

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・代謝生化学部
研究分担者	紺野勝弘	富山大学和漢医薬学総合研究所
研究分担者	豊福 肇	山口大学共同獣医学部
研究分担者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	登田美桜	国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

研究要旨

食品に侵入の恐れが生物学的ハザードの中で、細菌と自然毒について、リスクに関する調査および研究を行った。細菌に関する研究では、食水系細菌感染症にはサルモネラ症、赤痢、コレラなどがあり、国内外でさまざまな汚染ルートを介して多くの患者を発生させている公衆衛生上重要な感染症である。これら細菌感染症を対象に、海外流行情報の収集ならびに国内侵入への対応のための分離菌株の解析手法の検討を行った。サルモネラに関しては、米国では中米から輸入されたキュウリによる事例などが発生した。国内ではメキシコ産原材料の魚介製品を推定原因食品とするナグビブリオの食中毒事例が発生した。細菌性赤痢では原因不明の国内例の小規模な流行が発生した。グラム陽性の短桿菌リステリアについて、リステリア症の集団感染事例は欧米諸国では頻繁に起こっているが、日本国内ではほとんど見られず、潜伏期間も長いことからほとんどの症例において原因食品は同定されていない。海外から侵入しうる感染症の原因菌として、リステリアの分子疫学的解析を行い、国内散発例の原因食品究明に役立て得るデータベース作成を目指している。手法として、米国 CDC を中心として国際的に行われているパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を用いて、制限酵素 *AscI* で切断したパターンの解析を行った菌株について、*ApaI* での切断を行い、泳動パターンの解析を行った。国内侵入時の対応に生かすために情報解析を行った。WHO の INFOSAN Emergency を通じ、国際的に警報が発生された事例、欧州の RASFF による警告が発生されている事例等を解析し、我が国の国内侵入のおそれがある生物学的ハザードによるリスクを如何にして低減させるか検討した。また、既存の定量的確率論的モデルを用いて、*Salmonella* 属菌及び *Listeria monocytogenes* に関する輸入食品によるリスクを推定した。自然毒に関する研究では、きのこ毒に対するリスク低減の施策として活用するために、中毒被害事例が最も多い2つのきのこについて、核リボソーム RNA をコードする遺伝子の中の ITS 領域を標的に、シークエンス解析・分子系統樹解析を行った。これまで1種と考えられてきたクサウラベニタケは、3種存在することが明らかになった。これらの結果を用いて、迅速な判別法としてPCR-RFLP法を開発し、多様なきのこ混在中でも適用することができた。確定法としてリアルタイムPCR法を構築した。日本で中毒被害が多いツキヨタケについても同様の手法を開発した。高等植物への適用を広げるために *rbcL* や *matK* の領域を用いたPCR-RFLP法を開発した。また、葉緑体ゲノム上の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を標的として食中毒原因植物の推定を行った。これらは、特殊な機器を必要としない簡便で迅速な方法として、現場に近いところで活用していくことで中毒被害低減に役立てることができる。自然毒のリスクに関しては、アンケート調査の結果から国民に向けた一層の正確な情報提供とリスクの認知を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

細菌のリスクに関する研究

現在もなお、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、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、そのデータバンクの構築を行う。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して前年度より継続して行う。

リステリアのリスクに関する研究

リステリアは、人及び動物に脳脊髄膜炎、流産を引き起こし、発症時の致死率が 20 - 30% にも及びリステリア症の原因菌である。本菌は動物の腸管内、土壌、河川水や食品製造工場、冷蔵庫内など様々な環境に存在している。本菌は-1 もの低温下での低温増殖能、20% もの高食塩濃度下での生残性等高度な環境抵抗性をもち、食品原料の一次汚染並びに加工・保存過程での二次汚染の制御が困難である。欧米諸国ではしばしばリステリア症の集団事例が見られている。日本では、リステリア症は報告義務のない疾患であり、推定患者数も少なく集団事例はほとんど報告されていない。しかし

