

201522029A

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

我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と 管理措置に関する研究

平成27年度 総括・分担研究報告書
(H27-食品-一般-007)

研究代表者 近藤一成

平成28(2016)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書

我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究

近藤 一成 3

II. 分担研究報告書 11

1. 赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

泉谷 秀昌 13

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 21

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 33

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 61

5. 植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

紺野 勝弘 71

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 79

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）

「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」

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

研究要旨

本研究は、輸入食品の増加に伴う検査品目数の急激な増加に対応して、リスクの程度に応じた検査体制の構築を行うための研究である。そのため、調査研究から諸外国のリスク管理体制のランク付け、食中毒アウトブレイクに対応するための菌株情報収集や解析、また、自然毒では、植物性自然毒の国民への情報発信のためのデータベース更新、遺伝子鑑定法の開発改良を行った。

微生物関連では、Hazard の特性、米国及び EU での輸入時の違反データ、国の NFCS の performance、喫食、曝露データ等を網羅した半定量モデルを構築した。作成したモデルに *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* に絞り、また違反が多い食品カテゴリーに絞ってモデルにデータを実装しリスクランキングを行った。リスク管理の十分でない位置きからの食品に対して、より効果的効率的な輸入時の微生物モニタリングが実施できる。赤痢菌 *Shigella sonnei* の分子疫学解析を行った。本菌は mutiocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析が報告されており、本研究でも MLVA を中心に細菌性赤痢の輸入例および国内例関連株のデータ収集および蓄積を行った。その結果、カンボジア輸入例株について当該 MLVA グループならびに薬剤耐性パターンに変化が生じていることが明らかとなった。リステリア症散発事例の原因解明を目的として、患者及び食品由来株について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。相同性 75%以上を同一クラスターとした結果、全菌株は 10 のクラスターに分類された。各クラスターは血清型との強い相関を示すものが多かった。

自然毒関係では、高等植物について国民向け情報発信である「自然毒リスクプロファイル」データベースを更新した。きのこについて更新作業中である。有毒植物の遺伝子鑑別法を実際の中毒原因植物試料（コバイケイソウ）に適用して有効であることを確認した。中毒事例が特に多いクサウラベニタケの RPB2 領域シーケンス解析を行い、精度を高めた分子系統樹解析と海外種と比較した。その結果、日本のクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium*) は、3つのグループに分類され、また、既に形態と遺伝子解析がされている欧州 *Entoloma rhodopolium* とは明確に異なることが明らかになった。迅速簡便な検査法開発の一環として、LAMP 法を用いて目視判別（蛍光）で判定可能な方法を、ツキヨタケをモデルに検討した結果、可視光下においても緑色蛍光が観察され高感度に検出可能であると示唆された。

A. 研究目的

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

諸外国の食品安全管理体制調査結果から、それが十分でない国からの輸出食品の検査を強化することで、効率的な監視体制を構築し、我が国に侵入する生物学的ハザードのリスクを低減させる。そのために、諸外国での食中毒発生状況、食品の汚染実態、検査監視体制、管理措置等について調査解析し、検査のリソースをよりハイリスクな国、食品及び生物学的ハザードの組合せに配置できるように、評価する仕組みを構築することを目的とした。

赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

国内外の生物学的ハザードに関して情報収集および原因物質の解析を行い、ハザードの特定に有用な情報もしくは解析法の検討を行う。さらに、ハザード発生時に必要な管理措置につながる対応への一助とすることを目的とする。食品衛生法における細菌性食中毒の原因物質として現在 15 種類ほどの菌種が挙げられている。本年度は海外からの侵入リスクが高いと考えられる赤痢菌をモデル対象として研究した。赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、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、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いる。当該国ではサーベイランス体制が不十分なため細菌性赤痢の発生状況を知ることは極めて困難である。従って、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは本感染症への対策を検討するに当たり重要な工程と考えられる。本研究では、国内外の細菌性赤痢の発生状況に関する情報収集、ならびに国内外の分離菌株に関する分子疫学的解析手法の検討及びデータベースの構築を行うことを主たる目的とする。

