
 - 7) A. Murata, Y. Nagashima, S. Taguchi:
N:P ratios controlling the growth of the
marine dinoflagellate *Alexandrium*
tamarense: Content and composition of
paralytic shellfish poison. *Harm. Algae*,
20, 11-18 (2012)
 - 8) 長島裕二: フグ類の体内におけるテトロド
トキシンの動態に関する研究. *日本水産学*
会誌, 78 巻, 380-383 (2012)
 - 9) 長島裕二: 自然毒(動物性自然毒)フグ毒.
小児科臨床, 65 巻, 1419-1426 (2012)
 - 10) 長島裕二: 食品中の魚毒(フグ毒)による
食中毒とその予防. *食品衛生研究*. 63 巻 2
号, 21-30 (2013)
 - 11) R. Tatsuno, M. Shikina, K. Soyano, K.
Ikeda, T. Takatani and O. Arakawa:
Maturation-associated changes in the
internal distribution of tetrodotoxin in
the female goby *Yongeichthys criniger*.
Toxicon, 63, 64-69 (2013)
 - 12) 谷山茂人、高谷智裕、反町太樹、相良剛史、
久保弘文、大城直雅、小野要、肖寧、橋
勝康、荒川修: 沖縄県沿岸に分布する腐肉
食性および肉食性巻貝の毒性と毒成分. *食*
衛誌, 54, 49-55 (2013)
 - 13) R. Tatsuno, M. Shikina, Y. Shirai, J.
Wang, K. Soyano, G.N. Nishihara, T.
Takatani and O. Arakawa: Change in
the transfer profile of orally
administered tetrodotoxin to non-toxic
cultured pufferfish *Takifugu rubripes*
depending of its development stage.
Toxicon, 65, 76-80 (2013)
 - 14) Obitsu S., Sakata K., Teshima R.,
Kondo K.: Eleostearic acid induces
RIP1-mediated atypical apoptosis in a
kinase independent manner via ERK
phosphorylation, ROS generation and
mitochondrial dysfunction. *Cell Death*
and Disease (in press)
2. 学会発表
- 1) Okada Y, Monden S, Suzuki H, Nakama
A, Ida M, Yamamoto S, Igimi S.:
Antimicrobial susceptibilities of *Listeria*
monocytogenes isolated from imported
and domestic foods in Japan. FAVA2013

- (2013.1)
- 2) Toyofuku, H.: Microbiological risk management of seafood products in the supply chain of Japan. The FFTC-KU Joint International Seminar on “An appropriate System for High Quality and Safe Seafood Production in Asia and Pacific Region”, Bangkok, Thailand 2012. Abstract book. P19-24.
 - 3) I. Shimada, H. Toyofuku, K. Hisa, S. Numata, M. Kawamura.: Analysis of Risk Management Reports in Food Service Practical Training Course. Abstract book of the 1st International Conference on Asian Food Safety and Food Security. Osaka, Japan. September 2012
 - 4) 豊福肇、新武司、田中千可子、川瀬健太郎、清水俊一、高橋正弘、日佐和夫：食中毒等予防の観点からみた工場監査手法の問題点。第33回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集。P.123
 - 5) 田中千可子、豊福肇、赤堀正光、高橋正弘、濱田奈保子、日佐和夫：微生物に起因する食中毒の発生要因（リスク因子）並びに発症時間及び症状に関する研究 平成18～20年度食中毒事件調査結果詳報。第104回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 2012. 09. P.110
 - 6) 豊福肇：食品中のリステリア規格策定～Codex等海外動向と国内進捗状況～。ifia JAPAN 2012・食の安全・科学フォーラム第11回セミナー。抄録集 p.12
 - 7) 豊福肇：コーデックスの数的指標の考え方を採用した、初めての生食用食肉の微生物規格基準 食品安全委員会におけるリスク評価。第103回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集。2012. P.28
 - 8) 豊福肇、柿沼美智留、長谷川専：改良版 Risk Ranger による食品衛生監視指導の効果の半定量的分析。第103回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集。2012. P.79
 - 9) 豊福肇、柿沼美智留、長谷川専：食品衛生監視員による監視の高度化に関する研究—Risk Ranger による我が国における食品衛生監視の効果の半定量的分析。平成24年日本獣医公衆衛生学会。2012. P.79
 - 10) 池田恵、高橋正弘、中村丁次、豊福肇：ノロウイルス食中毒にける発生頻度の時間的検討。第39回防菌防黴学会；2012年9月；東京。第39回防菌防黴学会学術講演会要旨集。p.118
 - 11) 高橋正弘、池田恵、中村丁次、豊福肇：食中毒原因食品と病因物質の組み合わせ別のリスクランキング設定への疫学的アプローチ。第39回防菌防黴学会。2012年9月。東京。第39回防菌防黴学会学術講演会要旨集。p.128
 - 12) Toyofuku, H.: Data collection for establishing a risk mitigation strategy for *Campylobacter* and *Salmonella* in a broiler slaughterhouse in Okinawa Prefecture, Japan. FoodMicro 2012. Istanbul, Turkey. Abstract book. P.233
 - 13) S. Itoi, S. Yoshikawa, R. Tatsuno, A. Detake, C. Takayanagi, M. Eguchi, M. Suzuki, K. Asahina, S. Kokubo, S. Takanashi, A. Miura, M. Kawane, K. Suitoh, T. Takatani, O. Arakawa, Y. Sakakura and H. Sugita: Distribution of tetrodotoxin in the larvae of the genus *Takifugu* pufferfish, 6th World Fisheries Congress, Edinburgh, May. 2012.
 - 14) K. Onuki, S. Shiba, S. Hihara, O. Arakawa and T. Noguchi: Effect of pufferfish liver on the ability of mice in learning and memorizing, 6th World Fisheries Congress, Edinburgh, May. 2012.
 - 15) S. Jiang, S. Miyata, T. Takatani and O. Arakawa: Effects of successive

