

201426007B

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24～26年度総合 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27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

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

近藤 一成 3

II. 分担研究報告書

1. サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

泉谷 秀昌 11

2. 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

岡田 由美子 19

3. 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

豊福 肇 27

4. 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

近藤 一成 45

5. 植物毒の毒性評価と毒成分分析

紺野 勝弘 51

6. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

登田 美桜 59

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 69

I. 総括研究報告書

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 24～26 年度総合総括研究報告書

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

研究要旨

細菌類に関しては、海外より食品あるいは海外渡航者を通じて侵入し、国内で突発的な食中毒の発生を予防する、あるいは適切な対応をとるための施策について研究するために研究を行った。公衆衛生上重要な感染症であるサルモネラ症、赤痢、コレラや海外での集団発生事例も多く致死率が高いものの潜伏期間の長さから原因食品を特定しにくいリステリア症について、国内侵入に対する対応のために海外での流行情報収集と分離菌株の解析手法（PFGE、MLVA など）、解析データの収集とデータベース化を行った。また、食中毒アラート情報等を INFOSAN Emergency や RASFF より収集解析した。リスク評価モデルとして RiskRanger や iRisk の統計的手法を用いて、国内に侵入可能性のあるハザードと食品の組み合わせを相対リスクとして推定した。

自然毒に関しては、毎年発生する食中毒被害の低減のための検査法開発を行うとともに中毒事例を解析した。きのこ毒に関しては、中毒事例が特に多い 2 つのきのこ（クサウラベニタケとツキヨタケ）の分子系統樹解析を行い、迅速検査法 PCR-RFLP 法および確定検査補定性リアルタイム PCR 法を開発した。高等植物に関しても同様に、中毒が多い植物（チョウセンワガオ、バイケイソウ、トリカブト、スイセン）に対して迅速検査法 PCR-RFLP 法およびバーコード法による判別法を開発した。

研究分担者

泉谷 秀昌 （国立感染症研究所 細菌第一部）
岡田由美子 （国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）
豊 福 肇 （山口大学共同獣医学部 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 安全情報部）

A. 研究目的

細菌関係では、グローバル化に伴う人および食品の移動は、感染症アウトブレイクの発生時に大きな影響を与える。途上国ではインフラ整備が不十分なことから、飲料水・食品を介して主として渡航者経由でわ

が国にも侵入している。今後、このほかに輸入食品による国内発生も十分考慮すべき問題である。こうした海外での事例の情報収集を行い、国内侵入時の対応に備えることを目的し、特に、国内外の流行菌型の情報収集に力点を置き、それらの特徴を比

較・照合するなど、菌側の情報を活用することで、国内侵入を阻止する、または侵入時に速やかに検査等で対応できるようにすることは重要である。

自然毒関係では、自然毒においては、誤食の原因となる誤った鑑別や食中毒発生後の検査での原因食品の品種確定ができないことをなくすため、遺伝子の特異的な塩基配列に基づいた鑑別法を開発し整備することで、国内で発生する食中毒リスクを低減することができる。これらの研究を行うことができる。そのために必要を行う。

B. 研究方法

細菌・ウイルスによる食中毒リスクに関する海外情報収集や統計的手法によるリスク評価解析を豊福班員が担当した。細菌について、主にサルモネラ、赤痢菌、ナグビブリオなどを中心に情報収集並びに収集した分離菌株の解析を泉谷班員が、リステリアについて、情報収集と食品および患者分離株の解析と結果のデータベース化を岡田班員が担当した。

自然毒について、海外でリスクが懸念されている食品中の自然毒に関する情報収集と解析、および、食中毒の発生を低減するためには消費者への注意喚起及び自然毒の危険性の周知が有効であるとされていることからアンケート調査を登田班員が担当した。きのこおよび高等植物の鑑定のための新たな遺伝子判別法の開発およ

び中毒事例の解析を近藤班員、紺野班員が担当した。研究代表者は、全体のとりまとめを行った。

C. 研究結果と考察

1. 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

INFOSAN Emergency、INFOSAN 報告書から事例研究を行った。2012年から2015年2月に病原微生物によるアラート情報が提供された事例はサルモネラ5件、ノロウイルス1件、A型肝炎(HAV)ウイルス1件、*Listeria monocytogenes* (以下リステリアという)1件であった。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やモニタリング計画はないため、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。また、RASFFによる通報事例を調査研究したところ、ハザード別ではノロウイルスが18と最も多く、次いでサルモネラ、ヒスタミンが各10、HAV7、STEC O157:H7 とボツリヌスが各2件であった。