リステリアのリスクに関する研究

脳脊髄膜炎及び敗血症を主な症状とするリステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes* (以下リステリア) は、芽胞非形成のグラム陽性桿菌である。人リステリア症は、発症時の致死率が 20-30%にも及ぶ。また、妊産婦の感染時には流死産を引き起こすことが知られている食品媒介感染症である。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。日本国内においては、リステリア症は報告義務のない疾患であり、正確な患者数は不明である。人口 100 万人当たりの推定罹患率は約 1.6 人となり、欧米諸国と比べて極端に低くはない数字であった。一方、日本国内では集団事例は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。一方で、過去の調査により、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明らかとなっている。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 148 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。

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

中毒事故の情報を収集し、事故の詳細を明らかにすることにより、今後の中毒防止対策の一助とする。特に、発生した現地に赴き、関係者と接触することで、現地では得られない情報や原因植物試料の入手も可能となる。

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

きのこによる食中毒被害低減と原因きのこ特定のための施策として重要なことは次のように考えられる。1 つは、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、もう一つは迅速な検査方法の確立と整備である。日本国内で食中毒被害が多く発生する、クサウラベニタケとツキヨタケのうち、クサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium*) は、一般には複合種と言われる複数の種を含むと考えられており、分類学的にも整理されていない。文献および遺伝子データベース情報から、欧州における *Entoloma rhodopolium* として公開されて

いるものと同一かどうかを含めて、現在まで詳しく検討されたことはなかった。そこで、本年度は、日本国内における、クサウラベニタケ分類をさらに精度よく行い、欧州のそれと比較解析を行うために、新たに RPB2 領域 (RNA polymerase II second largest subunit) の配列を解析した。

また、野外においても実施可能な迅速検査法を検討するために、LAMP 法を用いて、目視判別可能な手法を試みた。

B. 研究方法

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

評価モデル構築の基礎として、文献をレビューした。その結果を、国別にランキング付けを行った。本研究の目的に活用できるか調査するため、公表されているリスクランキングツールをレビューした。

赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

食中毒発生状況は、論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考に情報収集を行った。分離菌株の解析は、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、クラスター解析を行った。薬剤感受性試験はディスク法を用いて実施した。

リステリアのリスクに関する研究

日本国内で分離された *L.*

monocytogenes 148 菌株を解析に使用した。菌株解析は、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。また、2015 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。

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

中毒情報の収集は、新聞などのメディア情報をもとに連絡して聞き取り調査を行った。また、現地調査を行った。試料が得られた場合は、毒成分分析や遺伝子鑑別によって植物種を同定する。中毒原因植物の DNA 分析による同定として、平成 24 年 4 月に石川県で発生した中毒の原因植物を入手し、以下の 2 通りの分析を行った (1) PCR-RFLP 法 (2) BLAST 検索による植物種の推定。

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

RPB2 用プライマー対 (rpb2-6f, rpb2-7r) を用いて、1 回目の PCR 反応を行い、rpb2-6fi, rpb2-7ri プライマー対を用いて nested PCR を行った。増幅産物はシーケンス解析して系統樹解析した。それを、昨年度までに行った ITS 領域の系統樹解析と合わせて、欧州のクサウラベニタケおよび近縁種と比較した。

ツキヨタケについて、擬似食用試料 (シイタケ、ヒラタケ、ムキタケの混合、および、シメジ、エリンギ、ナメコ、エノキの

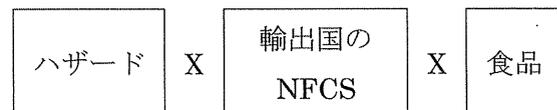
混合) 中に混入するツキヨタケの検出可能性を確認した。検出方法は、Short PCR-RFLP 法およびリアルタイム PCR 法で行った。いずれの試料も加熱 30 分間および人工消化液 60 分間処理したものをダイレクト DNA 抽出した液を検体とした。

ツキヨタケの野外検査可能な LAMP 法の検討では、4 種のプライマーを設計して、検出は、可視光下での緑色蛍光の観察または可視光励起して蛍光を観察の 2 通りで行った。

C. 研究結果および考察

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

次の 3 要素を掛け合わせたモデルで、ハザード、輸出国の National Food Control System (以下「NFCS」という。) 及び食品ごとにスコアをつけ、それらを乗じてリスクランキングを試みた。



なお、対象国は我が国の輸入時データで、届出件数または重量の上位の国を評価対象とした。今回モデルを作成して病原菌、食品カテゴリー、輸出国別のリスクランキングを試みたが、課題も明らかになった。食品分類をどこまで細かくするか、NFCS の performance データが限られていて、今ある情報から予測せざるを得ない、輸入量は届出データか重量データか、などである。結果および考察の詳細については、分担報告書を参照のこと。

赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

赤痢菌は平成 11 年（1999 年）の食品衛生法施行規則の改正に伴い、コレラ菌、チフス菌、パラチフス A 菌とともに病因物質に追加された。以後、昨年度までに赤痢菌を病因物質として発生した食中毒事例は 23 件に上る。米国の 2013 年の調査では、赤痢菌患者の発生状況はサルモネラ、カンピロバクターに次いで第 3 位となっている。多くが魚介類、生野菜による。2015 年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は 119 株であった。うち、輸入例は 55 株で、主な渡航先は東南アジア 26 株、南アジア 18 株、アフリカ 4 株などであった。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。近年、カンボジア輸入例の株の変化に注目していたが、上記グルーピングならびに薬剤耐性パターンについて、当該株を解析した。その結果、2012 年までの株では薬剤耐性、特にニューキノロン（シプロフロキサシン：Cp）への耐性が見られなかったのに対し、2013 年以後の株ではすべて Cp 耐性で、なおかつストレプトマイシン（S）、テトラサイクリン（T）、ST 合剤（Sx）耐性を示す多剤耐性を示す株も多く見られた。

株の変遷が生じていることを捉えることができることが明らかとなった。

リステリアのリスクに関する研究

相同性 75%以上の株を同一クラスターとして分類すると、血清型 1/2a に属する 69 株は 5 つのクラスターに分類された。

第 1 クラスターには 19 株が属しており、由来となる食品等は牛肉、豚肉、鶏肉、食肉製品、水産物、乳製品、その他であり、その内 2 株は患者由来株であった。第 2 クラスターには水産物由来の 4 株が属していた。第 3 クラスターには 20 株が属しており、由来食品は牛肉、豚肉、鶏肉、食肉製品、水産物及びその他であり、患者由来株はその内 5 株であった。第 4 クラスターは 25 株が属しており、由来食品は牛肉、豚肉、鶏肉、水産物であり、患者由来株はその内 4 株であった。第 5 クラスターは、フランス産チーズ由来株 1 株のみで構成されていた。本研究でのリステリアの PFGE 解析により、患者由来株と完全に PFGE パターンが一致した食品由来株が複数検出された。これらの食品由来株と患者由来株の同一性を確認するには、Whole Genome Sequence 等の、PFGE 以上に詳細な解析を行う必要があるものの、今回用いた手法が、人リステリア症の原因食品と関連している可能性の高い株のスクリーニングに有用であることが示された。

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

例年に比べ、発生事例は少なかったが、イヌサフランによる死亡例が 2 件発生したのは特記される。また、レンゲツツジはこれまでに報告がなく、本年度初めて発生したものである。レンゲツツジを含むツツジ科植物にはグラヤノトキシン類が含まれ、しばしば中毒事故が発生する。しかし、これまでレンゲツツジによる中毒は報告されていなかった。身近に豊富にあるので、今後注意が必要である。

平成 24 年 4 月、石川県で発生した中毒の原因植物が入手できたので、本法を適用して、植物種の同定を試みた結果、入手した植物由来の PCR 増幅産物は制限酵素により消化され、バイケイソウ由来の PCR 増副産物と同様の泳動パターンを示すことが確認できた。*matK* を BOLD Systems にて植物種を推定したところ、食中毒原因植物は *Veratrum oxysepalum* (バイケイソウ) であると推定された。また、*trnH-psbA* intergenic spacer 領域の配列を GenBank の BLAST 検索を行ったところ、同様の結果が得られた。

以上の結果から、本 DNA 鑑別法 (PCR-RFLP 法) が、実際の中毒原因植物にも有効に適用できることを確認した。

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

RPB2 領域を用いた系統分類を新たに行った。その結果、日本国内から採取した *Entoloma rhodopolium* は 3 つのグループに分離し、clade-I, -II, -III はそれぞれ *Entoloma majaloides*, *Entoloma sinuatum*, 菌根菌 P09083 に近いところに分類された。また、日本のクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium* と考えられてきたきのこ) は *Entoloma rhodopolium* とは異なるものである可能性も示唆された。

また、多種の市販食用きのこ中に存在する毒のツキヨタケを検出できるか検討するために、擬似試料を用い short PCR-RFLP 及びリアルタイム PCR 法を検討した。その結果、ツキヨタケを含む擬似試料では全てツキヨタケのバンドを検出でき (*DrdI/HincII* 処理)、リアルタイム PCR

