

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 29 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
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
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* に絞って、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 1,800 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、国内発生散发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、スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン（死者 1 名）、キョウチクトウで発生した。有毒植物の簡易遺伝子鑑別法 PCR-RFLP 法を実際の中毒原因植物試料に適用し、本鑑別法が有効であることを確認した。PCR-RFLP 法で確定できない場合を想定して、有毒植物 5 種の確定検査用に感度と特異性を有したリアルタイム PCR 法の確立を行った。きのこに関して、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、ツキヨタケおよびクサウラベニタケ近縁種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

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。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とする。

リステリアのリスクに関する研究

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、冷蔵庫内など自然界や人の生活圏の様々な環境に広く存在している。本菌を原因菌とするリステリア症は、食品媒介感染症の中で最も致命率が高いことが知られている。集団事例については、欧米ではほぼ毎年発生している。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。Codexによる食品中のリステリアの国際規格設定を受けて、日本国内でも平成26年に非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ(ソフト及びセミハードに限る)中のリステリア菌数を100 colony forming unit (CFU)/g以下とする微生物規格が設定された。同時に、平成5年から用いられていた食品中のリステリア試験法が改正され、国際標準化機構(International Organization for Standardization; ISO)の試験法に準拠した方法となり、1ロットにつき5検体を検査して全数の合格が要求されるサンプリングプランも設定された。本研究では、海外から汚染食品を媒介して国内に侵入す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。

有毒な高等植物のリアルタイム PCR を用いた確定検査法開発

日本国内では、有毒植物を食用植物と誤認して摂取することによる食中毒事例が毎年発生している。特に、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンは発生件数が多く、有毒植物による食中毒事例全体の約 7 割を占める。さらに、イヌサフランは近年複数の死亡事例が報告されている。これまでに、簡易検査法として PCR-RFLP 法を開発してきたが、簡易法で判別できない試料とへの対応として、感度と特異性の高いリアルタイム PCR 法を検討する。

LAMP 法による迅速検査法の検討

国内でこのことによる食中毒事例について過去 10 年以上のデータを解析すると、ツキヨタケとクサウラベニタケの 2 つのきのこが大半を占める。これまでの PCR-RFLP 法やリアルタイム PCR 法は、実験室での実行が必要である。中毒防止のために検査の裾野を広げる必要があり、一つとして野外で実行可能な方法への発展が可能な方法として LAMP 法がある。そこで、LAMP 法を用いたツキヨタケ検出法について検討した。さらに、我が国においてツキヨタケと共に食中毒の報告の多いクサウラベニタケの検

出を目的とした LAMP 法の構築についても検討を行った。

B. 研究方法

各分担報告書を参照

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。



過去 2 年間作成した Hazard の特性、国の National Food Control System の performance、喫食、曝露データ等の食品に specific なデータを網羅した半定量モデルを再検討し、入力項目を修正、再構築するため、野菜、果実について、汚染及び食品由来疾患とハザードに関する論文サーチを行い、国ごとのデータの重み付けや第三者認証である Global GAP、Canada GAP 及び ISO 22000 の認証数データ等を追加した。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、サルモネラ等の細菌学的分析

2017年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は70株であった。うち、輸入例は41株で、主な渡航先は東南アジア21株、南アジア9株、中央アジア、アフリカが各3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。ミャンマー及びカンボジア由来株は南アジア由来株が多くを占めるクラスターの近くに分布した。同じツアー事例由来株、陰性確認で陽性となった株はクラスターを形成した。このほか、国内例株においてもいくつかクラスターが観察された。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ゲノム情報からの系統との関連性について検討した。系統を指標に、MLVAデータを主成分分析にかけたところ、系統4種を有意に判別可能であることが明らかとなった。2017年株について、上記マトリクスを使用した系統推定を行い、MLVA-minimum spanning tree にあてはめると、MST上で各系統に合わせて分布することが明らかとなった。MLVAデータと系統とは相関があり、MLVAデータから系統を推測することが可能であることが示唆された。赤痢菌のような海外からの侵入が懸念される菌種など、サーベイランスを継続することでデータベースを構築し、様々な観点からデータを解析し、技術の信頼性を高めていく必要があると考えられる。

リステリアのリスクに関する研究

患者由来株、リステリア症感染牛由来株、牛腸内容物由来株、食品由来株、環境由来

株及び標準菌株についてPFGEによる解析を実施した結果、患者由来株は特定のクラスターに高い相関をもって分類されることが示された。患者の喫食歴と食品由来株の型別が一致したものが見られ、散発事例の原因の推定が可能となった。今後の国内事例発生時に、保健所等によりできる限り迅速に聞き取り調査を行うためのフォーマット等の整備や、より多くの地方衛生研究所等との情報共有やデータベースの拡充が必要であると思われた。継続的な調査の必要性と共に、国内のより多くの試験所からの情報を統合し、データベース化すること、高い相関を示した菌株群については、より深度の高い情報の集積のため全ゲノム塩基配列解析を行うこと、輸入事例の検出のための国際的な情報の共有が必要であると思われた。

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

・有毒植物による食中毒情報収集

最近死亡例も多いイスサフランは、注意喚起などに努める必要がある。過去20年以上事例のなかったキョウチクトウによる中毒も報告された。身近に豊富に見られる有毒植物なので、やはり注意が必要である。

・有毒植物の遺伝子鑑別法

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。特徴は、1) 必要な機器が比較的安価であること、2) 操作が簡便であるため高度な実験手技を必要としないこと、3) 分析時間が短い(90分以内)こと、4) 結果(電気泳動像)の解釈が容易であることが挙げ

られる。本法を実際食中毒を起こした調理済みのサンプルで検討し、調理済みサンプルにも適用可能なことを確認した。したがって、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る。

有毒な高等植物のリアルタイム PCR を用いた確定検査法開発

有毒植物の確定検査法としてリアルタイム PCR を用いた方法の開発を行った。植物バーコーディング領域 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* をデータベースおよびシーケンス解析により収集した。有毒と食用植物の配列アライメント解析から *matK* において適度に変異箇所が見られたため、*matK* を標的に用いた。各反応系は有毒植物と誤認しやすい食用植物や代表的な食用植物には反応性を示さず、有毒植物に対し高い特異性を示した。各反応系の検出限界は 0.05~0.2 pg/wel であり、十分な感度を有していた。以上の結果から、本方法は有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便に有毒植物を同定できると考えられた。

ツキヨタケ迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

ループプライマーを用いた LAMP 法により、食用キノコに交差性を示さず特異性の高い方法を構築できた。そこで、擬似混合試料を用いて試した所、食用きのこ混合試料に 2.5%~50%の割合でツキヨタケを含む混入試料を調製し LAMP 法を実施した結果、2.5%までの全てのツキヨタケを含む試料で増幅を確認でき、本法は、実際に

現場で大量に採取したきのこの中からも微量のツキヨタケの有無を判定できると考えられた。

D. 結論

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

モデルの改良を行い、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、輸入時モニタリング等に活用して、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、サルモネラ等の細菌学的分析

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。

リステリアのリスクに関する研究

患者由来株は特定のクラスターに高い相関をもって分類されることが示された。特に血清型 1/2a グループの患者由来株の半数は鶏肉及び水産食品由来株と相関が高いクラスターに属していた。食肉製品が国内散发事例の原因食品となっている可能性が示唆された。高い相関を示した菌株群については、全ゲノム塩基配列解析を行うことが必要と考えられた。

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

有毒植物による食中毒情報収集について、死亡例も多いイスサフランは注意喚起などに努める必要がある。過去 20 年以上事例のなかったキョウチクトウによる中毒も報告された。

有毒な高等植物のリアルタイム PCR を用いた確定検査法開発

中毒事例が多い有毒植物 5 種について、特異性が高いリアルタイム PCR 法を開発した。本方法は、標的の有毒植物に高い特異性を示し、十分な感度を有していることから、毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便に有毒植物を同定できると考えられた。

迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

ポータブル LAMP 装置の利用により、DNA 抽出から LAMP 法によるツキヨタケ

の判定まで屋外で実施可能であった。本研究の成果をツキヨタケの喫食前診断に活用することで、ツキヨタケによる食中毒の発生の低減に向けて大いに役立つと期待される。

さらに、同じ *Entoloma* 属で形態的にも非常に似ている国産クサウラベニタケの新種 3 種とウラベニホテイシメジを、迅速簡便に見分けることができる LAMP 法も確立して、クサウラベニタケの喫食前診断の実用化へ向けて大きく前進したと考えられた。

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

なし