統計的手法を用いたリスク評価を行った。web-based のシステムである iRISK では、食品中のハザードのデータから集団レベルの健康 Burden を推定することができることを示した。

2. サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

過去 2・3 年の間に海外で発生した食中毒もしくは集団事例の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例をまとめた。20 事例のうち 18 事例がサルモネラによるものであった。鶏肉、七面鳥など比較的良好にみられる原因食品よりも、果物、魚介類、ナッツ類などの食品が原因となることの方が多かった。赤痢菌分離株の解析について、わが国での細菌性赤痢の多くは海外渡航による輸入例であるが、国内例も少なからず発生している。解析には、*S. sonnei* については PFGE よりも MLVA の方が解像度が高いことが示された。ナグビブリオ食中毒事例株の解析について、2013 年 9 月から 10 月にかけてナグビブリオ O144 による食中毒事例について調査解析した。原因食としてニシ貝スライスが疑われ、その原材料は中米産であった。本事例では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。

3. 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

食品や患者に由来する *Listeria monocytogenes* 合計 130 菌株について PFGE 解析を行った。Ascl を用いた場合の系統樹は、ApaI 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、Ascl 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。2009～2015 年に諸外国で発生した主なリステリア症集団事例は 22 例であった。原因食品は乳製品が 11 例、食肉製品が 4 例、野菜が 2 例、果物類が 2 例、その他の食品が 3 例、不明が 2 例であった。

4. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について、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、我が国で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を解析することで、食品への混入を懸念すべき高等植物が特定できただけでなく、優先順位をつけることもできた。中でも、幻覚性キノコは注意が必要である。RASFF データベースの調査解析から、1982～2014 年 12 月 25 日の通知として 157 件が確認できた。

消費者の「食品に関する問題の不安」についての情報として、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 56% のみで、行政的に管理され推定されるリスクも低い輸入食品や残留農薬よりも、毎年食中毒が発

生し死者も出ている自然毒の方が不安に感じる人の割合が低く、問題であると考えられた。「行政による情報提供の仕方」について、消費者の視点から、行政機関がどのような方法で消費者に向けて情報提供すれば効果的であるのかを調査した。小中学校での教育が効果的であるとの回答が多かった。

5. 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

毒のクサウラベニタケ (*E. rhodopolium*) は、形態的には多様性が報告されているものの、これまで遺伝子配列に基づいた分類解析は行われていなかった。今回、全国から集めた試料の ITS 領域解析結果から、日本におけるクサウラベニタケは 3 系統に分けられいずれも食用のウラベニホテイシメジとも異なることが判明した。系統樹解析の結果をもとに、迅速で簡便な判別法として、電気泳動の泳動パターンで判別する PCR-RFLP 法を、中毒事例の多いクサウラベニタケおよびツキヨタケについて開発した。DNA が断片化されている調理加工食品残渣にも適応できるように改良した。さらに、確定検査のためにリアルタイム PCR 法を開発し、食毒判別と系統分類が可能な方法を構築した。

6. 植物毒の毒性評価と毒成分分析

植物毒による食中毒を未然に防ぐ事を目的に、「自然毒のリスクプロファイル」の改

定を行った。中毒事例の現地調査を行った。トリカブトとニリンソウとの誤った判定で、機器分析からアルカロイドを定量し、アコチニンなどのアルカロイドを検出した。また、青森県でのチョウセンアサガオによる食中毒事例を調査した。簡便な遺伝子判別法として、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、ニラを判別するための PCR-RFLP 法を構築した。本方法は、青森県の中毒事例でも活用され、判別に用いることができた。

D. 結論

細菌類について、事例研究から、輸入時の検査だけで侵入を食い止めるのは難しく、患者発生を未然に防ぐまたは患者の発生を最小限に抑えるためには、INFOSAN や IHR からの早期情報の入手、必要な組織への入手した情報の迅速な伝達が必要である。赤痢菌の解析のほか、ナグビブリオの事例など、これまで国内ではあまり発生しなかった菌種による食中毒事例について PFGE および MLVA の有効性を検討し、一定の成果は得られた。リステリアの PFGE 解析において、制限酵素 *ApaI* を用いた解析は分解能が高く、*AscI* を用いた解析は菌株間の類似性の検出に優れていることが示された。食品由来株は血清型によりクラスターが形成される傾向が見られたが、患者由来株は