法においてもツキヨタケのバンドを全てのツキヨタケ含有擬似試料で検出できた。このことから、本 2 つの方法は、共に信頼性の高い方法であることが確認された。

D. 結論

Hazard の特性、主要違反国のデータ、NFCS の performance、喫食、曝露データ等を網羅した半定量モデルを構築した。

Salmonella, *Listeria monocytogenes* に絞りと、また違反が多い食品カテゴリーに絞ってモデルにデータを用いてリスクランキングを行い、データや情報から管理が不十分と評価された国から輸入される食品の検査を強化することにより効果的な輸入食品に起因するリスクの低減化が図れると考えられた。

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。今後も海外の発生状況の情報収集が必要である。また、国内の監視体制の整備のため、分離菌株の解析手法の検討ならびにデータベースの拡充を図る必要がある。

本研究でのリステリアの PFGE 解析により、血清型 1/2a に属する患者由来株で明太子由来株と完全に PFGE パターンが一致した株が 1 株、豚肉・鶏肉・マグロすきみ及びマグロ刺身と完全に一致した株が 1 株検出された。これらの食品由来株と患者由来株の同一性を確認するには、Whole Genome Sequence 等の、PFGE 以上に詳細な解析を行う必要がある。

有毒植物による食中毒情報を収集し、そ

の結果をもとに、「自然毒のリスクプロファイル」の改訂版を作成し、厚労省ホームページに掲載した。きのこについても改訂作業を行っている。PCR-RFLP法を利用した迅速・簡便な鑑定法を確立した。簡便な操作および短時間で、容易に種を同定できるので、食中毒患者への初期対応、治療のためにも有用と考えられる。また、調理済みサンプルにも適用可能なので、従来の形態学的鑑定や化学分析と比較して有用性が高いと思われる。中毒が多いクサウラベニタケ

の再分類を行い、欧州と明らかに異なり、別種である可能性が示唆された。

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

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）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 27 年度分担研究報告書

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

病原体に汚染された食品等を介して発生する細菌感染症にはサルモネラ症、赤痢、コレラなどがある。これらは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している。本年度は赤痢菌、とくに *Shigella sonnei* の分子疫学解析を重点的に進めた。本菌は *mutiocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) による解析が報告されており、本研究でも MLVA を中心に細菌性赤痢の輸入例および国内例関連株のデータ収集および蓄積を行った。これまでに延べ約 1,200 株のデータを収集した。輸入例関連株を用いて *S. sonnei* の MLVA 法で得られたデータの検討を行った結果、共通に使われる 8 か所の遺伝子に 2 か所を加えることで、3 つの大まかなグループに大別することができた。この中で、カンボジア輸入例株について当該 MLVA グループならびに薬剤耐性パターンに変化が生じていることが明らかとなった。本研究は、病原体の継続的な分子疫学解析並びにデータの蓄積が海外から侵入してくるハザードへの対応に欠かせないことを示唆している。

A. 研究目的

食品および食材、ならびに人の流れがグローバル化してきている中で、食品の生物学的ハザードについても多様化、複雑化が見られる。食品における生物学的ハザードについては主に食中毒という形で我々の前に出現するが、その発生原因及び態様はさまざまである。細菌などの微生物によるハザードは、食品流通・加工ならびに原因物質などの多様性・複雑性から多岐にわたり、その要因の特定を困難なものにしている。本研究では、国内外の生物学的ハザードに関して情報収集および原因物質の解析を行

い、ハザードの特定に有用な情報もしくは解析法の検討を行う。さらに、ハザード発生時に必要な管理措置につながる対応への一助とすることを目的とする。

食品衛生法における細菌性食中毒の原因物質として現在 15 種類ほどの菌種が挙げられている。本年度は海外からの侵入リスクが高いと考えられる赤痢菌をモデル対象として研究した。

赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、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、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いる。当該国ではサーベイランス体制が不十分なため細菌性赤痢の発生状況を知ることは極めて困難である。従って、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは本感染症への対策を検討するに当たり重要な工程と考えられる。本研究では、国内外の細菌性赤痢の発生状況に関する情報収集、ならびに国内外の分離菌株に関する分子疫学的解析手法の検討及びデータベースの構築を行うことを主たる目的とする。

