

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 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

食品に侵入のおそれがある生物学的ハザードの中で、細菌類ではサルモネラ菌、赤痢菌、リステリア等を、自然毒では高等植物、きのこに関し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、チアパウダーによる事例が、細菌性赤痢ではインドツアーによる事例が発生した。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ていないため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。本年は、冷製肉を感染源とする死者 17 人の集団事例が発生した。米国では、もやしやリンゴ製品等による集団事例も発生した。国内外からの様々なリステリア汚染検体の分子疫学的解析を行い、国内散发例の原因食品究明に役立て得るデータベース作成を行った。また、事例解析として、WHO の INFOSAN Emergency を通じて国際的に警報が発生された事例、欧州緊急警告システム 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本年度アラートが発せられた事例はカナダ産チア種子によるサルモネラアウトブレイクとキャラメルリンゴによるリステリアアウトブレイクであった。これらを含めて、アウトブレイクを輸入時検査のみで食い止めることは難しい。国内侵入後速やかに汚染物質を検出、排除するためには、分離株の同定に必要な菌株情報のデータベース整備と公開が必要である。

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、シークエンス解析・分子系統樹解析の結果をもとに、簡便法である PCR-RFLP 法を作成し、加熱調理試料にも適応可能な方法として確立した。さらに、精度が高いリアルタイム PCR 法（クサウラベニタケは 4 系統マルチプレックス）を確立した。高等植物においても *rbcL* や *matK* の領域を用いた PCR-RFLP 法を開発しているが、本年度はチョウセンアサガオ食中毒事例に適用して、現地調査から回収した試料の同定で繋がり、遺伝子判別法の有用性を示した。また、自然毒を含む食品に関連した

事例、規制、消費者への注意喚起等に関する海外情報収集を行うために、主に RASFF のデータを調査した（2014 年 12 月）。食品安全上注意が必要なものとしてビターアブリコットカーネルのアミグダリン、ハーブティーのピロリジジナルカロイド含有植物が挙げられた。食品に含まれる可能性がある自然毒に関する海外情報収集により、有害な食品の国内侵入の予防に役立つものと考えられた。

## A. 研究目的

### 細菌（サルモネラ、赤痢菌等）のリスクに関する研究

サルモネラは、国内外で多くの食中毒の原因となっている。国内では1990年代にサルモネラ食中毒のピークがあったが、現在でもなお、細菌性食中毒発生の原因物質別で上位を占めている。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。そこで、海外で発生した食中毒の情報収集を行う。

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名前後であり、大半は海外渡航者による輸入例である。近年発生した集団事例の中には海外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。一方で、国内例はそのほとんどが散発もしくは家族内事例などの小規模なものであり、感染源の究明にいたることはほとんどない。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。そこで、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。

### 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、流死産を引き起こし、発症時の致死率が20 - 30%にも及ぶリステリア症の原因菌である。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り、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。

### 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

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INFOSAN、欧州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、若干の知見が得られたので報告する。

## 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で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とともに、迅速な検査方法の確立と整備であると考えられる。国内で食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、全国からサンプルを収集して遺伝子配列を解析し、系統樹解析を行ってきた。これまでに、簡便迅速法として PCR-RFLP 法を開発したが、より信頼性の高い検査法としてリアルタイム PCR 法も今回開発した。

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、各植物特異的な遺伝子領域を標的として PCR-RFLP 法の検討を行ってきたが、本年度は、実際の中毒事例から回収した植物サンプルに適応してその有用性を確認した。

## 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

植物性自然毒を含む食品、あるいは食品への有毒な植物・きのこの混入に関連した、事例、規制、消費者への注意喚起等に関して海外の情報を調査した上で、食品、特に輸入品に含まれる恐れのある自然毒を特定し、今後我が国において注意を向けるべき食品及び自然毒について検討することを目的とした。

## **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

海外事例の情報収集は論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考にした。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* 130 菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株 13 株、鶏肉由来株 35 株、豚肉由来株 28 株、牛肉由来株 22 株、水産食品由来株 17 株、その他の食品由来株 13 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 ( ATCC19115 株 ) 1 株であった。昨年度作成した、米国 CDC の方法を

基本とした *L. monocytogenes* の PFGE 解析法の標準的プロトコールの改正版にしたがって、PFGE 解析を実施した。制限酵素は *ApaI* と *AscI* を用いた。