必ずしも同様の結果を示さなかったため、さらなるデータの蓄積が必要と思われた。

自然毒について、欧州及び FSANZ の公表資料・規制の情報をもとに、食品への混入・使用を懸念すべき高等植物・きのこをリスト化して特に注意を向けるべきものを特定した。消費者意識のアンケートから、食中毒の原因となる自然毒に関して消費者が正しく認識していないことが示唆された。きのこについて、クサウラベニタケは、日本国内では近縁種が 3 種存在することが明らかになった。ツキヨタケとともに、これら毒性を持つ簡便迅速な検査法として

PCR-RFLP 法を加熱調理サンプルまで適用可能な方法として確立した。また、定性リアルタイム PCR 法を開発した。高等植物についても、PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑別法により、迅速・簡便な有毒植物鑑定法を確立した。実際の中毒事例にも適応できることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

個別の報告書に記載

II. 分担研究報告書

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 24～26 年度総合分担研究報告書

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

研究要旨

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、これらは国内外でさまざまな汚染ルートを通じて多くの患者を発生させており、公衆衛生上重要な感染症である。本研究では、こうした細菌感染症を対象に、海外での流行情報を収集すること、ならびに国内侵入への対応のため、分離菌株の解析手法の検討を行うことを目的とする。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。毎年、欧米を中心に輸入食品もしくは多国間にまたがる食中毒事例が報告されており、その多くはサルモネラを原因物質としていた。わが国で海外からの侵入が危惧される食水系細菌の一つである赤痢菌は毎年 100 例前後の患者を発生させている。これら分離菌株について MLVA などの分子疫学解析手法を検討し、*Shigella sonnei* についてはこれまでに 900 株近い MLVA データベースを構築できた。また、海外からの輸入食材によって食中毒が発生したナグビブリオについても、分子疫学的解析手法について検討を行った。

A. 研究目的

サルモネラ症、赤痢、コレラなどは、汚染された飲料水・食品を介して感染する経口感染症の代表的なものである。

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。わが国では 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。とくに、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。

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。しかしながら、2001 年カキ、2008 年イカを原因食品とする食中毒事例など、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のが現状である。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。

上記の現状から、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

する。また、2013年に発生したナグビブリオの食中毒関連株について、分子疫学的解析手法の検討も行った。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果および考察

・海外食中毒情報

過去 2-3 年の間に海外で発生した食中毒もしくは集団事例の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例を表 1 にまとめた。表 1 に上げた 20 事例のうち 18 事例がサルモネラによるものであった。鶏肉、七面鳥など比較的良好とみられる原因食品よりも、果物、魚介類、ナッツ類などの食品が原因となることの方が多かった。また、中米、中東などの比較的近隣国に由来する原因食材によるものも見られた。例えば、事例#3 は、インドから輸入されたマグロを原因食品とした事例であり、血清型も S. Bareilly および Nchanga と複数の型の菌によって汚染されていた。こうしたわが国ではあまり見かけない食材、血清型による食中毒については、今後も注視していく必要がある。

・赤痢菌分離株の解析

表 1 事例#20 にもあるように、輸入食品によ

る細菌性赤痢食中毒が海外でも発生している。2007 年にもタイ産ベビーコーンを原因食とした赤痢菌食中毒が発生したことがあり、オーストラリア、欧州などが影響を受けた。わが国でも 2001 年に輸入カキ、2008 年に輸入イカを原因食品とする赤痢菌食中毒が発生した。わが国での細菌性赤痢の多くは海外渡航による輸入例であるが、国内例も少なからず発生している。輸入例と国内例との関連性を調べることは、原因不明の国内例に関して原因究明を行う際の助となりうる。