B. 研究方法

国内事例については感染症発生動向調査、食中毒発生状況などを、海外事例については論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考に情報収集を行った。

分離菌株の解析については、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。薬剤感受性試験はディスク法を用いて実施した。

C. 研究結果および考察

赤痢菌は平成 11 年 (1999 年) の食品衛

生法施行規則の改正に伴い、コレラ菌、チフス菌、パラチフス A 菌とともに病因物質に追加された。以後、昨年度までに赤痢菌を病因物質として発生した食中毒事例は 23 件に上る (表 1)。この中には 2001 年、2008 年、2011 年の事例など、同一事例と思われる事例が複数事例として報告されている。これはそれぞれの事例に関する製造所、飲食店等が異なることによるものと考えられるが、事例間の関連性を結び付ける疫学情報および菌の解析情報について何らかの問題があることが窺える。

一方、海外における細菌性赤痢集団事例で近年発生した比較的大きな事例を表 2 にまとめた。このうち、2004 年米国の事例は、わが国の食中毒事例とも対応している。2007 年に発生した事例は、国内発生はなかったがわが国でも侵入が懸念され、通知が出される影響があった。

米国の 2013 年の調査では、赤痢菌患者の発生状況はサルモネラ、カンピロバクターに次いで第 3 位となっている (表 3)。

米国 CSPINET (Center for Science in the Public Interest) の 1990-1999 年の調査では、毎年 2、3 の食中毒事例が起きており、多くが魚介類、生野菜による (表 4)。

2015 年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は 119 株であった。うち、輸入例は 55 株で、主な渡航先は東南アジア 26 株、南アジア 18 株、アフリカ 4 株などであった。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。

これまでに構築したデータベース内の *S.*

sonnei 輸入例株について、MLVA 解析によるグルーピングと渡航地域先の関連性について検討した。その結果、10 遺伝子座を用いて 3 遺伝子違いを基準にコンプレックを形成させる (MLVA10) と、大きく 3 つのグループに分かれることが示された (図 1)。中央のグループ (a) は南アジア由来が大勢を占めた。下の小さなグループ (b) は東南アジア由来が大勢を占め、これらは東南アジアの中でもフィリピンなどの東寄りの国を多く含んでいた。残りのグループ (c) は東南アジア由来が多かったが、東アジアなどの地域由来の株も含まれていた。

近年カンボジア輸入例の株の変化に注目していたが、上記グルーピングならびに薬剤耐性パターンについて、当該株を解析した (図 2)。その結果、2012 年までの株では薬剤耐性、特にニューキノロン (シプロフロキサシン : Cp) への耐性が見られなかったのに対し、2013 年以後の株ではすべて Cp 耐性で、なおかつストレプトマイシン (S)、テトラサイクリン (T)、ST 合剤 (Sx) 耐性を示す多剤耐性を示す株も多く見られた。また、MLVA10 によるグルーピングから、2012 年以前はグループ c であったのが、2013 年以後の株は全てグループ a に属することが明らかとなった。

以上のように、MLVA 解析から個々の事例内および事例間の異同および類縁性を示すことができることに加え、大まかな分類も可能であることが示唆された。その中でカンボジア由来株のように株の変遷が生じていることを捉えることができることが明らかとなった。

近年、ゲノム解析が身近になり、*S. sonnei* においてもゲノムベースによる系統解析が

なされている。今後は MLVA 解析の結果と系統解析との関連性について検討することで MLVA 解析の妥当性などの特徴づけを考慮する。また、国内例と輸入例との比較を通じて原因不明の国内例の原因推定の可能性について検討する予定である。

現在 *S. sonnei* MLVA データベースは延べ 1,200 株ほどになっているが、データ数が少ない地域もあり、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。

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。今後も海外の発生状況の情報収集が必要である。また、国内の監視体制の整備のため、分離菌株の解析手法の検討ならびに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

論文発表

Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol*

Infect. 2015 Nov 11:1-7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26554547.