- subculture and various culture conditions on growth and PSP productivity of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*, 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Jul. 2012.
- 16) R. Tatsuno, K. Yamaguchi, T. Takatani and O. Arakawa: Two proteins homologous to pufferfish saxitoxin- and tetrodotoxin-binding protein (PSTBP) found in the plasma of non-toxic cultured specimens of the pufferfish (*Takifugu rubripes*), 17th World Congress of the International Society on Toxinology, Honolulu, Jul. 2012.
- 17) S. Niina, T. Araki, Y. Yamanaka, J. Wang, R. Tatsuno, O. Arakawa and T. Takatani: Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to different ages of artificial hybrid pufferfish, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 2012.
- 18) Y. Yamanaka, S. Niina, J. Wang, T. Araki, R. Tatsuno, K. Ikeda, M. Hamasaki, Y. Sakakura, T. Takatani and O. Arakawa: Transfer profiles of intramuscularly administered tetrodotoxin to artificial hybrid specimens of the pufferfish: *Takifugu rubripes* × *Takifugu niphobles* and *T. niphobles* × *T. rubripes*, Joint International Symposium on Marine Science and Technology, Jeju, Oct. 2012.
- 19) O. Arakawa: Risk control on causative marine toxins of food poisoning in Japan, A Joint Symposium of the Kenya Marine & Fisheries Research Institute and Nagasaki University, Kisumu, Dec. 2012
- 20) 山中祐二、峰智香、辰野竜平、池田光彦、高谷智裕、荒川修:天然フグ3種における体内毒分布の成長依存的変化. 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012年3月
- 21) 辰野竜平、山口健一、高谷智裕、荒川修:無毒養殖トラフグにおけるPSTBP相同アイソフォーム遺伝子の発現. 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012年3月
- 22) 野原健司、柴原康広、河野裕美、荒川修、斎藤俊郎:DNA分析によるツムギハゼ北上個体群の由来推定の試み. 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012年3月
- 23) 沖田光玄、後藤完奈、近藤秀裕、平野雪、金子元、木下滋晴、山崎英樹、崎山一孝、山根晃、新名真也、辰野竜平、高谷智裕、荒川修、阪倉良孝:トラフグのフグ毒感知に関わる遺伝子のマイクロアレイ解析による探索. 平成25年度日本水産学会春季大会, 東京, 2012年3月
- 24) 近藤一成、小林友子、中村公亮、小櫃冨未、野口秋雄、長澤栄史、手島玲子:クサウラベニタケおよび近縁種のrDNA ITS領域の解析. 第104回日本食品衛生学会学術講演会(2012.9, 岡山)
- 25) 小櫃冨未、近藤一成、中村公亮、小林友子、野口秋雄、坂田こずえ、手島玲子:クサウラベニタケおよび近縁種のPCR-RFLP法を用いた迅速同定法の検討. 第104回日本食品衛生学会学術講演会(2012.9, 岡山)
- 26) 近藤一成、小櫃冨未、小林友子、中村公亮、坂田こずえ、野口秋雄、手島玲子:PCR-RFLP法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法. 日本薬学会第133回年会(2013.3, 横浜)
- 27) 近藤一成、小櫃冨未、手島玲子:エレオステアリン酸刺激による細胞死におけるRIP1の役割. 第35回日本分子生物学会年会(2012.12, 福岡)

- 28) 登田美桜、畝山智香子、春日文字：過去
50年間のわが国の高等植物による食中毒
事例の傾向について．日本薬学会第133
年会（2013.3, 横浜）

G. 知的財産権の出願・登録状況

本研究で得られたクサウラベニタケとその
近縁種の分子系統樹解析およびPCR-RFLP法
の結果を、特許出願した。

出願番号：特願 2013-005113

「キノコの同定方法、及び、同定キット」

出願日：平成25年1月16日