赤痢菌には *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* の 4 菌種があり、わが国で発生する患者は *S. sonnei* もしくは *S. flexneri* がほとんどである。*S. sonnei* については PFGE よりも MLVA の方が解像度が高く、本研究でもその有用性を示唆するデータが得られている。一部の菌株については、輸入例の渡航地域と MLVA (および PFGE) クラスターとの相関性が示唆されているが、データベース上のデータを増やすことでその精度を上げる試みを行っている。2012-2014 年の間に約 200 株の *S. sonnei* 株を解析し、データベースに追加した。これまでのデータベースへの登録数は約 900 である。*S. sonnei* 解析で比較的良好と使われる 8 遺伝子座 (SS1,3,6,9,10,11,13,23) を用いた全体の minimum spanning tree (MST) は図 1 上のようになった。ここでは 2 遺伝子座違いのバリエーション (double locus variant) を 1 つにまとめており、比較的大きな DLV クラスターが 3 つあった。A は南アジア由来株が多く占め、B は 2012 年レストランチェーン店による国内集団事例が含まれていた。C は南アジア以外の多くの地域からの株を含んでおり、遺伝子座を追加することでより詳細に分析することが必要である。現在 20 余りの遺伝子座を試験的に使用し

ているが、例えば、Ss5 遺伝子座を追加してクラスターCを再解析すると、2010年広域国内流行株、2012年トルコツア一事例関連株、2004年ハワイ機内食事例関連株などが別クラスターになる(図1下)。このように、各遺伝子座の分解能についての評価も今後の課題であろう。

・ナグビブリオ食中毒事例株の解析

2013年9月から10月にかけてナグビブリオO144による食中毒が相次いだ。原因食としてニシ貝スライスが疑われ、その原材料は中米産であった。本事例では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(図2)。

これらの株を対象にMLVAを適用した。コレラ菌で使用されている7か所の遺伝子座を用いてMLVAを実施した。結果として、患者株の大半を占め、起因菌と考えられた血清群O144株は全て同じタイプであった(図3)。また、PFGEが患者株と一致した食品株も同じMLVA型であった。一方その他のマイナーな患者株および食品株のほとんどは異なる型を示した。これはPFGEの結果とほぼ一致し、本事例関連株に限ってはMLVAも有用であると考えられた。ただし、今後種々のナグビブリオに本法が対応可能かどうかについては検討すべきであろう。

D. 結論

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、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。昨年度のナグビブリオの事例など、これまで国内ではあまり発生しなかった菌種による食中毒事例についてPFGEおよびMLVAの有効性を検討し、一定の成果は得られた。今

後の動向によっては、種々の事例に対応できるような試験系の構築を検討する必要があるだろう。赤痢菌については、地域によっては供試菌株数が少ない点もあるが、南アジア、東南アジア輸入例を中心に900株程度のデータベースが構築された。今後も、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。

菌株送付にご協力いただいた地方衛生研究所等の先生方に深謝いたします。

E. 研究発表

原著論文

- 1: Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-52}-carrying plasmids of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7545-7.
- 2: Chiou CS, Izumiya H, Thong KL, Larsson JT, Liang SY, Kim J, Koh XP. A simple approach to obtain comparable *Shigella sonnei* MLVA results across laboratories. *Int J Med Microbiol.* 2013 Dec;303(8):678-84.
- 3: Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group, Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results. *Euro Surveill.* 2013 Aug 29;18(35):20566.
- 4: Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P; MLVA Harmonization