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. 赤痢菌による食中毒事例（食中毒発生状況）

年	都道府県名等	発生日	発生場所	原因食品	原因施設	摂食者数	患者数	死者数
2011	山形県	8月19日	山形県	不明(飲食店で提供された食事)	飲食店	不明	7	0
2011	山形県	8月19日	山形県	不明(原因施設で提供された食事)	飲食店	不明	2	0
2011	山形県	8月19日	山形県	不明(原因施設で提供された食事)	飲食店	不明	8	0
2011	宮城県	8月20日	宮城県	不明(製造所の食品)	製造所	不明	26	0
2011	山形県	8月20日	山形県	不明(原因施設で提供された食事)	飲食店	不明	1	0
2011	山形県	8月22日	山形県	不明(原因施設で提供された食事)	飲食店	不明	2	0
2011	山形県	8月22日	山形県	不明(原因施設で提供された食事)	飲食店	不明	8	0
2010	岡崎市	10月9日	愛知県	不明(平成22年10月7日昼食及び夕食)	飲食店	5	2	0
2008	大阪府	7月6日	国外	不明	不明	16	9	0
2008	福岡市	7月19日	福岡県	不明(コース料理)	飲食店	35	23	0
2008	福岡市	8月7日	福岡県	不明(居酒屋料理)	飲食店	5	3	0
2008	福岡市	8月14日	福岡県	不明(出前料理)	飲食店	855	105	0
2004	栃木県	5月6日	栃木県	不明(飲食店提供食事)	飲食店	2082	14	0
2004	千葉県	8月25日	国外	不明(機内食)	その他	45	17	0
2003	豊田市	9月29日	愛知県	不明(寿司)	飲食店	1191	10	0
2002	山形県	3月6日	山形県	調理実習で調理された食品	学校給食施設・単独調理場・小学校	124	17	0
2002	岐阜県	5月26日	岐阜県	不明(飲食店の食事及び調理パン)	飲食店	不明	19	0
2001	山口県	11月26日	山口県	生かき	製造所	不明	2	0
2001	山口県	11月28日	山口県	生かき	製造所	不明	13	0
2001	山口県	12月1日	国内不明		不明	不明	4	0
2000	千葉県	4月4日	国外	不明	不明	61	27	0
2000	愛媛県	10月14日	愛媛県	にぎり寿司	飲食店	205	103	0

表 2. 海外の主な細菌性赤痢集団事例

年	国	発生月	患者数	関連施設・食品
2014	米国	5月	280	
2012	米国	5月	43	ブリッジセンター
2011	ノルウェー	10月	46	輸入バジル
2008	米国	9月	41	湖
2008	オーストリア	7月	22	国内ツアー
2007	デンマーク、オーストラリア		227	タイ産ベビーコーン
2004	米国	8月	45	機内食
2004	スペイン	3月	14	ホテル
2000	米国	1月	406	仕出し

表 3. 米国食品由来感染症発生状況 (2013 年)

起因菌	患者数	対10万人	入院数	入院率	死亡数	死亡率
カンピロバクター	6621	13.82	1010	15	12	0.2
リステリア	123	0.26	112	91	24	19.5
サルモネラ	7277	15.19	2003	28	27	0.4
赤痢菌	2309	4.82	450	19	3	0.1
STEC O1157	552	1.15	210	38	2	0.4
STEC non-O157	561	1.17	76	14	2	0.4
ビルリオ属菌	242	0.51	55	23	2	0.8
エルシニア	171	0.36	55	32	4	2.3

表 4. 細菌性赤痢集団事例 (米国、1990-1999)

Date	Vehicle	Etiology	Reported Cases	States/ Provinces
Jun-90	Fish	Shigella sonnei	144	1:CA
Sep-90	Shellfish	Shigella sonnei	52	1:OH
May-91	Shellfish	Shigella group D	9	1:PA
Sep-91	Moose soup	Shigella sonnei	25	1:AK
July - Aug. 1992	Salad (vegetable)	Shigella flexneri	46	2:MI, OH
Jan-93	Shellfish (primarily oysters)	Shigella sonnei	95	1:TX
Aug-93	Mexican food	Shigella sonnei	84	1:TX
Sep-93	Dairy products	Shigella flexneri	38	1:IL
Mar-94	Baked goods	Shigella flexneri	6	1:CA
June - Aug. 1994	Scallions	Shigella flexneri	53	7
Jan-95	Chicken	Shigella	31	1:NY
Feb-95	Mexican food	Shigella sonnei	6	1:MD
May-96	Shellfish	Shigella flexneri	8	1:MD
Oct. - Nov. 1996	Muffins; doughnuts	Shigella dysenteriae	12	1:TX
July - Aug. 1998	Parsley	Shigella sonnei	491	4/2:ALB, ONT
Aug-98	Lettuce	Shigella sonnei	160	1:MN
Sep-98	Salsa	Shigella sonnei	58	1:CA
Jan-00	Five-layer dip	Shigella sonnei	403	10