ながら、これまでの国内流通食品汚染調査では 1500 検体中 21 検体（検出率 1.4%）からリステリア菌が見つかった。本研究では、海外から汚染食品を媒介し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、その発生状況を正確に把握するための情報を収集するとともに、輸入食品、国内産食品等様々な由来のリステリア菌株の分子型別データを収集、蓄積することにより、国内での散発事例及び集団事例の原因食品同定に役立てることを目的として、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パルスフィールドゲル電気泳動法による解析を昨年度に引き続き実施した。

国内に侵入する恐れのある細菌の検査、監視対策、リスク管理に役立つ情報に役立てるため情報収集および情報解析

本年度はこれまでに発生した多国間集団事例や我が国と関係の深い米国などの主だった集団事例を中心に情報収集を行った。情報収集を通じて海外における流行菌型の調査を行い、これを国内の状況と照らし合わせて、新たな検査体制、サーベイランス体制の検討に用いることで、突発的な中毒事例に対応可能できるか、検討した。

自然毒(きのこ毒および高等植物)のリスクに関する研究

国内で中毒事例が多いきのこについて過去 10 年以上のデータを解析すると、クサウラベニタケとツキヨタケの 2 つのきのこであることが判明している。また、きのこによる中毒被害事例の中で、原因きのこが特定できない場合

も多く存在する。これは、きのこの判別や同定が経験者の形態学的判別により行われているため、その鑑定能力には大きな個人差があること、形態をとどめていない細分化されたものや調理された場合などには同定不可能になる。これらの事実を踏まえて、植物性自然毒の中で、きのこによる食中毒被害を低減するための施策として重要なことは、きのこ採取者に対する一層の情報提供と注意喚起であり、迅速にかつ科学的なエビデンスに基づく検査方法の確立と整備であると考えられる。国内で中毒事例が特に多いツキヨタケとクサウラベニタケについて、遺伝子全国からサンプルを収集して遺伝子配列を解析を行い、系統樹解析を行ってきた。その結果を用いて生のきのこの判別に有効な PCR-RFLP 法を昨年作成したが、本年度は、加熱調理や吐瀉物を想定し、加熱および人口胃液処理したサンプルでも適用可能な PCR-RFLP 法を考案した。ツキヨタケについても同様の検討を行い、PCR-RFLP 法を確立するとともにリアルタイム PCR 法についても検討を行った。

高等植物に対しても、同様の手法を用いて、国内で中毒被害が多く報告されているバイケイソウ、トリカブト、スイセンなどについて、きのこの場合とは異なる遺伝子領域を標的として PCR-RFLP 法の検討を行い、リスク低減のための施策とすることを目的とする。

B. 研究方法

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

海外事例情報収集は、論文、米国 CDC、欧州 CDC 資料から参考にした。赤痢菌およびナグビブリオ分離株に関しては、パルスフィールド

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。

各国におけるリステリア症発生状況及び *Listeria monocytogenes* 菌株の分子疫学的解析に関する研究

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 61 菌株を解析に使用した。PFGE による分子型別について、昨年度作成した米国 CDC の方法を基本とした PFGE 解析法の標準的プロトコルを 2013 年 5 月に行われた CDC の方法の改正に合わせ、再検討を行った

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

- 1) INFOSAN emergency の事前緊急情報収集・解析した。
- 2) 海外の規制・リスク評価機関等より情報収集・解析アラート情報に注目 (RASFF、EFSA、FDA、FSANZ など) し、我が国への侵入のおそれのある事例を調査した。
- 3) web 上で使用できる確率論的リスク評価ツールを用いて輸入食品中のハザードによるリスクを推定した。

食中毒事例が多いきのこの分子系統樹解析と検査法確立

日本国内で中毒事例が多い、クサウラベニタケとツキヨタケについては、全国の広い地域から

採取、収集したものをを用いた。クサウラベニタケ系統の解析には、クサウラベニタケと近縁種ウラベニホテイシメジ、イッポンシメジを、ツキヨタケ系統の解析には、ツキヨタケ、ヒラタケ、ムキタケを用いた。それぞれ、DNA 抽出し、ITS1-5.8S-ITS2 の領域をユニバーサルプライマーで増幅、精製し、シークエンス解析を行った。アライメント解析および系統樹解析には、CLC Genomic workbench ver.6.5 および Genetyx ver.12 を用いた。クサウラベニタケについては、昨年度の結果に加え、本年度は加熱調理サンプルにも適用できるように、短い標的配列を用いた PCR-RFLP 法の検討を行った。この時、食毒判別は *MsII* 処理で行った。疑似試料作成には、市販のきのこを用いた。ツキヨタケについては、*Sau96I*、*Bpu10I*、*SfiI* を用いた。クサウラベニタケおよびツキヨタケについて、確定法としてリアルタイム PCR 法の検討も行った。

