

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 28 年度  
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	菅野陽平	北海道立衛生研究所

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、食品や輸出国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。微生物の調査研究から食品と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と解析を、また、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再検討し、入力項目を修正、再構築した。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。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限られたリソースを有効に活用し、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と考えられた。赤痢菌 *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) による解析が有用であることが本研究で示された。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 1,300 株のデータを収集した。10 か所の遺伝子座を用いた *S. sonnei* の MLVA 法から 3 つの大まかなグループに大別することができ、これはゲノム解析から報告されている系統と相関することが示された。リステリアについて、研究室保有食品株データの蓄積と、国内発生散発事例由来株の解析を行った。また、また、研究協力者によるデータの統合を行い、データベースの充実を図った。

自然毒関連では、有毒植物による食中毒が、本年度発生したイヌサフランで 2 名、スイセンで 1 名死亡例があった。そこで、有毒植物の遺伝子鑑別法を実際の中毒原因植物試料（イヌサフラン）に適用し、本鑑別法が有効であることを確認した。有毒植物の確定検査用にリアルタイム PCR 法の確立を目指して検討を行った。きのこに関して、中毒事例が多いクサウラベニタケの分類学的再検討と毒性との関係、確定検査法の改良等を行った。その結果、従来クサウラベニタケとしていたものは、2 つの遺伝子座と複数の分子系統解析のより 3 つに分類され、2 つが中毒を示すこと、また、これら 3 つはリアルタイム PCR 法で確定検査が可能ながわかった。さらに、LAMP 法を利用したツキヨタケおよびクサウラベニタケの迅速かつ簡便な検査法の構築について検討した。ツキヨタケの検出を目的とした LAMP 法については、ツキヨタケと誤認されやすいシイタケやヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのここと交差せず、ツキヨタケのみを高精度に検出する LAMP 法を開発した。

## 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が極めて困難である。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。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、2008 - 2011年の患者数は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、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、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。本研究では、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 373 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する。

#### 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、現地でしか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。原因きのこの分類を明確にして、それぞれに対する検査法を確立整備することである。同時に、きのこ採取者に対する一層の情報提供と注意喚起が必要である。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* と考えられている) は、一般には複合種と言われ複数の種を含むのではないかと考えられてきた種

であり、分類学的にも正確に整理されていない。また、比較するためのデータも少ない。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。最近、欧州グループより *Entoloma rhodopolium* の ITS と一部の RPB2 領域の DNA 配列が公開され、日本のクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium*) と比較が可能になった。本年度は、日本国内における、クサウラベニタケ分類を再検討して、欧州のそれと比較解析を行うために、昨年解析した RPB2 領域 (RNA polymerase II second largest subunit) の配列と既に解析していた ITS1-5.8S-ITS2 領域のデータを用い、かつ2つの解析手法 (ソフトウェア) を用いて系統樹解析を行った。また、毒性との関連づけを行う。また、高等植物の遺伝子確定検査法の確立のためのリアルタイム PCR 法を検討する。

#### LAMP 法による迅速検査法の検討

野外においても目視判定可能な迅速法の確立のために、PCR 法の代わりに 4 種類のプライマーを用いて等温で反応が進む遺伝子増幅法である LAMP 法を用いたツキヨタケおよびクサウラベニタケ迅速検出技術の検討を行う。

## **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

昨年度評価モデル構築の基礎として、文献レビューを行い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。昨年度作成したモデルを再度詳細に解析し、その欠点、問題点を明らかにし、追加項目及びそのデータの出どころを明らかにした。

#### 赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

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 PFGE もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析 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。系統を大別する SNP 検索には SNaPshot による方法を開発、使用した。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* 患者由来株 108 株、リステリア症感染牛由来株 2 株、牛腸内容物由来株 1 株、食品由来株 260 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株を用いて、PFGE 解析を実施した。得られた画像は BioNumerics ソフトウェアを用いて解析した。系統樹作成には、非加重結合法 UPGMA 法を用いた。また、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は、2016 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、米国 CDC、ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases、Eurosurveillance 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

中毒情報の収集と必要に応じて現地調査を行い、原因植物の試料入手を検討する。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に用いた。中毒原因植物の DNA 分析による同定は、PCR-RFLP 法を利用した鑑別法で詳細は既に報告している。PCR、制限酵素処理後に電気泳動して、UV 下でバンド検出してパターンを比較した。