図 1. *S. sonnei* MLVA10 解析。3 遺伝子違い (3 locus-variant) によるグループ化 (MLVA10-3LV)。

SEA, 東南アジア ; SA, 南アジア ; EA, 東アジア ; AFR, アフリカ ; LA, 中南米 ; EU, 欧州 ; MEA, 中近東 ; NA, 北米 ; CA, 中央アジア ; OC, オセアニア

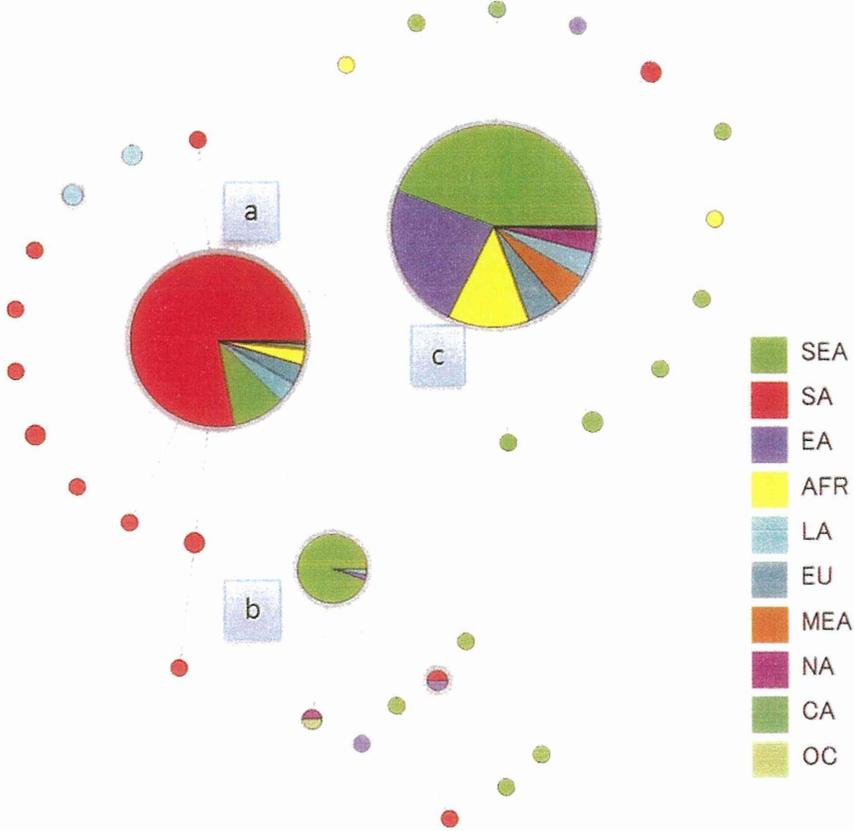
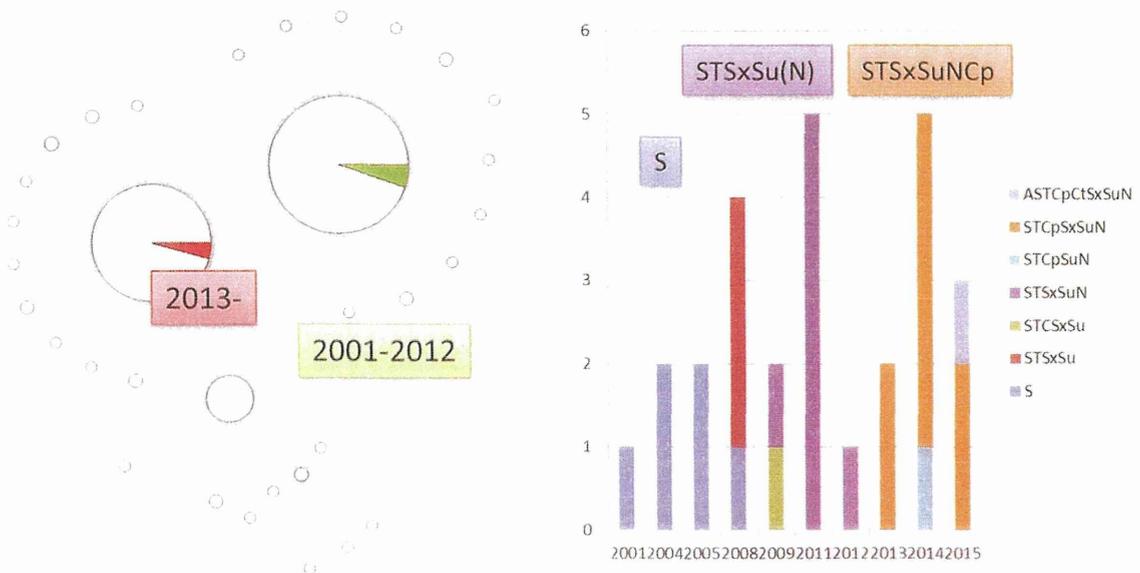