食中毒事例の多い植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

日本各地（東京、北海道、青森、福島）で採集あるいは購入した植物：バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセン、ギョウジャニンニク、ゴボウ、ニリンソウ、ニラを用いた。*rbcL* または *matK* の一部を標的とする PCR-RFLP 法を、制限酵素として *BglI*、*EcoRV*、*NcoI* を用いて検討した。また、*trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長の比較による食中毒原因植物の推定を行った。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

消費者が自然毒をどのように捉えているか、またどの程度知っているかを理解できるようにするためのアンケート調査表を作成した。2013 年 10～12 月、山口県で開催された事業者・大学生・教職員向け講習会の出席者、宮城県の大学生・教職員・公務員向け講習会、神奈川県及び群馬県の一般向け講習会に参加した計 370 名を対象にアンケート調査表を配布し、調査を実施した。講習会の内容は主に食品関連（ただし、自然毒との関連性はない）のものであった。

回収されたアンケート調査の回答をもとに、自然毒に関する消費者の考えや認知度について検討した。

C. 研究結果および考察

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

最近海外で発生したサルモネラ集団発生食中毒の中から、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。推定原因食品は野菜・調味料・肉類であった。その他、ペットフードやカメから感染拡大した事例もあり、一部は米国から輸出されているものもあった。ペットフードからの感染は日本ではあまり考慮されていないが、今後注意が必要な項目である。

2013 年 9 月から 10 月にかけてナグビブリオによる食中毒が相次いだ。原因食として中米産ニシ貝スライスが疑われ、患者および食品からナグビブリオが検出され、患者株の大半と食品由来株の一部の PFGE パターンが一致した。

2013 年に解析された *Shigella sonnei* は 81 株であった。MLVA による解析を行ったところ、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。カンボジア輸入例の 1 株と国内例 1 株に類似性が見られた。類似の型は 2012 年にも見られており、今後の動向が注目される。

各国におけるリステリア症発生状況及び *Listeria monocytogenes* 菌株の分子疫学的解析に関する研究

リステリアの PFGE による分子型別と集団事例に関する情報収集について行った。

国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *ApaI* 切断による PFGE 解析の結果を行った。その結果 *ApaI* 切断においても、昨年度実施した *AscI* と同様に、血清型でクラスターが大きく分けられることが示された。

過去 5 年間に諸外国で発生した患者数が 3 名以上のリステリア症集団事例は 17 例見られ、そのうち 9 例でチーズが原因食品であった(表 2)。また、それらのうち輸入食品を原因とする事例は 3 例みられた。

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

INFOSAN、INFASAN emergency アラートとして報告された事例について調査した。平成 25 年度には健康危害が関連する微生物ハザードによるアラートは 2 件発せられた。また、健康被害はなかったものの、ポツリヌスの汚染として、ニュージーランドのホエイタンパク濃縮中の *Clostridium botulinum* 汚染疑惑事件が報告され、INFOSAN が活発に活用された事例があった。

INFOSAN 活動報告書(2011 及び 12 年)を調査したところ、アフリカ、ヨーロッパ及び

西太平洋地域事務所でのアラート発生が多かった。その他、RASFF 情報の解析を行った。

FDA の iRISK を用いたて、リスクの推定を行った。具体的には、ソフト熟成チーズ中の *Listeria monocytogenes* についてリスク評価を行った。日本国民が全員年 1 回、輸入のソフト熟成チーズを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は 1.36 人、DALY は 4.89、一回の喫食機会当たりの感染リスクは 3.83×10^{-8} と推定された。スモークサーモン中の *Listeria monocytogenes* について評価を行った。日本国民が全員年 1 回、輸入のスモークサーモンを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は 819 人、DALY は 3630、一回の喫食機会当たりの感染リスクは 0.0000284 と推定された。本手法は、昨年度実施した半定量モデルより、詳細なモデルを自分で組み立てることもできるし、用量反応データも健常者とハイリスク集団ごとに変えることもできる。それに応じて、要求されるデータの量及び質が増えるので、データがある程度そろっている食品と微生物の組み合わせには、このモデルは極めて有効であると考えられたが、データがないと、多くの仮定を導入せざるをえなくなることから注意が必要であると考えられた。