#### 中毒きのこ再分類のための分子系統樹解析と検査法確立

中毒が多いクサウラベニタケの分類を精査、再検討するために、ITS 領域と RPB2 領域について、CLCgenomic workbench および MEGA ソフトウェアを用いて、最尤法にて分子系統樹解析をした。各 DNA 配列間でギャップが有る場合の処理について、全ての配列を用いる場合と完全に除去する場合のそれぞれについて行った。欧州 *Entoloma rhodopolium* との比較解析を行った。

#### LAMP 法によるツキヨタケ迅速検査法の検討

ツキヨタケは、山形県、島根県で採取した。食中毒検体試料は、秋田県、山形県

より分与されたものを用いた。シイタケ、ヒラタケ、ムキタケなどの食用キノコは国内産で市販されていたものを試料として用いた。DNA抽出は、キットまたは簡易DNA抽出キットを用いた。LAMP法は、Loopamp DNA増幅試薬キットを用い、定温反応後に、増幅の確認は目視もしくはリアルタイム濁度測定装置 LA-320Cを用いた。

### 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（ハザード、輸出国の管理体制、食品の種類）を掛け合わせたモデルでリスクランキングを試みてきた。



本年度は、この問題点を明らかにして改良を行った。ハザードに関するデータでは、WHOのFERG報告書をもとにしたが先進国以外からのデータが少ないなどの問題がある。輸出国の管理体制では、唯一のデータである2014 World Ranking of National Food Safety Performance (NFCS) に変わって、WHOの国際保健規則 (IHR:2005) の食品安全 Core Capability Questions and criteria (WHO IHR National Capacity Monitoring Survey) のデータを用いた。

これを用いて、生ハム、燻製魚、チーズ中のリステリア、果実中のサルモネラのリスクランキングを行った。昨年のモデルに比べると、スペイン、ドイツ、豪州、NZ

のリスクの低下が目立った。一方、イタリア、フランス、デンマークは逆にリスクが上昇していた。課題として、主要国以外での情報不足で推定による部分も残るため、今後どのように不確実性を減らしモデルに反映するか、一層の検討が必要と考えられた。

#### 赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

感染症発生動向調査では、2015年の細菌性赤痢の発生数は156であった(図1)。2012-2015年の推定感染地域は約3割が東南アジアからの輸入例、2割が南アジアからの輸入例、3割が国内例であった

2016年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は55株であった。うち、輸入例は38株で、主な渡航先は東南アジア19株、南アジア6株、東アジア、アフリカが各4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。*S. sonnei* 輸入例株についてのMLVA解析から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と、MLVAの結果が地域性以外に、系統も反映していることが示唆された。2011-2015年の *S. sonnei* について薬剤耐性の傾向を整理した。*S. sonnei* は全体に薬剤耐性率が高く、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、ST合剤 (STX) の耐性率はいずれも7割を超え、同3剤耐性菌の割合は6割以上であった。耐性を注視すべき薬剤として、キノロン、セフェム系抗菌薬があるが、ナリジクス酸 (NA)

耐性が5割、シプロフロキサシン(CPFX)耐性が2割、セフトキシム(CTX)耐性が2割弱あった。MLVAなどの遺伝学的解析および薬剤耐性の傾向から国内例と輸入例との関連性がより詳細にわかることが示唆された。

#### リステリアのリスクに関する研究

##### 1. PFGEによる分子型別

食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株 PFGE 解析の結果、75%以上の相同性を示す菌株を同一クラスターとした結果、全菌株は27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した。

食品由来株で患者由来株と100%の相同性を示したものは、明太子由来株、豚肉・鶏肉及びマグロ由来株、牛肉由来株(3株)、豚肉由来株、エシャロット由来株、ソーセージ由来株、松前漬由来株であった。患者株間で同一血清型に属し、PFGE解析で100%の相同性を示したものは5組存在した。患者株間で100%の相同性を示す株は5組見られ、同一或いは比較的近い分離年の株が含まれていたことから、未知の小規模な集団事例の可能性も考えられた。PFGE解析法により、国内の様々な由来のリステリア菌株の分子疫学的データを蓄積、解析して、散发例を含むリステリア症事例の原因食品を推定し、検疫強化や消費者への情報提供を通じて、食品媒介リステリア症の発生を低減しうる可能性が示唆された。

##### 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

2016年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5例の報告が見られた。原因食品は、3例が野菜、2例が不明であった。発生国は米国、カナダ、ドイツ、イタリアであった。海外事例からは、近年のリステリア症の集団事例の原因食品が従来多かった動物性食品から、野菜、果物等多様な食品に広がりを見せており、国内への侵入経路として様々な食品を考慮に入れる必要性が高まっていると同時に、国内汚染実態についても、様々な食品について調査を行う必要があると思われる。