また、2014 年に発生した海外におけるリステリア症の集団事例について、国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部が発表している食品安全情報等を基に、情報を収集した。

#### 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。

#### きのこの定性リアルタイム PCR 法を用いた検査法確立

クサウラベニタケ（分類した 3 系統）およびウラベニホテイシメジに対する検査法については、上記きのこに加えて、特異性の検討のために市販の食用きのこ 6 種（シイタケ、マイタケ、ブナシメジ、エノキタケ、マッシュルーム、なめこ）も用いた。抽出は DNeasy Plant mini kit を用いて行った。リアルタイム PCR に用いるプライマーおよびプローブは、4 色マルチプレックス用に蛍光色素として FAM、VIC、Texas-Red、Cy5 を用いて食用と毒のクサウラベニタケ 3 系統を同時に検出できるようにした。また、検査の際の陽性対照プラスミドをそれぞれ作成した。リアルタイム

PCR 法の PCR 反応効率および検出限界（LOD）を求めた。

ツキヨタケおよび国内で収集もしくは購入したシイタケ、ヒラタケ、ムキタケに対する検査法についても同様に検討した。ツキヨタケ検出用プローブには FAM で標識した MGB プローブを用いた。

また、昨年度予備検討を行った、ツキヨタケおよび食用シイタケ、ヒラタケ、ムキタケを判別するための PCR-RFLP 法について、加熱加工された食品残渣からの検査できるように、標的配列を短くした short-PCR-RFLP 法を今回確立した。

#### 食中毒事例の多い植物の DNABarcoding 法を利用した鑑別法の活用

青森県で発生した高等植物チョウセンアサガオによる食中毒の現地調査を行った。聞き取り調査とともに、サンプルを持ち帰り、*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* intergenic spacer 領域の DNA 配列のシーケンズ解析および BOLD システムによる判別を行った。

#### 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

EU の食品及び飼料に関する緊急警告システム（RASFF: the Rapid Alert System for Food and Feed）のデータ（2014 年 12 月 25 日までの通知）を対象に、食品中の自然毒が問題になった事例、並びに有毒な植物・きのこが実際に食品へ混入した事例を調査した。また、食品中に含まれる又は混入する可能性がある自然毒に関する規制、消費者への注意喚起等について、各国政府の食品安全担当機関などの公的機関による公表資料を中心に調査した。ただし、

かび毒及び菌類が産生する有毒物質（例：  
麦角アルカロイド）は対象外とした。

### 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

今年度を中心に海外で発生した食中毒事例の中で、複数国が関連した事例を調査した。サルモネラについて、2013-14年にかけて発生したチアパウダーによる米国およびカナダの事例は同一事例である。本事例では複数の血清型によって食品が汚染されていた。赤痢菌に関して、2014年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は 34 株であった。うち、輸入例は 25 株で、東南アジア 14 株、南アジア 10 株、東アジア 1 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。カンボジア輸入例については、過去 1-2 年ほどの傾向と同様、南アジア由来株と近縁の型となった。2014 年 10 月にインドツアーによる事例が発生し、関連と推定される株が 2 株送付されたが、互いに一致した。現在 *S. sonnei* MLVA データベースは 900 株ほどになっており、感染地域ごとに整理していく必要がある。データ数が少ない地域もあり、また、カンボジアのように傾向に変化が見られる国もあることから、引き続きデータベースの厚みを増していく必要があると考えられる。

#### 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。

食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *Apal* 切断による PFGE 解析と *AscI* 切断による結果を比較した。*AscI* を用いた場合の系統樹は、*Apal* を用いた場合と全体的には同じような結果が得られたが、*AscI* を用いた場合の方が菌株の相同性が高くなる傾向にあることが示された。また、同一食品由来株で異なる血清型の菌株が分離される例が 3 例あり、血清型が同一でも 2 菌株間の相同性が低い例も 6 例見られた。どちらの制限酵素を用いた場合でも、食品由来株は血清型によりクラスターが大別されることが示されたが、患者由来株においては、必ずしも食品由来株による血清型ごとのクラスターと一致しないことが示された。今回の解析では、明太子由来株、鶏肉由来株、食肉製品由来株において患者由来株と高い相同性を示した株が見られた。これらのうち、食品由来株と患者由来株で 2 種類の PFGE パターンと血清型の全てが完全に一致しているものはなかった。一方、フランス産チーズ、マグロすきみ及びびいくら由来の 3 菌株が他の菌株と大きく離れたパターンを示しており、極めて独自性の高いクローンであることが明らかとなった。