図 2. カンボジア輸入例株の解析。左、MLVA10-3LV グループ化 MST。右、薬剤耐性パターンの動向。



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）

「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」

平成 27 年度分担研究報告書

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

研究要旨

Listeria monocytogenes（以下リステリア）は、人には主に食品を媒介して感染し、免疫不全患者、妊産婦、高齢者等のハイリスクグループを中心に敗血症、脳脊髄膜炎及び流死産を引き起こす。欧米では集団事例が頻繁に見られるものの、日本国内では散发事例が中心であり、その原因食品は特定されないことが多い。本研究ではリステリア症散发事例の原因推定を目的として、研究室保有の患者由来株及び食品由来株について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。PFGE 解析は米国 CDC の手法に基づき実施し、制限酵素は *ApaI* と *AscI* を用いた。泳動結果は先行研究で実施した株と合わせ、食品由来株 105 株、患者由来株 43 株の計 148 株について、BioNumerics ver6.1 を用いて解析した。相同性 75%以上を同一クラスターとした結果、全菌株は 10 のクラスターに分類された。各クラスターは血清型との強い相関を示すものが多かったが、血清型 1/2a に属する菌株は複数のクラスターに広く分布しており、分子疫学的に多様性が高いことが示された。菌株の由来食品ごとの解析では、魚介類及び鶏肉が多く含まれるクラスター及び豚肉と牛肉が多く含まれるクラスターが見られた。患者由来株の 37%が単一クラスターに分類され、100%の相同性を示した株が 2 株検出された。今後、データを更に蓄積することにより、由来食品ごとの分子疫学的特徴を解析し、散发事例の原因推定及び小規模な集団事例の発見に役立てうると思われる。

研究協力者 吉田麻利 国立医薬品食品衛生研究所
泉谷秀昌 国立感染症研究所

A. 研究目的

脳脊髄膜炎及び敗血症を主な症状とするリステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は、芽胞非形成のグラム陽性桿菌である。人リステリア症は、発症時の致命率が 20–30%に

も及ぶ。また、妊産婦の感染時には流死産を引き起こすことが知られている食品媒介感染症である。本菌は動物の腸管内、土壌、河川水など様々な環境に広く分布していることから、生乳、生肉等いろいろな食品原料からも広く分離される。また、-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等、高い環境抵抗性を持つため、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、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。平成23年9月には米国でメロンを原因食品とした集団事例が発生し、患者146名、死者30名と報告された。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年の米国及びカナダの事例では、リンゴ菓子製品等を原因とした集団事例で患者36名、死者7名が発生している。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。日本国内においては、リステリア症は報告義務のない疾患であり、正確な患者数は不明である。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(JANIS)のデータを用いた調査によると、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人となり、欧米諸国と比べて極端に低くない数字であった。一方、日本国内では集団事例は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。リステリア症の潜伏期間は最長3か月にもなり、散発事例の原因食品を同定することは極めて困難である。

過去の調査により、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明らかとなっている。分担研究者らにより、

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。食品中のリステリアについては、平成26年12月に非加熱食肉製品とナチュラルチーズ(ソフト及びセミハードに限る)中の菌数が100CFU/g以下でなくてはならない、とする微生物規格が定められ、輸入検疫についてこれらの食品のリステリア汚染検査がなされているが、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148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。

B. 研究方法

1. 検体

日本国内で分離された*L. monocytogenes* 148菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株43株、鶏肉由来株34株、豚肉由来株22株、牛肉由来株17株、水産食品由来株16株、食肉製品由来株9株、乳製品由来株2株、その他の由来株4株及び標準菌株(ATCC19115株)1株であった(表1)。血清型の内訳は、1/2aが69株、1/2bが22株、1/2cが20株、