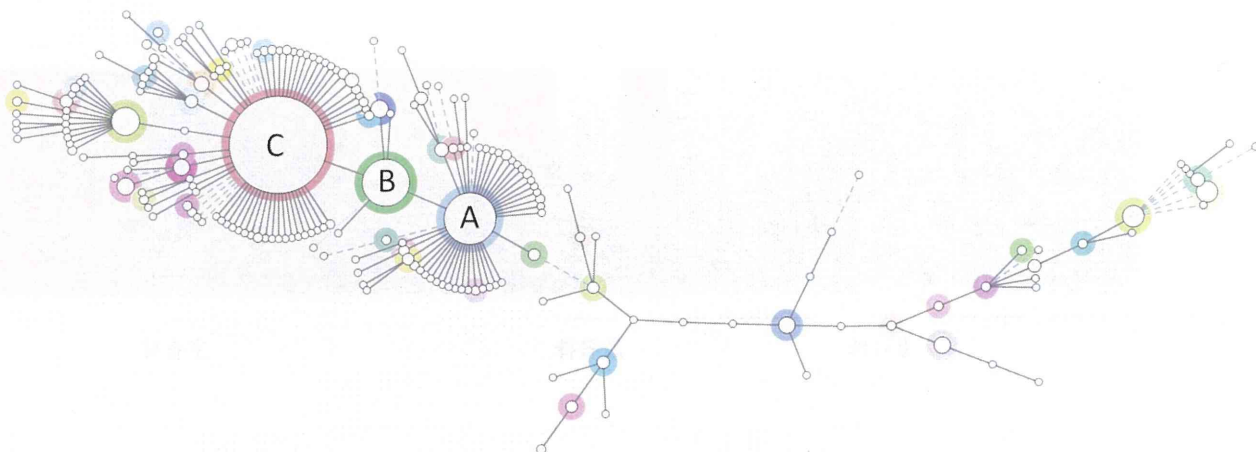
- Working Group. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. *Euro Surveill.* 2013 Aug 29;18(35):20565. Review.
- 5: Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg Infect Dis.* 2013 May;19(5):823-5.
- 6: 緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志、荒川英二、泉谷秀昌、大西真：ナグビブリオによる食中毒事例について—大分県。IASR、第35巻、134-135、2014年5月
- 7: 泉谷秀昌、荒川英二、森田昌知、大西真：2013年9～10月に発生した食中毒事例において分離されたナグビブリオ株について。IASR、第35巻、136、2014年5月
- 学会発表
- 1: 泉谷秀昌、多田有希、伊藤健一郎、齊藤剛仁、大西真： *Shigella sonnei* における分子疫学解析について。第86回日本感染症学会総会、2012年4月、長崎県長崎市。
- 2: 佐々木麻里、成松浩志、緒方喜久代、荒川英二、森田昌知、泉谷秀昌、大西真：ニシ貝を原因食品とするナグビブリオによる食中毒の事例解析。第48回腸炎ビブリオシンポジウム、2014年11月、北海道函館市。
- F. 知的所有権取得状況**
- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案
なし
- 3 その他
なし

表 1. 主な輸出入品関連事例

#	時期	起因菌	推定原因食品	発生国	患者	死者	その他情報
#1	2012年10月	<i>Salmonella</i> Thompson	スモークサー モン	オランダ	~1000	3	オランダおよび 米国でリコール
#2	2012年7月-9 月	<i>Salmonella</i> Braenderup	マンゴー	米国	127		メキシコでパッ ク
#3	2012年1月-7 月	<i>Salmonella</i> Bareilly, Nchanga	マグロ	米国	425		インドから輸入
#4	2011年8月-12 年9月	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥	オーストリ ア、ハンガ リー他7か 国	421		
#5	2011年12月	<i>Salmonella</i> Newport	スイカ	英国、ドイ ツ他6か国	54	1	
#6	2011年8月-12 月	<i>Salmonella</i> Bovismorbifica ns	タヒーニ(ゴマ ペースト)	米国	23		レバノンの製造 業者、カナダで も患者発生
#7	2011年7月-10 月	<i>Salmonella</i> Enteritidis	パインナッツ	米国	43		トルコ産
#8	2011年1月-8 月	<i>Salmonella</i> Agona	パイア	米国	106		メキシコから輸 入
#9	2008年2月-10 月	<i>Salmonella</i> Agona	ファストフー ド	イギリス、 アイルラン ド他7か国	163	2	アイルランド A 社
#10	2013年5月	<i>Salmonella</i> Montevideo, Mbandaka	Tahini (ごま ペースト)	米国	8		トルコから輸入
#11	2013年4月	<i>Salmonella</i> Saintpaul	キュウリ	米国	81		メキシコから輸 入
#12	2013年4月	サルモネラ	ペットフード	米国			米国から輸出
#13	2013年3月	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ペットフード	米国			米国から輸出
#14	2013年5月	<i>Salmonella</i> Saintpaul 他	カメ	米国	391		米国から輸出
#15	2013年8月	腸炎ビブリオ	ウニ	日本			中国から輸入
#16	2013年10月	<i>Salmonella</i> Heidelberg	鶏肉	米国、プエ ルトリコ	430		米国から輸出

#	時期	起因菌	推定原因食品	発生国	患者	死者	その他情報
#17	2014年1-8月	<i>Salmonella</i> Newport, Hartford, Oranienburg	チアパウダー	米国	31		カナダでも発生
#18	2013年10月 -2014年6月	<i>Salmonella</i> Newport, Hartford, Oranienburg, Saintpaul	チアパウダー	カナダ	63		米国でも発生
#19	2011-2013年	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥肉	欧州	234		PFGE 一致例
#20	2011年10月	<i>Shigella sonnei</i>	輸入バジル	ノルウェー	46		イスラエルからの輸入食品