#### 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

##### 1) INFOSAN Emergency によるアラート情報

INFOSAN は食品安全担当機関の国際的なネットワークである。そのうち、

INFOSAN Emergency ネットワークは重篤で、かつ国際貿易が関与する食品汚染イベントにおいてのみ活性化され、月平均 1.25 件のアラートが発せられる。

#### 平成 26 年度の INFOSAN アラート

平成 26 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次の 2 件発せられた。

##### 事例 1

カナダ産の有機発芽チア (chia) の種子の粉末を含む種々の製品により、アメリカ及びカナダにおけるサルモネラ症アウトブレイク

- ・ 日時：6 月 6 日, 2014
- ・ 関係国：カナダ、米国、バーレーン、アイスランド、インド、シンガポール、スロベニア
- ・ 食品カテゴリー：特殊栄養食品
- ・ 汚染食品：有機発芽チア (chia) の種子の粉末を含む種々の製品
- ・ 報告された疾病：27 人の *Salmonella* Newport 及び Hartford 患者報告 (カナダ)
- ・ 病原体：*Salmonella* Newport 及び Hartford

##### 事例 2

*Listeria monocytogenes* に汚染された Bidart Bros.社(ブランド名:Happy Apple, Carnival, 及び Merb's Candies) のリンゴを使用して市販用に製造・包装されたキャラメルリンゴ (caramel apples: 写真参照) によるアウトブレイク

- ・ 米国の 12 州から報告された患者計 35 人。患者の発症日は 2014 年 10 月 17 日 ~ 2015 年 1 月 6 日。
- ・ 食品カテゴリー：野菜果実
- ・ 汚染食品：リンゴ、キャラメルリンゴ
- ・ 報告された患者数：米国 32 人、カナダで同一 PFGE パターン 2 人
- ・ 病原体：*Listeria monocytogenes*



また、INFOSAN Emergency を通じ、欧州の Rapid Alert から連絡のあった、*E.coli* 026:H11 with eae gene (coding for intimine) で汚染されたフランス産の未殺菌山羊乳を用いたチーズ "Crottins de Chavignol" が我が国に流通しているとの情報提供があった。

シガトキシンをコードしている *stx* 遺伝子はこれらの分離株から特定されていないが、大腸菌は *stx* 遺伝子を容易に得たり、失ったりすることが示されており、*eae* 陽性の *E. coli* の分離株は容易に *stx* 遺伝子を得て病原性になり得ることと考えられている。

#### 2011.12 及び 13 年の INFOSAN 活動報告書をレビュー

通報原因となったハザードとしては例年通り *Salmonella* spp. が最も多く、次いで *Listeria monocytogenes*、A 型肝炎ウイ

ルスであり、過去 2 年間多かった、*Clostridium botulinum* 及び *Escherichia coli* は 3 件であった。

#### 欧州の RASFF の解析

その中でも特筆すべき事例は、スウェーデンで 2 名が、EHEC 特有の症状を呈し、調査の結果、スウェーデンの施設で製造されたハンバーガーの喫食が原因。当該ハンバーガーはオランダのカット工場でカットされた原材料を使用、牛肉はハンガリー、ラトビア、ポーランド、英国等の牛肉を用いてカットしていた。オランダは当該カット工場から牛肉が出荷されたフランス、英国、フィンランド、ドイツ等にも警告。このアウトブレイクの前にデンマークで同じ血清型の VTEC による患者 13 名、うち 8 名が HUS を呈する食中毒が報告されていたが、このスウェーデンの事例との関連性は明らかにできなかった。

動物性食品以外では野菜果実の通報が多く、そのほとんどはサルモネラ属菌によるものであった。継続的に英国からバンラデシュ、インド及びタイ産の paan leaves (パーン) 中のサルモネラの通報が多かった。RASFF から日本政府に対し、汚染食品が流通していると通報があった事例は 4 件、日本産の食品が通報対象になったのは 10 件であった。