#### 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

##### 1. 中毒情報の収集

平成28年度に報告された有毒植物による中毒事例は例年に比べ発生事例が多く、イヌサフランで2件2名、スイセンで1件1名の死亡例が発生したのは特記される。イヌサフランによる中毒事例は、近年多く、死亡例も多い。平成25年(2013年)以降4年間で9件発生し、うち5件5名が死亡している。スイセンによる死亡事例は、初めて発生した。

##### 2. 中毒原因植物のDNA分析による同定

実際に、中毒を引き起こした原因植物を入手して本法を適用し、植物種の同定を試みた。入手した中毒原因植物は形態学的な鑑定の結果、イヌサフランであると推定された。そこで、今回構築したDNA鑑別法(イヌサフランとギョウジャニンニクを識別

する PCR-RFLP 法) を適用した。その結果、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。本鑑別法は、保健所や医療機関などの現場において、食中毒患者への初期対応と平行して行え、原因種の推定・特定に有用なものと考えられた。

#### 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

日本国内で毒きのことしてされているクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium* と考えられているが詳細不明のまま) の分類と毒性を明らかにするために、昨年度に引き続き ITS 領域と RPB2 領域を用いた系統分類を詳細に行った。分子系統樹解析では、欧州起源 *Entoloma rhodopolium* と日本のクサウラベニタケを比較するために、論文で用いられている系統解析ソフト MEGA7 を使用した (昨年度は、CLC Genomicworkbench を使用)。MEGA 解析の結果から、まず、クサウラベニタケは欧州起源 *Entoloma rhodopolium* とは異なり、また近縁の *Entoloma nidorosum* や *Entoloma majaloides* と異なる種である。さらに、既存のどの *Entoloma* の種とも異なっていることから新種であると考えられたことから、新たに命名した。 *Entoloma latcus*, *Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* とした。

また、毒性との関係について中毒事例から回収した検体を検査したところ、 *Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* であることが確認されたが、一方で、 *Entoloma latcus* は中毒

事例品には存在しなかった。以上の結果から、国内で中毒の原因となるのは、 *Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* の2つのきのこであると判明した。本研究の結果から、長年分類が曖昧であったクサウラベニタケの分類と毒性との関係を明らかにすることができた。

#### LAMP 法によるツキヨタケ迅速検査法の検討

ツキヨタケ及び食用きのこを用いて検討を行った結果、特異的なプライマーを設計することで他の食用きのこには反応せず、ツキヨタケのみに反応して増幅することが確認できた。さらに、実際の食中毒検体を用いて検討したところ、ツキヨタケおよび食中毒事例からの回収検体でのみ増幅が確認された。ただし、食中毒検体で1検体検出しなかったものがあったことから、配列を確認したところ、ムキタケであることが確認された。以上のことから、本 LAMP 法はツキヨタケ及びその残品を特異性に検出することが可能な迅速法であり、目視判別により野外での検出可能な方法として有用であることと考えられた。

同様の方法を、クサウラベニタケに対しても適応可能か検討を行った。

#### **D. 結論**

輸入食品のリスクの程度に応じた効率的な監視対策のために、輸出国と食品ハザードのリスクランキングの研究、食中毒アウトブレイクに対応可能なデータベースの作成、及び自然毒の健康被害防止と検査体制確立に関する研究を行った。

ハザードと輸出国のランキングに関する研究では、昨年度作成したモデルの改良を行い、若干の改善は認められたが、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、輸入時モニタリング等に活用して、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。

赤痢菌等に関する研究では、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。今後も継続的に海外の発生状況の情報収集が必要である。国内監視体制整備のため、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。

リステリアに関する研究では、直接的な散発事例の原因食品同定には至らなかったが、データの継続的蓄積により、今後国内のリステリア症事例の原因食品を推定することが可能になると考えられる。過去の散発事例中で、同一菌株のものが見られ、今後の解析により未発見の小規模な集団事例の解明に繋がり得ると推測される。

自然毒に関する研究では、有毒植物による食中毒情報を収集し、イヌサフラン、スイセンによる死亡例を確認した。イヌサフランの遺伝子鑑別法を構築し、食中毒を起こした調理済みのサンプルにも適用可能なことを示した。食中毒が多いクサウラベ

ニタケの再分類から、日本のクサウラベニタケは3種あり、いずれも新種であること、中毒はそのうち2種で起きることを明らかにした。ツキヨタケ検出用 LAMP 法は、シイタケ、ヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのここと交差せずにツキヨタケだけを検出することが確認された。LAMP 法は、きのこの採取現場で検査できる方法であり、喫食前診断に大きく寄与できると考えられた。

#### **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