食中毒事例が多いキノコの分子系統樹解析と検査法確立

クサウラベニタケについて、遺伝的バリエーションが比較的大きいことが報告されていた。本研究において、これまで 1 つに分類されていたクサウラベニタケが 3 グループ(clade I~III)に分類されることが初めて明らかになった。分子系統樹解析の結果をもとに、加熱調理サンプルでも適用できるように、短い DNA 領域を標

的とした PCR-RFLP 法を考案し、多くの食用キノコ存在下でも食毒を迅速に判別できることが明らかになった。ツキヨタケについて、遺伝的なバリエーションはほとんどなく1つのグループに分類された。また、PCR-RFLP 法を構築した。さらに、加熱調理サンプル等からでも確実に種の同定が可能なリアルタイム PCR 法を、クサウラベニタケおよびツキヨタケに対して確立した。本法により、これまで原型をとどめていないため調理サンプルからの同定ができなかった場合でもできよう可能になり、未同定の事例の解決が可能となると考えられる。

食中毒事例の多い高等植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

発生件数の多いバイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンの迅速・簡便な鑑別法を検討した。バイケイソウとギョウジャニンニク、チョウセンアサガオとゴボウ、トリカブトとニリンソウ、スイセンとニラとを識別するための DNA 標的遺伝子として *rbcL* または *matK* を用いた PCR-RFLP 法を構築した。本法は調理サンプルからも適用可能であった。また、葉緑体ゲノム上の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を用いた食中毒原因植物の推定も検討した。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

食品に関する代表的な問題(残留農薬、食品添加物、輸入食品、遺伝子組換え食品、微生物による食中毒、BSE)と自然毒に関して、消費者がどの程度の不安を感じているかを4段階で調査した結果、自然毒については不安を感じていない人が半数近くいることが確認され

た。行政的に管理されておりリスクも低い輸入食品及び残留農薬よりも、毎年食中毒が発生し死者も出ている自然毒の方が不安を感じる人の割合が低いのは問題である。

自然毒による食中毒に関する知識についての調査では、1年間の食中毒の発生件数はキノコ毒を原因とする事例が最も多く、そのことを89%の回答者は正しく認識していた。一方で、図鑑があれば食べられるキノコと毒キノコを見分けられるかとの問いに対し、そう思わないと答えた人は77%で大半を占めたが、その一方で14%の人は分からないと回答し、5%の人は見分けられると思うと回答していた。これらの調査結果から、きのこの場合には、特に見分けの難しさと危険性を一層周知させる必要が感じられた。

D. 結論

細菌に関しては、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。同時に、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。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、発生時の迅速な情報週、連携ならびに分離菌株のデータベースの一層の拡充を図る必要がある。

自然毒に関しては、新たな簡便な検査法を整備し検査の裾野を拡大させるとともに、植物性自然毒の危険性、リスクをさらに一般国民に向けて情報提供を行い周知させることが一層求められる。これまでに作成した自然毒データベースをさらに拡充させ、検査法整備にも役立てることが必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

各分担報告書に記載した。

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 法に関して、昨年度出願したものの適用範囲拡大のために再出願した。

出願番号：特願 2014 - 006142

出願人：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：キノコの同定方法、及び、同定キット

出願日：平成 26 年 1 月 16 日

発明者：近藤一成、小櫃冨未、坂田こずえ

弊所整理番号：26H006

さらにツキヨタケとシイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する PCR-RFLP 法およびリアルタイム PCR 法に関して出願した。

出願番号：特願 2014 - 103555

出願人：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：きのこの同定方法および同定キット

出願日：平成 26 年 5 月 19 日

発明者：近藤一成

弊所整理番号：26H105