図1. (上) 8か所の遺伝子座を用いた MLVA 全体像。DLV を1つにまとめて表示してある。
(下) クラスタ-C を Ss5 遺伝子座を加えて再解析した結果。



2010広域散発

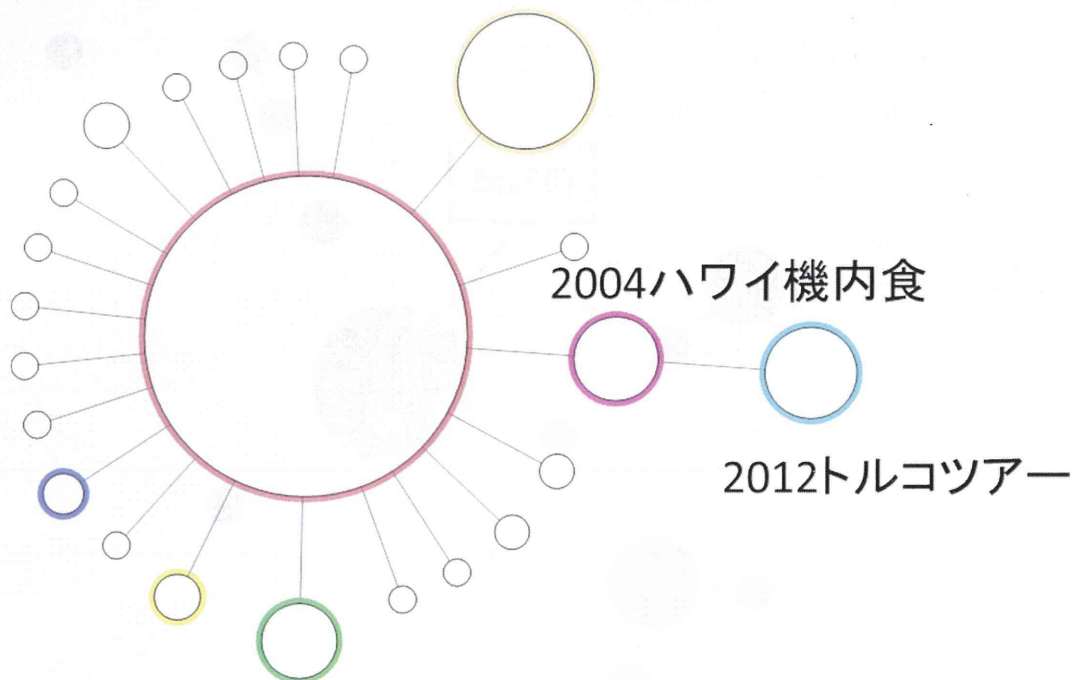


図 2. ナグビブリオによる食中毒事例関連株の PFGE 解析。患者株には下にバーを付けてある。それ以外は食品由来株。使用制限酵素は *NotI*。

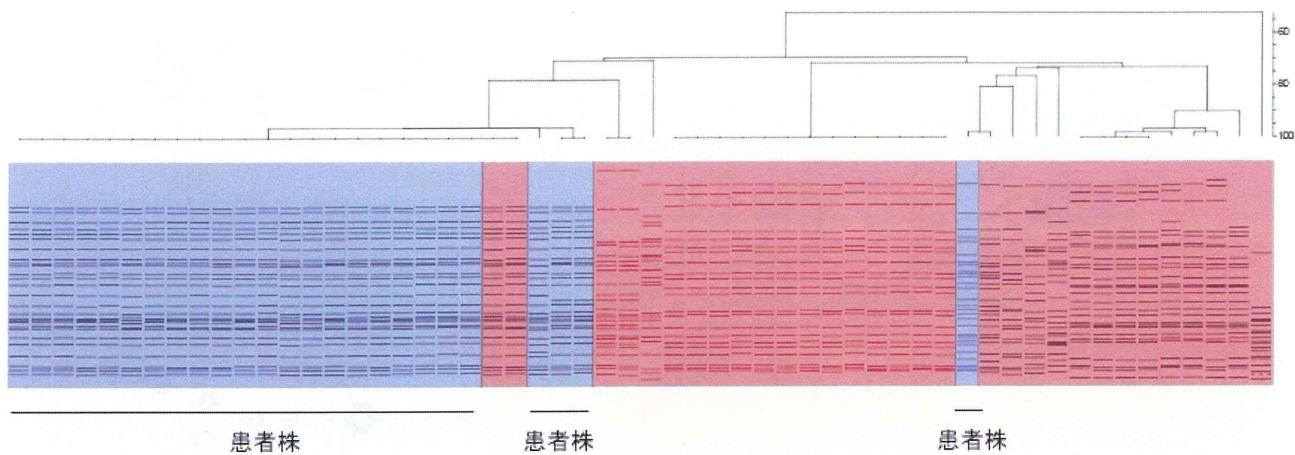
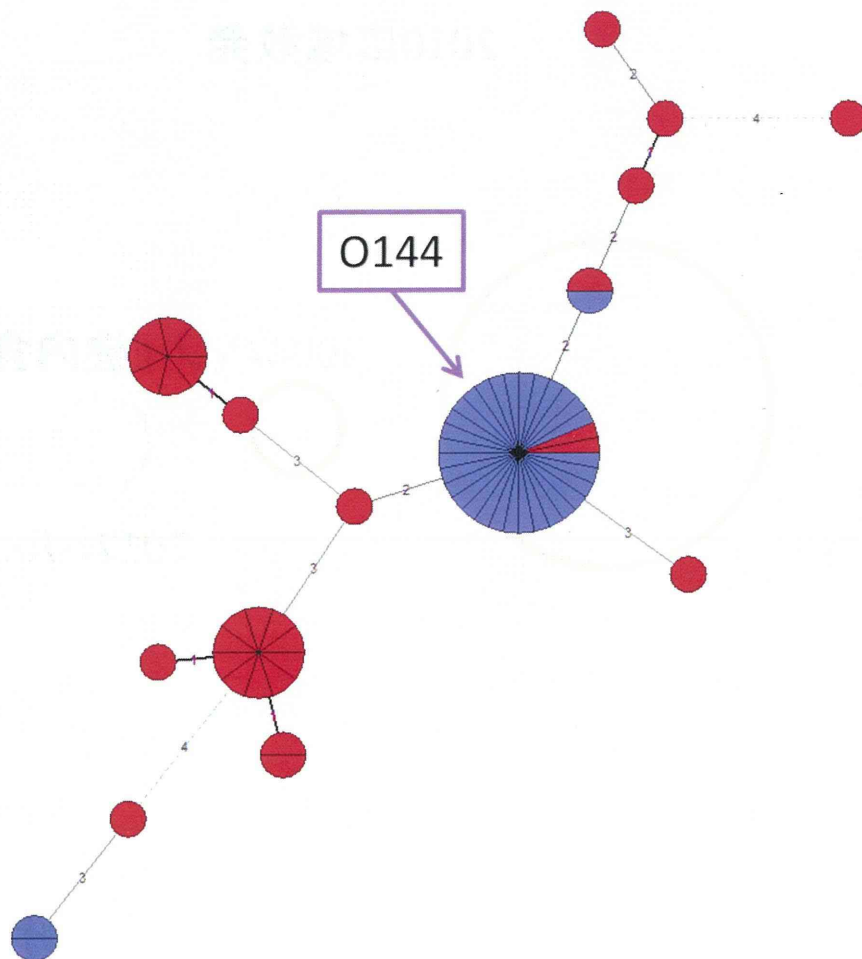


図 3. ナグビブリオによる食中毒事例関連株の MLVA の結果。



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 24～26 年度総合分担研究報告書

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

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
研究協力者 吉田麻利江 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
門田 修子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

汚染食品の摂取により人に媒介されるリステリア症は、グラム陽性の短桿菌である *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、食肉、乳及び乳製品等の農産物の一次汚染を防止することは困難である。また、本菌は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乳製品、水産加工品、野菜等様々な食品から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、欧州では数年に一度、北米では年に数回の頻度で発生しており、その原因食品も食肉製品や乳製品のみならず、セロリ、メロン、リング菓子等が知られている。現在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1か月から最長3か月と長期にわたるため、原因食品の同定は大変困難である。

現在国内では、腸管出血性大腸菌症や赤痢等について、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おり、国際的にも同様の手法が米国 Center for Disease Control and Prevention(CDC) を中心に行われている。本研究では、平成 24 年度より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、国内散发例の原因食品究明に役立て得るデータベースの作成を目的として、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。

A. 研究目的

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 *Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は、動物の腸管内、土壌、河川水や食品工場、冷蔵庫内など様々な環境に存在している。また、本菌は高度な環境抵抗性をもち、-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存能を有し、食品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。ヨーロッパ諸国では数年に一度の頻度で、北米ではほぼ毎年リステリア症の集団事例が見られている。2008年にはカナダで、1工場で製造されたローストビーフ等の食肉加工品数品目を原因食品とする集団事例により、57名が発症、うち23名が死亡した。平成23年9月には米国でカンタロープメロンを原因食品とした複数の州にまたがる集団事例が発生し、146名の患者数、うち30名の死亡が報告された。また、デンマークでは2013年から2014年に冷製肉を感染源とする患者数41人、死者17人に上る集団事例が発生し、2014年に米国ではもやしやリンゴ菓子製品等を原因とした集団事例が発生している。その他、過去の事例における原因食品としてはナチュラルチーズ等の乳製品、スモークサーモン等の水産物及びその加工品、ローストビーフ等の食肉及びその加工品、サラダ等様々な食品が報告されている。国内においては、リステリア症は報告義務のない疾患であり、その患者数は明らかでない。2004年に国立医薬品食品衛生研究所により実施されたアクティ

ブサーベイランスでは、年間約80例と推定された。また、感染症研究所による院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた調査では、2008–2011年の患者数は307例で、人口100万人当たりの推定罹患率は約1.6人であった。一方集団事例については、日本国内ではこれまでほとんど報告されておらず、2001年の国内産ナチュラルチーズを原因食品とする1例が確認されているのみである。

リステリア症は下痢や風邪様症状を主症状とする非侵襲性リステリア症と流産、髄膜炎、敗血症等を引き起こす侵襲性リステリア症に分類され、潜伏期間は前者で数日、後者は長い場合には3ヶ月にも達する。健康成人では非侵襲性リステリア症にとどまることが多いが、高齢者、基礎疾患を持つ人、妊産婦等のハイリスクグループでは侵襲性リステリア症を引き起こす。潜伏期間は前者で数日、後者は長い場合には3ヶ月にも達する。そのため、侵襲性リステリア症の散发事例で原因食品が特定されることはほとんどない。国内で流通する食品がある程度本菌に汚染されていることが過去の研究で明らかとなっている。分担研究者らが実施した平成19年度の厚生労働科学研究「輸入食品における食中毒菌サーベイランス及びモニタリングシステム構築に関する研究」の分担研究「輸入非加熱食肉食品の *Listeria monocytogenes* による汚染状況」では、国内で一般に流通している生ハム、サラミ等の非加熱食肉製品68検体中4検体(5.9%)から、平成21年度の食品等検査費で実施された「一般流通食品におけるリステリア汚染実態調査」に

においては市販非加熱喫食食品 1500 検体中 21 検体 (1.4%) から本菌が分離された。輸入時の検疫で非加熱食肉製品とナチュラルチーズのリステリア汚染検査がなされているものの、輸入量の一部にとどまっている。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、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、国内発生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計 130 株を用いた *L. monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的解析を実施した。また、海外における集団事例について、原因食品、患者数等の情報収集を行った。

B. 研究方法

1. 検体

初年度には、日本国内で分離された *L. monocytogenes* 64 菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株 3 株、国内産食品由来株 42 株及び輸入食品由来株 17 株、調理環境由来株 1 株及び標準菌株(ATCC19115 株)1 株であった(平成 24 年度報告書 表 1)。次年度には、日本国内で分離された *L. monocytogenes* 61 菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株 2 株、国内産食品由来株 45 株及び輸入食品由来株 8 株、調理環境由来株 1 株及び標準菌株(ATCC19115 株)1 株であった(平成 25 年度報告書 表

1)。最終年度には、平成 25 年の CDC プロトコールの改正に伴い実施方法の改変と、総括的な結果解析のために過去 2 年に実施した株も含めて再検討を行うこととし、*L. monocytogenes* 合計 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(平成 26 年度報告書 表 1)。それらのうち、牛肉は 11 検体から、豚肉は 14 検体から各 2 株、鶏肉は 12 検体から各 2 株分離されたものを用いた。血清型の内訳は、1/2a が 64 株、1/2b が 21 株、1/2c が 25 株、4b が 13 株、その他の血清型が 6 株、血清型不明株が 2 株であった。

2. PFGE による分子型別

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を作成し、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(平成 25 年度報告書 別添 1)。この方法により、研究室保有株よりプラグを作成し、PFGE 解析を実施した。制限酵素は *ApaI* と *AscI* を用いた。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 1.0 に設定した。