#### きのこの定性リアルタイム PCR 法を用いた

##### 検査法確立

PCR-RFLP 法は、簡便法で、特殊な装置を必要としないことから各都道府県衛生研究所だけではなく、保健所あるいは役

所等でも実施可能な方法で、検査の裾野を拡大する意味でも重要である。一方で、確定法としてリアルタイム PCR を用いた方法を整備すれば、上記検査法で判定ができなかった場合にも最終確認が可能となり結果のさらなる信頼性の向上につながることから検討した。

(1) クサウラベニタケには、他に 2 つの近縁種が毒でありこの 3 系統および食用ウラベニホテイシメジを検出する必要があることから、マルチプレックス定性リアルタイム PCR 法の開発を行った。それぞれ特異的に検出可能であり、検出限界(LOD)は 20 コピー付近であった。

(2) ツキヨタケについては、毒性を持つ分類学上の近縁種が存在しないことから、ツキヨタケのみに特異性が高いプライマー・プローブを設計したところ、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケを含む市販食用きのこには交差反応しない、ツキヨタケ特異的な検出が可能であることが明らかになった。検出限界は、別途構築した標準プラスミドを用いた検討から数百コピー程度であった。

また、いずれの場合も PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent によって抽出した簡易抽出 DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR を行った場合も、抽出キットを用いて DNA 精製した場合と同様の結果が得られ、迅速なリアルタイム定性リアルタイム PCR 法としても期待されることが示唆された。

#### 高等植物による食中毒情報の収集と遺伝子鑑別法の適応

本年度は、青森県で発生した患者 2 名によるチョウセンアサガオによる食中毒の現地調査を行った。八戸保健所は、青森県産業技術センター野菜研究所によりチョウセンアサガオと推定した。本検体をこれまでに開発した遺伝子判別法を用いて同定を試みた。当該植物から抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR-RFLP 法を適応するとともに、*rbcL*(部分断片)、*matK*(部分断片)および *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を PCR にて増幅後、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をクエリーとし、DNA データベース (BOLD Systems, GenBank/ DDBJ/ EMBL) を用いたところ、食中毒原因植物はナス科植物 (ヨウシュチョウセンアサガオ) であると推定された。本遺伝子鑑別法が、実際の中毒原因植物にも有効に適用できることが確認できた。

#### 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

本研究では、海外において食品中の自然毒が問題になった事例、有毒な植物・きのこが食品へ混入した事例として EU RASFF データベースの情報をもとに調査し、どのような自然毒や食品が問題になりやすいのかを特定した。その結果のうち自然毒を含む植物が問題になった事例、きのこが問題になった事例を解析した。

植物が問題になった事例は、1982 ~ 2014 年 12 月 25 日の通知として 157 件が確認できた。主なものは、シキミ (有毒成分: アニサチン)、トロパンアルカロイド含有植物、青酸配糖体含有植物、イヌサフラン (コルヒチン)、ピロリジジンアルカ

ロイド含有植物、イヌハウズキ (グリコアルカロイド)、高濃度のクマリン、松の実による味覚異常 (通称パインマウス)、トウゴマ (リシン) などであり、件数ではトロパンアルカロイド含有植物、青酸配糖体含有植物、高濃度のクマリンが多かった。ソバ及びソバ粉へのトロパンアルカロイドの混入については過去に EU 内で食中毒が発生して問題になっており、フランス食品衛生安全庁 (AFSSA: 現フランス食品・環境・労働衛生安全庁) はソバ粉についてアトロピン及びスコポラミンの基準値が必要であると提案している。一方、青酸配糖体関連の大部分はビターアプリコットカーネルのアミグダリンに関する通知であり、混入というよりも製品そのものが問題の事例だが、中毒も発生しているため自然毒関連の問題としては注意が必要である。さらにビターアプリコットは健康志向 (がん予防) を目的とした製品として販売されていることも気に留めておく必要がある。

きのこが問題になった事例は植物よりも少なく 13 件のみであった。その中で影響地域が広がったのはルーマニア産の冷凍セイヨウタマゴタケ (*Amanita caesarea*) にタマゴテングタケが混入した事例で、通知したスペイン以外にポルトガルや米国に対しても通知されていた。他に、中国産の乾燥きのこへのテングダケの混入などが通知されていた。きのこの冷凍品や乾物は輸入されることもあると考えられるため、まれではあるものの毒きのこが混入する可能性があることに留意する必要がある。



#### **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。

また、INFOSAN や RASFF の提供する情報を継続的にモニターし、収集解析することも重要である。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

各分担報告書に記載した。

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし