

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25年度 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26(2014)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 15

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 35

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 63

6. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

登田 美桜 69

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 85

IV. 研究成果の刊行物・別刷 87

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・代謝生化学部 |
| 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

食品に侵入の恐れが生物学的ハザードの中で、細菌と自然毒について、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、米国では中米から輸入されたキュウリによる事例などが発生した。国内ではメキシコ産原材料の魚介製品を推定原因食品とするナグビブリオの食中毒事例が発生した。細菌性赤痢では原因不明の国内例の小規模な流行が発生した。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ず、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。海外から侵入しうる感染症の原因菌として、リステリアの分子疫学的解析を行い、国内散発例の原因食品究明に役立て得るデータベース作成を目指している。手法として、米国 CDC を中心として国際的に行われているパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いて、制限酵素 *AscI* で切断したパターンの解析を行った菌株について、*ApaI* での切断を行い、泳動パターンの解析を行った。国内侵入時の対応に生かすために情報解析を行った。WHO の INFOSAN Emergency を通じ、国際的に警報が発生された事例、欧州の 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。また、既存の定量的確率論的モデルを用いて、*Salmonella* 属菌及び *Listeria monocytogenes* に関する輸入食品によるリスクを推定した。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、核リボソーム RNA をコードする遺伝子の中の ITS 領域を標的に、シークエンス解析・分子系統樹解析を行った。これまで1種と考えられてきたクサウラベニタケは、3種存在することが明らかになった。これらの結果を用いて、迅速な判別法として PCR-RFLP 法を開発し、多様なきのこ混在中でも適用することができた。確定法としてリアルタイム PCR 法を構築した。日本で中毒被害が多いツキヨタケについても同様の手法を開発した。高等植物への適用を広げるために *rbcL* や *matK* の領域を用いた PCR-RFLP 法を開発した。また、葉緑体ゲノム上の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を標的として食中毒原因植物の推定を行った。これらは、特殊な機器を必要としない簡便で迅速な方法として、現場に近いところで活用していくことで中毒被害低減に役立てることができる。自然毒のリスクに関しては、アンケート調査の結果から国民に向けた一層の正確な情報提供とリスクの認知を行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

細菌のリスクに関する研究

現在もなお、細菌性食中毒の上位を占めるサルモネラは、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。特に、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。また、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 名前後でほとんどが散発事例であるが、近年海外で発生した集団事例の中には国外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。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。このような現状から、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して前年度より継続して行う。

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。本菌は動物の腸管内、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った。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。

国内に侵入する恐れのある細菌の検査、監視対策、リスク管理に役立つ情報に役立てるため情報収集および情報解析

本年度は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米国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、検討した。

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に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であり、迅速にかつ科学的なエビデンスに基づく検査方法の確立と整備であると考えられる。国内で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、遺伝子全国からサンプルを収集して遺伝子配列を解析を行い、系統樹解析を行ってきた。その結果を用いて生のきのこの判別に有効な PCR-RFLP 法を昨年作成したが、本年度は、加熱調理や吐瀉物を想定し、加熱および人口胃液処理したサンプルでも適用可能な PCR-RFLP 法を考案した。ツキヨタケについても同様の検討を行い、PCR-RFLP 法を確立するとともにリアルタイム PCR 法についても検討を行った。

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、きのこの場合とは異なる遺伝子領域を標的として PCR-RFLP 法の検討を行い、リスク低減のための施策とすることを目的とする。

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

海外事例情報収集は、論文、米国 CDC、欧州 CDC 資料から参考にした。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

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。

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

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 61 菌株を解析に使用した。PFGE による分子型別について、昨年度作成した米国 CDC の方法を基本とした PFGE 解析法の標準的プロトコールを 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

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。
- 3) web 上で使用できる確率論的リスク評価ツールを用いて輸入食品中のハザードによるリスクを推定した。

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

日本国内で中毒事例が多い、クサウラベニタケとツキヨタケについて、全国の広い地域から

採取、収集したものをを用いた。クサウラベニタケ系統の解析には、クサウラベニタケと近縁種ウラベニホテイシメジ、イッポンシメジを、ツキヨタケ系統の解析には、ツキヨタケ、ヒラタケ、ムキタケを用いた。それぞれ、DNA 抽出し、ITS1-5.8S-ITS2 の領域をユニバーサルプライマーで増幅、精製し、シークエンス解析を行った。アライメント解析および系統樹解析には、CLC Genomic workbench ver.6.5 および Genetyx ver.12 を用いた。クサウラベニタケについては、昨年度の結果に加え、本年度は加熱調理サンプルにも適用できるように、短い標的配列を用いた PCR-RFLP 法の検討を行った。この時、食毒判別は *MsII* 処理で行った。疑似試料作成には、市販のきのこを用いた。ツキヨタケについては、*Sau96I*、*Bpu10I*、*SfiI* を用いた。クサウラベニタケおよびツキヨタケについて、確定法としてリアルタイム PCR 法の検討も行った。

食中毒事例の多い植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

日本各地（東京、北海道、青森、福島）で採集あるいは購入した植物：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、ニラを用いた。*rbcL* または *matK* の一部を標的とする PCR-RFLP 法を、制限酵素として *BglI*、*EcoRV*、*NcoI* を用いて検討した。また、*trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長の比較による食中毒原因植物の推定を行った。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

消費者が自然毒をどのように捉えているか、またどの程度知っているかを理解できるようにするためのアンケート調査表を作成した。2013 年 10～12 月、山口県で開催された事業者・大学生・教職員向け講習会の出席者、宮城県の大学生・教職員・公務員向け講習会、神奈川県及び群馬県の一般向け講習会に参加した計 370 名を対象にアンケート調査表を配布し、調査を実施した。講習会の内容は主に食品関連（ただし、自然毒との関連性はない）のものであった。

回収されたアンケート調査の回答をもとに、自然毒に関する消費者の考えや認知度について検討した。

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

最近海外で発生したサルモネラ集団発生食中毒の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例をまとめた。起因菌の血清型はほぼ全て異なっていた。推定原因食品は野菜・調味料・肉類であった。その他、ペットフードやカメから感染拡大した事例もあり、一部は米国から輸出されているものもあった。ペットフードからの感染は日本ではあまり考慮されていないが、今後注意が必要な項目である。

2013 年 9 月から 10 月にかけてナグビブリオによる食中毒が相次いだ。原因食として中米産ニシ貝スライスが疑われ、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。

2013 年に解析された *Shigella sonnei* は 81 株であった。MLVA による解析を行ったところ、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。カンボジア輸入例の 1 株と国内例 1 株に類似性が見られた。類似の型は 2012 年にも見られており、今後の動向が注目される。

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

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。

国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *ApaI* 切断による PFGE 解析の結果を行った。その結果 *ApaI* 切断においても、昨年度実施した *AscI* と同様に、血清型でクラスターが大きく分けられることが示された。

過去 5 年間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 17 例見られ、そのうち 9 例でチーズが原因食品であった(表 2)。また、それらのうち輸入食品を原因とする事例は 3 例みられた。

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

INFOSAN、INFASAN emergency アラートとして報告された事例について調査した。平成 25 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 2 件発せられた。また、健康被害はなかったものの、ポツリヌスの汚染として、ニュージーランドのホエイタンパク濃縮中の *Clostridium botulinum* 汚染疑惑事件が報告され、INFOSAN が活発に活用された事例があった。

INFOSAN 活動報告書(2011 及び 12 年)を調査したところ、アフリカ、ヨーロッパ及び

西太平洋地域事務所でのアラート発生が多かった。その他、RASFF 情報の解析を行った。

FDA の iRISK を用いたて、リスクの推定を行った。具体的には、ソフト熟成チーズ中の *Listeria monocytogenes* についてリスク評価を行った。日本国民が全員年 1 回、輸入のソフト熟成チーズを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は 1.36 人、DALY は 4.89、一回の喫食機会当たりの感染リスクは 3.83×10^{-8} と推定された。スモークサーモン中の *Listeria monocytogenes* について評価を行った。日本国民が全員年 1 回、輸入のスモークサーモンを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は 819 人、DALY は 3630、一回の喫食機会当たりの感染リスクは 0.0000284 と推定された。本手法は、昨年度実施した半定量モデルより、詳細なモデルを自分で組み立てることもできるし、用量反応データも健常者とハイリスク集団ごとに変えることもできる。それに応じて、要求されるデータの量及び質が増えるので、データがある程度そろっている食品と微生物の組み合わせには、このモデルは極めて有効であると考えられたが、データがないと、多くの仮定を導入せざるをえなくなることから注意が必要であると考えられた。

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

クサウラベニタケについて、遺伝的バリエーションが比較的大きいことが報告されていた。本研究において、これまで 1 つに分類されていたクサウラベニタケが 3 グループ(clade I~III)に分類されることが初めて明らかになった。分子系統樹解析の結果をもとに、加熱調理サンプルでも適用できるように、短い DNA 領域を標

的とした PCR-RFLP 法を考案し、多くの食用キノコ存在下でも食毒を迅速に判別できることが明らかになった。ツキヨタケについて、遺伝的なバリエーションはほとんどなく1つのグループに分類された。また、PCR-RFLP 法を構築した。さらに、加熱調理サンプル等からでも確実に種の同定が可能なリアルタイム PCR 法を、クサウラベニタケおよびツキヨタケに対して確立した。本法により、これまで原型をとどめていないため調理サンプルからの同定ができなかった場合でもできよう可能になり、未同定の事例の解決が可能となると考えられる。

食中毒事例の多い高等植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

発生件数の多いバイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンの迅速・簡便な鑑別法を検討した。バイケイソウとギョウジャニンニク、チョウセンアサガオとゴボウ、トリカブトとニリンソウ、スイセンとニラとを識別するための DNA 標的遺伝子として *rbcL* または *matK* を用いた PCR-RFLP 法を構築した。本法は調理サンプルからも適用可能であった。また、葉緑体ゲノム上の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を用いた食中毒原因植物の推定も検討した。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

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、自然毒については不安を感じていない人が半数近くいることが確認され

た。行政的に管理されておりリスクも低い輸入食品及び残留農薬よりも、毎年食中毒が発生し死者も出ている自然毒の方が不安を感じる人の割合が低いのは問題である。

自然毒による食中毒に関する知識についての調査では、1年間の食中毒の発生件数はキノコ毒を原因とする事例が最も多く、そのことを89%の回答者は正しく認識していた。一方で、図鑑があれば食べられるキノコと毒キノコを見分けられるかとの問いに対し、そう思わないと答えた人は77%で大半を占めたが、その一方で14%の人は分からないと回答し、5%の人は見分けられると思うと回答していた。これらの調査結果から、きのこの場合には、特に見分けの難しさと危険性を一層周知させる必要が感じられた。

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。

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

本研究で得られたクサウラベニタケとその近縁種の分子系統樹解析および PCR-RFLP 法に関して、昨年度出願したものの適用範囲拡大のために再出願した。

出願番号：特願 2014 - 006142

出願人：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：キノコの同定方法、及び、同定キット

出願日：平成 26 年 1 月 16 日

発明者：近藤一成、小櫃冨未、坂田こずえ

弊所整理番号：26H006

さらにツキヨタケとシイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する PCR-RFLP 法およびリアルタイム PCR 法に関して出願した。

出願番号：特願 2014 - 103555

出願人：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：きのこの同定方法および同定キット

出願日：平成 26 年 5 月 19 日

発明者：近藤一成

弊所整理番号：26H105

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」
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

分担研究者 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。本年度も米国では中米から輸入されたキュウリによる事例などが発生した。また、国内ではメキシコ産原材料の魚介製品を推定原因食品とするナグビブリオの食中毒事例が発生した。細菌性赤痢では原因不明の国内例の小規模な流行が発生した。

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、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、そのデータベースの構築を行う。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。本年度はナグビブリオの食中毒が発生し、その菌株解析も行った。

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

今年度を中心に最近海外で発生したサルモネラ集団発生食中毒の中から、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。起因菌の血清型はほぼ全て異なっていた。推定原因食品は野菜・調味料・肉類であった。ヒトの食品ではないが、ペットフードやカメから感染拡大した事例もあり、一部は米国から輸出されているものもあった。ペットフードからの感染は日本ではあまり考慮されていないが、今後注意が必要な項目である。2013 年 8 月には中国から輸入されたウニから腸炎ビブリオが検出されたとの報道があった。わが国における腸炎ビブリオ食中毒は 1990 年代以後減少しているが、輸入食品を介した感染には注意が必要である。

2013 年 9 月から 10 月にかけてナグビブリオ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 1)。

2013 年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は 81 株であった。うち、輸入例は 54 株で、南アジア 23 株、東南アジア 22 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。カンボジア輸入例の 1 株と国内例 1 株に類似性が見られた。また、関東・北陸・中部・九州地方で分離された国内例由来株に類似性が認められたが、これらと類似の輸入例はこれまでのところ見られなかった。類似の型は 2012 年に

も見られており、今後の動向が注目される (図 2)。

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。それと同時に、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は分離菌株の基礎データが足りない部分があることも考えられる。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

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.

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 |
|----------|---------------------------------------|--------------------|---------------|-----|----|--------------|
| 2013年5月 | Salmonella Montevideo, Mbandaka | Tahini(ごま ペースト) | 米国 | 8 | | トルコから輸 入 |
| 2013年4月 | Salmonella Saintpaul | キュウリ | 米国 | 81 | | メキシコから 輸入 |
| 2013年4月 | サルモネラ | ペットフード | 米国 | | | 米国から輸 出 |
| 2013年3月 | Salmonella Typhimurium | ペットフード | 米国 | | | 米国から輸 出 |
| 2013年5月 | Salmonella Saintpaul他 | カメ | 米国 | 391 | | 米国から輸 出 |
| 2013年8月 | 腸炎ビブリオ | ウニ | 日本 | | | 中国から輸 入 |
| 2013年10月 | Salmonella Heidelberg | 鶏肉 | 米国、プエル トリコ | 430 | | 米国から輸 出 |

図 1 . 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*。

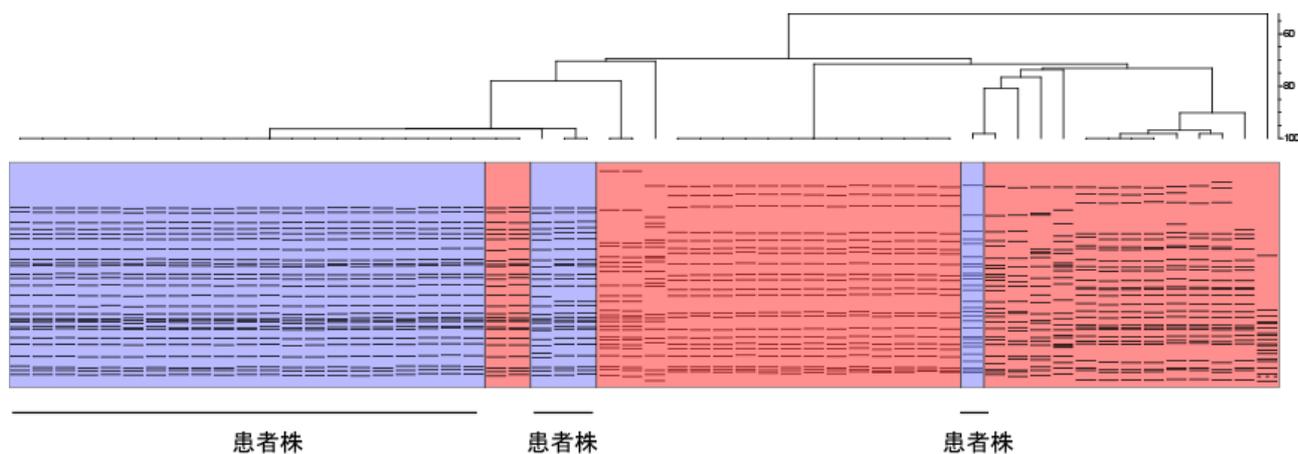
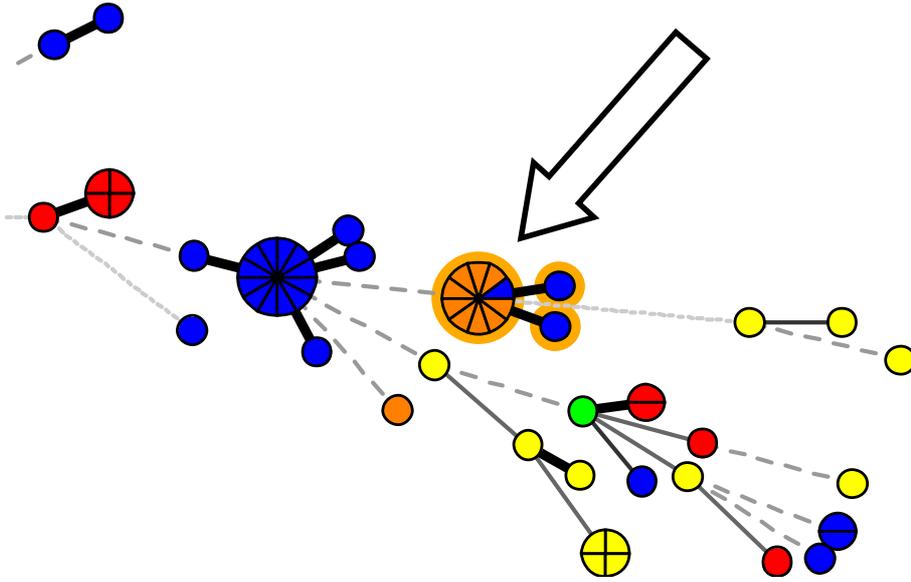


図 2 . *Shigella sonnei* 2012-2013 年国内流行株の MLVA による minimum spanning tree. 国内例部分のクラスターを矢印で示す。網掛けの色分けは分離年による。



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全総合研究事業）
「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」
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**

分担研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第三室長
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

研究要旨

グラム陽性の短桿菌 *Listeria monocytogenes* (リステリア)は、汚染食品を通じて人に感染するリステリア症の原因菌である。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、冷蔵庫内でも増殖すること、食品製造環境で長期間生残する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輸入食品や、水産加工品等の国内産食品からは一定の割合で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、欧米諸国では頻繁に起こり、原因食品は非加熱食肉製品、乳製品、サラダ類を中心に、セロリ、メロン等多岐に亘っている。しかしながら、日本国内で発生しているリステリア症の大半が散发事例となっている。リステリアによる髄膜炎、敗血症等の潜伏期間は長く、1 か月から最長 3 か月にも及ぶため、ほとんどの症例において原因食品は同定されていない。

本研究では、昨年度より海外から侵入しうる感染症の原因菌として、リステリア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目指している。その手法には、米国 CDC を中心として国際的に行われているパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いた。今年度は、昨年度制限酵素 *AscI* で切断したパターンの解析を行った菌株について、*Apal* での切断を行い、泳動パターンの解析を行った。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes (以下リステリア)は、人及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こし、発症時の致命率が 20-30%にも及ぶリステリア症の原因菌である。本菌は動物の腸管内、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。また、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

性を持ち、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おり、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名が死亡する事態となった。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知られている。我が国においてリステリア症は報告義務のない疾患であり、推定患者数は1996～2002年で人口100万人当たり0.65人、2008～2011年で同じく1.06～1.57人されている。一方国内での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。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。また、過去の研究から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、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、国内での散发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*L. monocytogenes*のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析を昨年度に引き続き実施した。

B. 研究方法

1. 検体

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(表1)。食品種は、サラミ由来4株、生ハム由来2株、チーズ由来1株、鶏肉由来4株、豚肉由来3株、牛肉由来22株、串カツ由来1株及びホタテ由来1株であった。豚肉は11検体から各2株、1検体から1株、牛肉は11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25株、1/2bが10株、1/2cが19株、3bが1株、4bが6株、4dが1株であった。

2. PFGE による分子型別

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を、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（別添 1）。この方法により、研究室保有株の PFGE プラグを作成し、制限酵素 *ApaI* で切断後に電気泳動を行い、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。

3. 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

過去 5 年間に、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により、諸外国におけるリステリア症集団事例についての情報を収集した。

C. 研究結果

1. PFGE による分子型別

国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *ApaI* 切断による PFGE 解析の結果を図 1 に示した。その結果 *ApaI* 切断においても、昨年度実施した *AscI* と同様に、血清型でクラスターが大きく分けられることが示された。また、血清型 1/2a では株による泳動パターンに大きな違いが見られた。一方、ブラジル産鶏肉由来の 3 株は 90% 以上の相動性を示し、昨年度実施した *AscI* 解析の結果（80%）よりも高い結果とな

った（PFGE 番号 3、4、及び 12）。牛由来株と豚由来株が同一のパターンを示す例が 3 通り見られた（PFGE 番号 25、46、69、PFGE 番号 35、60、64 及び PFGE 番号 38、41、50）。血清型の異なるサラミ由来株 2 株も同一パターンを示し（PFGE 番号 16 及び 17）。食肉加工品に分布しているクローンの存在が示唆された。また、血清型 4b に属する菌株は、まとまったクラスターに分類されたものの株ごとのパターンの違いが大きく、二組のパターンに分けられた牛由来株はそれぞれ同一検体から分離されたものであり、各クローンで泳動パターンが異なることが示された。血清型 1/2c に属する菌株では、ブラジル産鶏肉由来株、スペイン産ハム及びサラミ由来株、国内産牛肉由来株、国内産豚肉由来株の合計 18 株が同じサブクラスターに分類された。昨年度実施した *AscI* による血清型 1/2c 株の切断パターンでも同様の結果を示し（平成 24 年度報告書 図 1）本血清型に属する菌株が、遺伝的に相動性が高いことが示された。しかしながら、同一の豚肉から分離され、血清型 1/2c に属する 2 株が異なる泳動パターンを示した例も 1 例あり（PFGE 番号 47 及び 48）通常行われる血清型別のみでは識別できない場合でも、食品が複数のクローンで汚染されている例があることが示された。また、今回の解析においても、フランス産チーズは他の菌株との相動性が著しく低いことが示された（PFGE 番号 2）。

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

過去 5 年間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 17 例見られ、そのうち 9 例でチーズが原因食品であった(表 2)。また、それらの内輸入食品を原因とする事例は 3 例みられた。

D. 考察

本研究において、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 株及び標準菌株の計 62 株について制限酵素 *ApaI* を用いた PFGE による解析を実施した結果、昨年度実施した *AscI* と同様に、血清型と高い相関をもって分類されることが示された。また、同一食品から分離され、同じ血清型に属する複数の菌株において、PFGE パターンが異なる例が 1 例見られ、一検体が複数のクローンに汚染されている例が存在することが示された。血清型 1/2c に属する菌株は *ApaI* 切断においても *AscI* 切断と同様に、由来食品や原産国に係わらず高い相同性を示し、本血清型に属する菌株の詳細な型別には、第 3 の制限酵素を用いるか、別の手法による分子疫学的解析を実施する必要があると思われる。一方、血清型 4b に属する菌株については、検体数が限られているものの株ごとの相動性は低く、型別法として PFGE 解析が有用であることが示された。1/2a、1/2b 等についても同様であった。

これらの結果から、米国 CDC の手法を基にした PFGE 解析法により、国内の様々な由来のリステリア菌株を有効に分類していくことで、散発例を含むリステリア症事例の原因食品を類推しうる可能

性が示唆された。リステリア症の原因食品の推定に結び付け、集団事例発生時にアウトブレイクとして早期に検出するためには、更に多くの食品由来株について、原産国、血清型ごとのデータの蓄積が必要であり、患者由来株のデータと合わせて PFGE 解析を行っていくことが必要であることが示された。そのためには、CDC と同様の方式で国内の多くの試験所からの解析情報を統合し、共通に利用しうるデータベースを作成することが重要であると思われる。

E. 結論

本研究の結果、リステリアの *ApaI* 切断による PFGE 解析を用いた分子疫学的解析は、昨年度実施した *AscI* 切断による解析と同様に、クラスターと血清型に高い相関がみられた。また、同一検体由来株で同じ血清型に属する複数の菌株について泳動パターン結果が一致しないことがあり、株の同一性を高い感度で検出できることが明らかとなった。最終年度は公共データベースの構築を目標とし、更にデータを蓄積するとともに、国内の試験機関との協力でデータの充実を目指す。

F. 研究発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 使用菌株

| PFGE 番号 | 由来食品 | 国産/輸入 | 血清型 | 分離年 |
|---------|------|-------|------|------|
| 2 | チーズ | 輸入 | 1/2a | 2010 |
| 3 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2008 |
| 4 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 11 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2006 |
| 12 | 鶏肉 | 輸入 | 1/2a | 2006 |
| 13 | 串カツ | 国産 | 1/2a | 2008 |
| 14 | ホタテ | 国産 | 4b | 2008 |
| 15 | 生ハム | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 16 | サラミ | 輸入 | 1/2b | 2007 |
| 17 | サラミ | 輸入 | 3b | 2007 |
| 18 | 生ハム | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 19 | 患者 | - | 1/2a | 2007 |
| 20 | サラミ | 輸入 | 1/2a | 2007 |
| 21 | サラミ | 輸入 | 1/2c | 2007 |
| 22 | 調理環境 | - | 1/2b | 2006 |
| 23 | 患者 | - | 1/2a | 2006 |
| 24 | 標準菌株 | - | 4b | 不明 |
| 25 | 牛肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 26 | 牛肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 27 | 牛肉 2 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 28 | 牛肉 2 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 29 | 牛肉 3 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 30 | 牛肉 3 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 31 | 牛肉 4 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 32 | 牛肉 4 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 33 | 牛肉 5 | 国産 | 4b | 2012 |
| 34 | 牛肉 5 | 国産 | 4b | 2012 |
| 35 | 牛肉 6 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 36 | 牛肉 6 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 37 | 牛肉 7 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 38 | 牛肉 7 | 国産 | 1/2a | 2012 |

| | | | | |
|----|-------|----|------|------|
| 39 | 牛肉 8 | 国産 | 4b | 2012 |
| 40 | 牛肉 8 | 国産 | 4b | 2012 |
| 41 | 牛肉 9 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 42 | 牛肉 9 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 43 | 牛肉 10 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 44 | 牛肉 10 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 45 | 牛肉 11 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 46 | 牛肉 11 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 47 | 豚肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 48 | 豚肉 1 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 49 | 豚肉 2 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 50 | 豚肉 2 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 51 | 豚肉 3 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 52 | 豚肉 3 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 53 | 豚肉 4 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 54 | 豚肉 4 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 55 | 豚肉 5 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 56 | 豚肉 5 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 57 | 豚肉 6 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 58 | 豚肉 6 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 59 | 豚肉 7 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 60 | 豚肉 7 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 61 | 豚肉 8 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 62 | 豚肉 8 | 国産 | 1/2b | 2012 |
| 63 | 豚肉 9 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 64 | 豚肉 9 | 国産 | 1/2c | 2012 |
| 65 | 豚肉 10 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 66 | 豚肉 11 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 67 | 豚肉 12 | 国産 | 4d | 2012 |
| 68 | 豚肉 13 | 国産 | 1/2a | 2012 |
| 69 | 豚肉 14 | 国産 | 1/2c | 2012 |

図 1 . *L. monocytogenes* の PFGE 結果 (*ApaI* 切断)

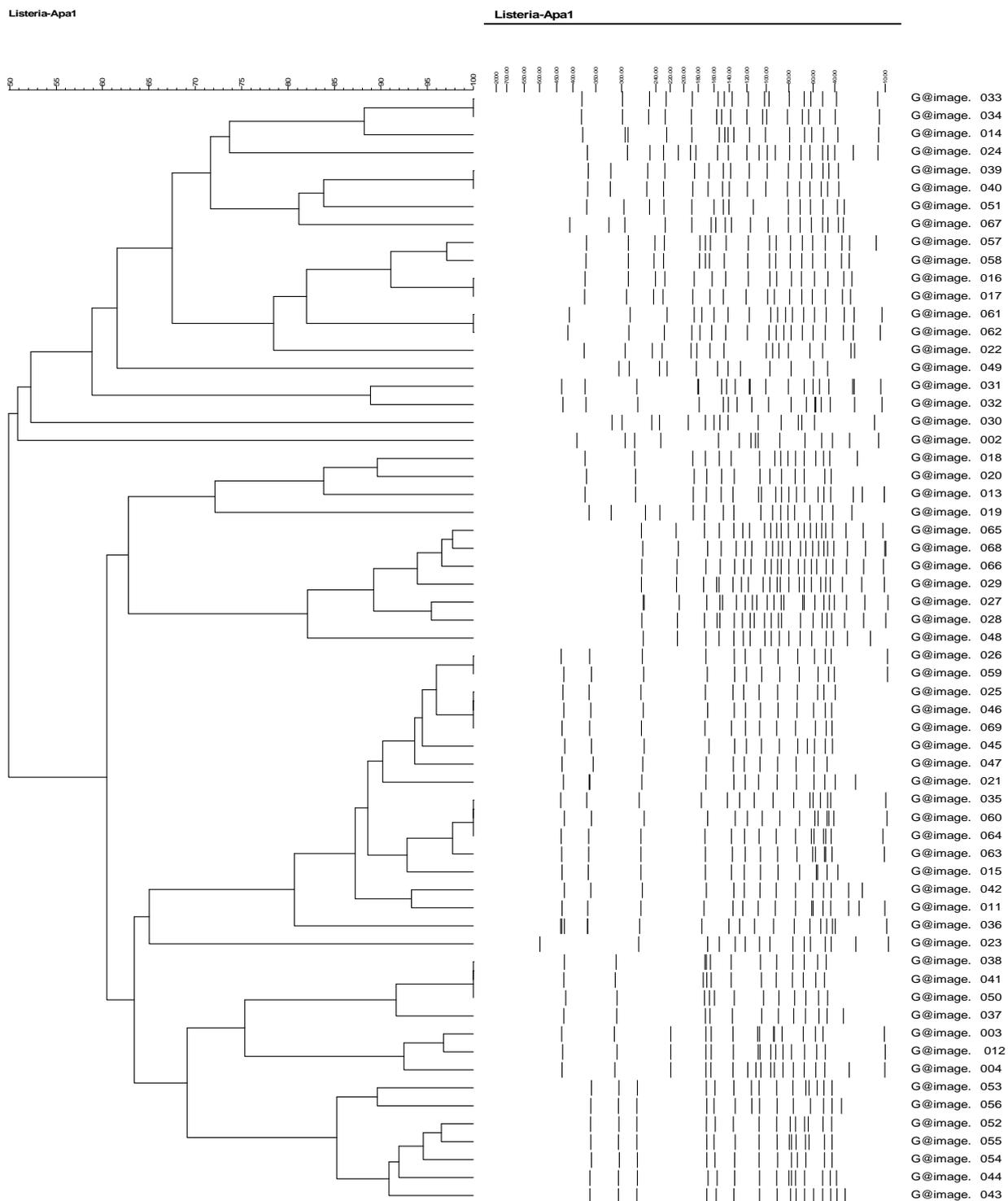


表 2 .

| | 国名 | 発生時期 | 原因食品 | 患者数 | 死者数 | 流産 |
|----|----------------|---------------|--------------------|-----------|-----|----|
| 1 | USA | 2009 | 米国産チーズ | 18 | | |
| 2 | USA | 2009 | 米国産チーズ | 8 | | |
| 3 | オーストリア・ドイツ・チェコ | 2009.6-2010.2 | サワーミルクチーズ(quargel) | 34 | 8 | 0 |
| 4 | デンマーク | 2009.5 | 宅配の牛肉料理 | 8 | 2 | |
| 5 | USA(レイジアナ) | 2010.1-6 | 豚のヘッドチーズ | 8 | 2 | 0 |
| 6 | USA(テキサス) | 2010.11 | セロリ | 10 | 5 | 0 |
| 7 | USA | 2010 | 未定(病院食) | 4 | 不明 | |
| 8 | USA | 2010 | 米国産チーズ | 6 | 不明 | |
| 9 | スイス | 2011.4-7 | イタリア産加熱ハム | 6(+3 疑い例) | | |
| 10 | イギリス | 2011.2 | 病院食のサンドイッチとサラダ | 3 | | |
| 11 | USA(28 州) | 2011.7 - 10 | カンタローブメロン | 147 | 33 | 1 |
| 12 | USA | 2011 | ブルーチーズ | 15 | 不明 | |
| 13 | フィンランド | 2012.7 | 調査中 | 12 | 0 | 0 |
| 14 | USA | 2012.3-10 | イタリア産チーズ | 22 | 2 | 1 |
| 15 | オーストラリア | 2013.1 | チーズ | 18 | 2 | 1 |
| 16 | USA(5 州) | 2013.5-7 | 米国産チーズ | 6 | 1 | 1 |
| 17 | USA(2 州) | 2014.2 | 米国産チーズ | 8 | 1 | 0 |

(別添1)

24 - 48 時間で実施可能な、標準化された PFGE による *Listeria monocytogenes* の分子型別法

[1] 寒天培養からの PFGE プラグの調製

* 微生物危害への注意：リステリア症の感染菌量は確定しておらず、部分的には宿主の感受性によって異なる。ハイリスクグループは妊婦、新生児、免疫抑制疾患の患者と年長者である。そこで、本菌を扱う実験者、特にリスクのあるものは、感染の可能性に注意し、この微生物を用いる際には注意を喚起されなければならない。

試験開始前に、この試験法を全文読むこと。菌液やプラグに接触したすべてのプラスチック製品、ガラス製品、ピペット、ヘラなどは汚染物質として扱い、廃棄またはその研究所のガイドラインに従って除染すること。再利用可能なプラグモールドは、洗う前に除染すること。使い捨てモールドは、テープやプラグをウェルから押し出すタブも含めて汚染されており、洗って再利用するならば 10%の漂白剤で少なくとも 30 分除染しなくてはならない。

0 日目：試験培養から分離した集落を BHI 寒天平板に画線し、十分な培養を得る。培養ごとに保存バイアルを作製することを推奨する。TSA か HIA または同様の培地を入れたスクリーキャップの小チューブのスタブを作成し、平板に菌を植えたものと同じ白金耳で撮取する。この操作により、必要に応じて同じ集落の再試験を行うことができる。37 で 13 - 18 時間培養する。

1 日目：

- 1 . 振盪培養器つき温浴槽またはふらん器(54-55)、静置式温浴槽 (55 - 60) と分光光度計のスイッチを入れる。
- 2 . TE バッファーを用意する。
(TE バッファーは、プラグ用あがろーすの作成、菌液の懸濁、溶解プラグの洗浄に用いられる。)
- 3 . Lysozume(Sigma L7651 か同等品)ストック液 (20mg/ml in TE) を用意する。
- 4 . プラグ作成のため、1% SeaKem Gold agarose + 1%SDS を T10E1 に入れたものを用意する。

* 安全上の注意：電子レンジ後の熱いフラスコを取り扱うときには、耐熱手袋を使用する。

注：SeaKem Gold agarose は、プラグの溶解や洗浄ステップでの崩壊を最小限にしうる強度を付与するため、PFGE プラグの作成に好都合である。アガロース溶解は完全でなくてはならず、その温度と時間は使用する電子レンジによって異なり、各試験所で決めなければならない。

- 5 . 小試験管に培養番号をラベルする。
- 6 . 5 の試験管に、2ml 以内の TE バッファーを移す。滅菌ポリエステル線維か滅菌 TE で湿らせた綿スワブを用いて、寒天平板から菌を取り、菌が十分に溶け、気泡発生が最小限になるように静かに回転させて TE に溶かす。

注：必要な菌液量は、菌濃度を測るキュベットや試験管の容量、使用する分光光度計や濁度計に依存する。

- 7 . 菌液濃度を下記に示す値に調整する。
 - a. 分光光度計：610nm 波長で、吸光度 1.00 (0.8-1.0 の範囲)
 - b. Dade Microscan Turbidity Meter：0.4-0.45(Falcon2054), 0.58-0.63(Falcon 2057)
 - c. ビオメリュー Vitek 可視光計：17～18%以内(Falcon2054)

注：上記の値は、CDC でよい結果が得られたものであり、機器や試験管が異なれば、それぞれの研究所でよい結果を得られる別の適した濃度を設定する必要がある。

プラグ作成

培養番号で PFGE プラグモールドの各ウェルをラベルする。プラグモールドを再利用する場合には、以前のラベルの上にテープを貼る。

注1：未使用のプラグ用アガロースは室温に保存し、1 - 2 回再利用する。弱 中出力で 10 - 15 分間電子レンジにかけ、混和する。5 - 10 秒間隔で繰り返し、アガロースを完全に溶解する。このステップは迅速に行う。

注2：ProteinaseK 溶液(20mg/ml)は市販されている。変法として、粉末と滅菌超純水から作成することもできる。小試験管に 300 - 500 μ l ずつ分注し使用まで 20 に保存するのが最も良い結果が得られる。使用直前に、必要数のチューブを溶かし、溶液は水中に保存する。粉末から調整した場合、作業日の終わりに溶解した液をすべて廃棄する。市販の溶液は、販売者の指示に従って保存する。

- 1 . 400 μ l の調整菌液を、ラベルした 1.5ml の遠心チューブに移す。

2. 20 μ l の溶解した Lysozyme ストック液を各チューブに入れ、静かに混ぜる。10 - 20 分間 55 - 60 に温浴する。使わなかった溶解 Lysozyme 液は廃棄する。
3. 20 μ l の溶解した Proteinase K 溶液を各チューブに入れ、ピペットで静かに混ぜる。(10 の菌液に 200 μ l 必要となる。)
4. 400 μ l の溶解した 1%SeaKem Gold agarose 液を 0.4ml の菌液に入れ、ピペットで 2 - 3 回静かに混ぜる。温水 (55 - 60) の入ったビーカー中にフラスコを保持し、アガロースが溶解したままの温度を保つ。
5. ただちに、プラグモールドのウェルに混合液を分注する。気泡が発生してはならない。各サンプルに 2 つのプラグが作成でき、再試験が必要な時に有益である。室温で 10 - 15 分間プラグを固まらせる。冷蔵庫 (4) で 5 分静置してもよい。

注：もしディスポモールドを使用するならば、200 μ l の菌液、10 μ l の lysozyme、10 μ l の ProteinaseK、200 μ l のアガロースを用い、4 つのプラグを作成することができる。

注：菌液調整とプラグの作成は、菌の不要な溶解を最小限にするために、素早く行わなくてはならない。もし数多くのサンプルを調整する場合は、一度に 10 以内のバッチを処理することを推奨する。最初のバッチが溶菌段階に入ったら、次のグループを開始する。最初のバッチの溶解時間が長くなっても結果には影響を与えないので、すべてのバッチを溶解しおえてから、洗浄は一緒に行ってよい。

アガロースプラグ内での溶菌

注：同じ菌株由来の 2 プラグ (再利用可能なプラグモールド) または 3 - 4 プラグ (ディスポモールド) は、同じ 50ml チューブ内で溶菌してよい。

1. 50ml チューブに菌番号をラベルする。
2. 溶菌バッファーを調整する。
3. 溶菌/ProteinaseK 溶液の必要量を計算する。
 - a. チューブあたり 5ml の溶菌バッファーが必要となる。
 - b. チューブあたり 25 μ l の ProteinaseK 溶液が必要となる。
 - c. 溶菌バッファーと ProteinaseK 溶液の正確な量を測り、マスターミックスを調整してよく混和する。

注:溶菌液中の ProteinaseK の終濃度は 0.1mg/ml であり、菌懸濁液に加える濃度(0.5mg/ml)とは異なる。

4. ラベルした 50ml チューブそれぞれに 5ml の溶菌/ProteinaseK 溶液を入れる。
5. プラグの上にはみ出たアガロースをメス、剃刀の刃などで切り取る。再利用可能なプ

ラグモールドを開き、プラグを 6 mm幅のへらでラベルしたチューブに移す。ディスボモールドの場合は、底からテープを取り外し、ラベルされたチューブ内にプラグを落とし込む。プラグが確実にバッファーの中に入り、チューブの壁面につかないようにすること。

注：切り取ったプラグ、モールド、へらなどは汚染されているので、廃棄するか適切な方法で除染すること。

6. 再利用可能なモールドからテープを除去する。モールドの両面、へら、メスを 70%イソプロパノールかエタノールまたはその他の適した除染剤に浸す。洗浄前に 15 分は浸漬する。ディスボモールドは廃棄するか、10%漂白剤で 30 - 60 分浸してから洗浄、再利用する。

7. チューブをラックに入れ、54 - 55 の振盪恒温槽またはふらん器で 2 時間振盪する(150 - 175rpm)。溶解を恒温水槽で行う場合、水面が溶菌バッファーの水面よりも上になるようにする。

8. あらかじめ 54 - 55 に温めた超純水を用い、プラグを 10 - 15ml の超純水で 2 回洗浄する。

溶菌後のアガロースプラグの洗浄

注：多くの実験室では、54 から 55 での以下の洗浄ステップに耐えうる強度のプラグを作っている。しかし、もし角が欠けていたり壊れていた場合には、洗浄ステップの温度を 50 以下にする必要がある。

1. チューブを恒温槽から取り出し、溶菌バッファーを注意深く適した廃棄容器に捨てる。スクリーンキャップかへらを使い、プラグがチューブ内に残るようにする。

注：この操作及び続く操作で、チューブやスクリーンキャップの端をペーパータオルで押さえ、液体をすべて取り除くことが重要である。

2. 54 - 55 に予熱した 10 - 15ml の滅菌超純水を加え、54 - 55 で 10 - 15 分振盪する。

3. 水を取り除き、洗浄ステップを再度繰り返す。

- a. TE バッファーを 54 - 55 に予熱しておくこと。水での洗浄終了後すぐに 10 - 15ml の TE バッファーで 4 回洗浄する。

4. 水を廃棄し、10 - 15ml の予熱した滅菌 TE バッファーを加える。54 - 55 で 10 - 15

分振盪する。

5. TE を廃棄し、さらに 3 回洗浄を繰り返す。

6. 最後の洗浄液を捨て、5 - 10ml の滅菌 TE を加える。「制限酵素による切断」の章のステップ 1 を行うか、TE バッファー中でプラグを使用するまで 4 に保存する。保存するプラグは小チューブに移してもよい。

注：もし制限酵素による切断を同日に行うなら、次章のステップ 1 から 3 は最後まで実施する。最後の TE での洗浄の後は、使用時まで保存できる。

アガロースプラグ中での DNA の制限酵素による切断

注：プラグの小片または全体（ディスポモールドでつくられたもの）は制限酵素で切断可能である。制限酵素の必要量が少なく済み、また、残りをほかの酵素（AscI など）での切断に使用できるため、プラグ小片の制限酵素切断を推奨する。第 2 の酵素による切断解析は、第 1 の酵素による PFGE パターンで 2 つまたはそれ以上の株の区別ができない場合に有効である。第 2 の酵素の使用は、区別できない PFGE パターンを示す株の確認に有効である。

1. 1.5ml のエッペンチューブに菌番号をラベルする。3 本（10 ウェルのゲルの場合）または 4 本（14 ウェルのゲルの場合）のチューブを、Salmonella Braenderup H9812（スタンダード）用にラベルする。

a. 制限酵素切断前の任意のステップ：10 倍の制限酵素バッファーを 1：10 の滅菌蒸留水で、以下のように希釈しマスターミックスを作る。

- b. 200 μ l の 1 倍制限酵素バッファーをラベルしたチューブに入れる。
- c. 注意深くプラグを TE バッファーからヘラでディスポシャーレに入れる。
- d. 各サンプルと必要数のスタンダードについて、2 - 2.5 mm 幅の小片を切り出し、制限酵素バッファーの入ったチューブに加える。プラグ小片がバッファーの中に浸っていることを確認する。プラグの残りは元のチューブに戻し、4 に保管する。

注：プラグのサイズと形は、コームの歯のサイズによって異なる。パルスネットでは、コンピューター解析がより正確になり、より小さい歯（5.5 mm）のコームを用いた場合よりシャープな結果が得られやすいため、大きい歯の（10 mm 幅）コームを推奨する。プラグから

切り出せる小片の数は、実施者の技術と経験、プラグの出来、小片を水平にカットするか垂直にカットするか（ディスポモールドの場合）による。

- e. S. Braenderup H9812 のプラグから 2mm 幅の小片 3 - 4 個を切り出し、希釈されたバッファーを含むチューブに移す。プラグ小片がバッファーに完全に浸っているよう注意する。プラグの残りは、5ml の TE バッファーが入った元のチューブに戻し、4 に保管する。
- f. 検体とコントロールのプラグ小片を 25（ApaI の場合）または 37（AscI と XbaI の場合）の恒温水槽に入れて 5 - 10 分、又は室温で 10 - 15 分培養する。
- g. その後、バッファーをプラグ小片からピペットを用いて取り除く。ピペットでプラグを傷つけたり、チップに吸い込んだりしないよう気を付ける。

2. 制限酵素マスターミックスを、10 倍制限酵素バッファーを滅菌蒸留水で希釈したものを、ApaI(50U/sample)または AscI(40U/sample)を下記の表に従って加えて、作成する。バッファー希釈に用いたのと同じチューブ内で混和する。

注：制限酵素のチューブは、常時氷中か低温コンテナ（-20）に保持すること。

3. 各チューブに 200 μ l の制限酵素ミックスを加える。チューブのふたを閉じ、静かにたたいて混和する。プラグ小片が必ず液中にあるように注意する。

4. サンプルとスタンダードの小片を酵素の種類に適した温度で 2 - 3 時間培養する。

- a. ApaI の場合は 25。
- b. AscI または XbaI の場合は 37。

5. プラグ小片をウェルに入れる場合は、制限酵素切断反応が終わる 1 時間前に、次章（アガロースゲルのキャスト）のステップ 1 - 4 を続け、PFGE プラグを乗せるより少なくとも 30 分前にゲルが固まっているようにする。

アガロースゲルのキャスト

A. 制限酵素切断されたプラグ小片をコームに乗せる方法

1. 恒温水槽が 55 - 60 になっていることを確認する。
2. ゲルと泳道バッファーに必要な量の 0.5 倍の TBE バッファーを作成する。
3. 1%SeaKem Gold アガロースを、0.5 倍の TBE バッファーを用いて下記のように作成する。
 - a. 500ml のフラスコに必要な量のアガロースを秤量する。
 - b. 必要量の 0.5 倍の TBE バッファーを加え、静かに混和する。

- c. キャップを緩めるか、取り除いてラップをふわりと掛け、電子レンジで 60 秒加熱し、静かに混ぜる。アガロースが完全に溶けるまで、15 秒間隔で繰り返す。
- d. キャップを締め直し、55 - 60 の恒温水槽に入れ、15 分あるいは使うまで置いておく。

14 cm幅のゲル台（10 または 15 ウェル）には、1g のアガロースを 100ml のバッファーで溶かす。

21 cm幅のゲル台（15 以上のウェル）には、1.5g のアガロースを 150ml のバッファーで溶かす。

安全上の注意：電子レンジ後の熱いフラスコの取り扱いには、耐熱手袋を使用する。

4. 少量（2 - 5ml）の溶かして冷ました（55 - 60 ）1%アガロースを、プラグを乗せた後にウェルをふさぐのに用いる。上述のように、250ml のフラスコで 0.5g のアガロースを 50ml のバッファーで溶かしたものを用意する。残ったアガロースは室温に保存し、溶かして数回再利用できる。電子レンジに 15 - 20 秒かけ、混ぜるのを 10 秒間隔で完全に溶けるまで繰り返す。使用まで 55 - 60 の恒温水槽に置く。もしくは、ゲルの作成に用いたアガロースから 5ml 取り分けておき、使用まで 55 - 60 の恒温水槽においておく。

注：ゲル台を水平な作業台に置き、完全に水平になるように調節する。コームホルダーを正面（小さい金属スクリューのある側）に置き、歯をゲル枠の外に向け、コームの歯がゲル台に接触するようにする。

5. 制限酵素切断されたプラグ小片を恒温水槽からだし、酵素ミックスを除去する。200 μ l の 0.5 倍 TBE バッファーを加え、室温で 5 分培養する。
6. プラグ小片をチューブからだし、コームをキャビネット内に置き、コームの歯にプラグ小片を下記のように乗せる。
 - a. スタンドをレーン 1, 5, 10（10 ウェルの場合）またはレーン 1, 5, 10, 15（15 ウェルの場合）に乗せる。
 - b. サンプルを残りの歯に乗せる。
7. 余分なバッファーをティッシュで除去する。プラグ小片をコーム上で 3 - 5 分風乾させるか、55 - 60 の 1%アガロースでシールする。
8. コームをゲル台に設置し、プラグ小片が正確にコームの歯の底辺に並んでいることを確認する。プラグ小片の底辺が黒いゲル台底面に接しており、気泡がないようにす

- る。
- 9 . 注意深くゲル台にアガロース (55 - 60) を注ぐ。
 - 10 . 黒いゲルフレームを泳動槽に置く。調整したての 2 から 2.2L の 0.5 倍 TBE を注ぐ。カバーを閉じる。(バッファの必要量は、前回の泳動時のバッファがチューブ内に残っているかどうかで異なる。)
 - 11 . 電源装置、ポンプ、冷却装置 (14) をオンにする。(1L /分の流量を 70 までにする。)
 - 12 . 30 - 45 分後に固まったゲルからコームを抜き取る。
 - 13 . ゲルのウェルに、55 - 60 の 1%アガロースを満たす(任意)。ねじを外し、ゲル枠を台から外す。側面や底面に残った余分なアガロースをティッシュで取り除く。ゲルを台に乗せたまま、黒いゲルフレームに設置する。泳動槽のカバーを閉じる。

B. ウェルの中に制限酵素切断されたプラグを入れる方法

- 1 . A のステップ 1 - 4 を実施する。

注：ゲル台は水平な作業台に置き、ゲルを入れる前に完全に水平に調整する。コームホルダーを正面(小さい金属スクリューのある側)に置き、歯をゲルのボトムに向け、コームの歯の端がゲル台表面の 2 mm上になるようにする。

- 2 . 溶かした 1%アガロースを 55 - 60 の恒温水槽中で 15 - 20 分冷ます。アガロースを注意深く、コームをセットしたゲル台に注ぐ。気泡ができないよう気を付ける。
- 3 . 黒いゲルフレームを泳動槽に置く。調整したての 2 から 2.2L の 0.5 倍 TBE を注ぐ。カバーを閉じる。(バッファの必要量は、前回の泳動時のバッファがチューブ内に残っているかどうかで異なる。)
- 4 . 冷却装置 (14)、電源装置、ポンプ 1L /分の流量を 70 までにする)のスイッチを、泳動開始の約 30 分前にオンにする。
- 5 . 制限酵素切断されたプラグ小片を恒温水槽からだし、酵素ミックスを除去する。200 μ l の 0.5 倍 TBE バッファを加え、室温で 5 分培養する。
- 6 . コームを、少なくとも 30 分間固めたゲルから除去する。
- 7 . 制限酵素切断されたプラグを、ヘラの細かい先を用いてチューブからだし、ウェルに入れる。ヘラの広い先でプラグをそっと底に押し込み、ウェルの前面に寄せる。ヘラを操作し、気泡がないようにする。

- a. スタンダードをレーン 1, 5, 10 (10 ウェルの場合) またはレーン 1, 5, 10, 15 (15 ウェルの場合) に乗せる。
- b. サンプルを残りの歯に乗せる。

注：ゲル小片に乗せるのは、ゆっくりと操作してよい。各人は、ゲル小片をウェルに乗せるための技術を向上させれば、レーンがまっすぐになり、バンドがシャープな結果が得られる。

14. 8. ウェルに 55 - 60 の溶かした 1% アガロースを満たす。3 - 5 分固める。ねじを外し、ゲル枠を台から外す。側面や底面に残った余分なアガロースをティッシュで取り除く。ゲルを台に乗せたまま、黒いゲルフレームに設置する。泳動槽のカバーを閉じる。

電気泳動条件

- 1a. ApaI または AscI で切断された *L. monocytogenes* の CHEF Mapper での泳動には、下記の条件で実施する。

Auto Algorithm

49kb-low MW

450kb-high MW

Select default values except where noted by pressing "enter".

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

泳動時間は 18 - 19 時間に変更する

- 1b. CHEF-DRIII での泳動には、下記の条件で実施する。

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

Voltage: 6V

Included angle: 120°

Run time: 18-19h

- 1c. CHEF-DRII での泳動には、下記の条件で実施する。

Initial Switch time=4.0s

Final switch time=40.0s

Short ratio: 1.0

Voltage: 6V

Run time: 19-20h

注：上に推奨した泳動時間は CDC の機器及び試薬での結果に基づいている。泳動時間は試験所により異なり、それぞれのゲルで適正化されなければならない。スタンダードの最小バンドがゲルボトムから 1 - 1.5 cmの位置にくるようにすべきである。

注：機器の初めのmA を記録しておく。初期mA は、110 から 170mA の間でなくてはならない。この範囲を超えた場合には、0.5 倍 TBE バッファの作成が間違っており、バッファを作り直さなくてはならない。

2 日目

PFGE アガロースゲルの染色と画像化

1. 電気泳動が終了したら、機器の電源を切り、ゲルを除去してエチジウムブロマイドで染色する。40 µl のエチジウムブロマイドストック液 (10 mg/ml) を 400ml の純水で希釈する (この容量は、14×24 cmの染色槽向けである。より大きい容器には、より大量の染色液が必要となる。) ゲルを蓋をした容器内で 20 - 30 分染色する。

注：エチジウムブロマイドは有害で発がん性がある。10 mg/ml のストック液はいくつかの会社から市販されている。希釈された液は褐色ビン中で保存し、有害廃液に関するそれぞれの試験所のガイドラインに従って廃棄する前に 6 - 8 回使用できる。CDC はエチジウムブロマイドを排水に流すことは推奨しない。エチジウムブロマイドを含む水溶液は炭でろ過するか、活性炭を用いて分解するか、市販のエチジウムブロマイド除去製品を用いて処理する。除去されたのちは、水溶液を排水に流してもよい。エチジウムブロマイドについてさらに質問があれば、販売業者やメーカーの Material Safety Data Sheets を参照のこと。

2. 500ml の純水で 60 - 90 分ゲルを脱色する。20 分おきに水を取り換える。ゲルイメージを取り込む。バックグラウンドが高すぎる場合には、脱色をさらに 30 - 60 分行う。

注：もしデジタルイメージと通常の写真の両方がほしければ、デジタルイメージの前に写真を撮る。

3. イメージャーの指示に従い、イメージをセーブする。BioNumerics で解析するには、このファイルを tif に変換する。ゲルイメージは、全体像を保存し、ウェルや下部のバンドをカットしてはならない。イメージのピントが合っているように注意し、バンドの露光過剰によるサチュレーションがないようにする。詳細は PulseNet QA/QC マニュアルの PNL07 を参照のこと。

4. 泳動槽からバッファーを除去し、廃棄する。泳動槽を 2 L の純水ですすぐ。もし数日間使わないなら、5 - 10 分間ポンプで水を循環させ、それから廃棄する。

5. もしスタンダードの最小バンドがゲルボトムの端から 1 - 1.5 cmのところになれば、それぞれの試験所で泳動時間を設定しなければならない。

もし PFGE の結果が 24 - 48 時間以内に得られなければならないのでなければ、以下の検討をする。

1. プラグの溶菌をより長い時間にする (3 - 16 時間)。

2. 溶菌バッファーを取り除くための TE での洗浄ステップを長時間 (30 - 45 分) 低温で (37 °C 又は室温) 行う。1 日目に開始し、プラグを TE 煮付けて冷蔵庫で保存して 2 日目に終了する。

3. 制限酵素切断をより長時間 (3 - 16 時間) 行う。

4. スタンダードの最小バンドがゲルボトムの 1 - 1.5 cmのところに見えなければ、泳動時間を各試験所の条件に合わせて決めなければならない。

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」
分担研究報告書

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

分担研究者 豊福 肇 山口大学共同獣医学部

研究要旨

食品の国際貿易の拡大に伴い、微生物に汚染された食品は国境を越えて移動し、それに伴い、アウトブレイクも世界各国に瞬く間に拡散し、世界中で健康被害が生じる。本研究では、WHO の INFOSAN Emergency を通じ、国際的に警報が発生された事例、欧州の 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。また、既存の定量的確率論的モデルを用いて、*Salmonella* 属菌及び *Listeria monocytogenes* に関する輸入食品によるリスクを推定した。

A. 研究目的

本年度は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米国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。

B. 研究方法

- 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。
- 3) web 上で使用できる確率論的リスク評価ツールを用いて輸入食品中のハザードによるリスクを推定した。

C. 研究結果

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り

- ・ 世界規模で重要な食品安全情報を広める
 - ・ 汚染食品の国際的な拡散を防ぐことをゴールとした協力の改善
- を目的としている。

毎月、INFOSAN のグローバル サーベイランスには、平均 157 件の国際的に重要と考えられる食品安全上の懸念疑い事例を月 157 件の通報がある。そのうち、平均 10.5 事例は INFOSAN によるフォローアップ活動が必要となる。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るので、月平均 1.25 件の INFOSAN Emergency アラートが発せられる。

過去の INFOSAN Emergency アラートの事例としては、2005 年 7 月フランスから主にアフリカの 13 か国へ向けて出荷された乳児用調製粉乳から *Salmonella* 属菌が検出され、すべての 13 か国がアラートメッセージを受け、

ほとんどの国は follow up 情報を要求した。これらの国は公式の情報を INFOSAN からのみ受信したと報告した。

2007年3月、米国がメジャーなブランドのピーナッツバターが *Salmonella* に汚染していることを突き止められた。この製品はおよそ70か国に輸出されていた。さらに、当該製品はインターネットを通じても販売されていたため、製品のトレイバックは非常に難しかった。すべての INFOSAN メンバーが INFOSAN アラートを受信した。

平成 25 年度の INFOSAN アラート

平成 25 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 2 件発せられた。また、健康被害はなかったものの、ボツリヌスの汚染が疑われ、INFOSAN が活発に活用された事例があったので、それをあわせて紹介する。

事例 1

トルコから輸入されたタヒニセサミペーストによる米国及びニュージーランドにおけるサルモネラ症アウトブレイク

- 日時：6月12日，2013
- 関係国：アルバニア、デンマーク、旧ユーゴスラビアマセドニア共和国、ドイツ、ギリシャ、イラク、リビア、ニュージーランド、ルーマニア、サウジアラビア、スウェーデン、アラブ首長国連邦、イギリス、米国、イエメン、トルコ
- 食品カテゴリー：ナッツ及びオイルシード
- 汚染食品：タヒニ (Tahini)
- 報告された疾病：米国 8 人、ニュージーランド 17 人
- IHR への報告：あり
- 病原体：*Salmonella* Montevideo 及び *Salmonella* Mbandaka

事例 2

冷凍ベリーに関連したデンマーク、フィンランド、ノルウェー及びスウェーデンで発生した

A 型肝炎 (HAV) (サブジェノタイプ IB) によるアウトブレイク

- 2012年10月1日から2013年4月8日までに16人のA型肝炎ウイルスの確認患者が報告され (サブジェノタイプ IB) 同一の RNA シークエンスがデンマーク、フィンランド、ノルウェー及びスウェーデンで発見された。
- いずれの患者も、暴露されたと考えられる期間に、EU 外への渡航歴はなかった。アウトブレイク調査の結果、冷凍ベリーが原因食品と推定された。
- 食品カテゴリー：野菜果実
- 汚染食品：冷凍ベリー
- 報告された患者数 16 人
- IHR への報告：あり
- 病原体：A 型肝炎ウイルス

事例 3

ニュージーランドのホエイタンパク濃縮中の *Clostridium botulinum* 汚染疑惑事件

2013年3月にオーストラリアの Damum 工場で行われた 5 バッチの粉末栄養製品のスクリーニング自主検査において、*Clostridium* 属菌が検出され、最終製品の *Clostridium* のレベルが自主規格を超えていた。そのため、この粉末栄養食品の原料として使用したホエイタンパク濃縮 (WPC) の保存検体について *Clostridium* 属菌の検査を行ったところ、やはり陽性であった。問題は2012年5月に、ニュージーランドの Fonterra Hautapu 工場で製造された 3 ロットの WPC と特定された。その後の検査により、*Clostridium* 属菌は *C. botulinum* の性状と一致したため、Fonterra社はニュージーランド政府に2013年8月2日に報告した。

当該 WPC は乳児用調製粉乳、清涼飲料水、乳製品等の原材料として使用されていたため、この時点で大規模な改修が行われた。

その後のニュージーランド政府の検査機関での検査及び米国 CDC での検査により、この

菌は *C.botulinum* ではなく、毒性のない *C. sporaoges* であること、国際的な標準法であるマウスバイオアッセイによりボツリヌスの毒性を産生していないことが確認された。

世界中どこからも、本 WPC の喫食による乳幼児ボツリヌス症患者の発生報告はなかった。

参考文献

WPC 2013 Response Report, Laboratory Identification of the Fonterra bacteria isolates. MPI technical Paper..

<http://www.mpi.govt.nz/Portals/0/Documents/food/wpc/wpc2013-response-report.pdf>

INFOSAN 活動報告書のレビュー

2011 及び 12 年の INFOSAN 活動報告書をレビューした。

表 1 地域別イベント数

| 地域別 | 2011 年の INFOSAN Emegensy イベント数; 46 | 2012 年の INFOSAN Emegensy イベント数; 46 |
|------------------------------|--|--|
| Africa (AFRO) | 2 | 2 |
| Americas (AMRO) | 22 | 19 |
| Eastern Mediterranean (EMRO) | 6 | 3 |
| Europe (EURO) | 21 | 27 |
| South-East Asia (SEARO) | 3 | 6 |
| Western Pacific (WPRO) | 17 | 19 |

アフリカ、ヨーロッパ及び西太平洋地域事務所でのアラート発生が多かった。

表 2 食品カテゴリー別イベント数

| 食品カテゴリー | 2011 年 46 件 | 2012 年 42 件 |
|-------------------|----------------|----------------|
| アルコール飲料 | 2 | 1 |
| 動物用飼料 | 1 | 1 |
| シリアル及びシリアルベースの食品 | 0 | 2 |
| 複合食品 | 4 | 0 |
| 動物及び植物由来の脂肪及びオイル | 1 | 0 |
| 魚及びその他の海産食品 | 3 | 4 |
| 乳児用及び小児用食品 | 1 | 2 |
| 野菜果実及びその製品 | 7 | 5 |
| ハーブ、スパイス及び 香辛料 | 3 | 3 |
| 豆類 | 1 | 0 |
| 食肉及びその製品 | 5 | 5 |
| 乳及び乳製品 | 3 | 6 |
| ナッツ及びオイルシード | 5 | 2 |
| 特殊栄養用途食品 | 3 | 3 |
| スナック、デザート及びその他の食品 | 0 | 1 |
| 砂糖及び菓子 | 1 | 2 |
| 不明 | 2 | 2 |
| 野菜およびその製品 | 4 | 3 |

Emergency アラートが多い食品は魚及びその他の海産食品、野菜果実及びその製品、食肉及びその製品、乳及び乳製品などであった。

表 3 食品ハザード別イベント数

| ハザード | 2011年 46件 | 2012年 42件 |
|--------------------------------|-----------|-----------|
| African Swine Fever Virus | 1 | 0 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 0 | 1 |
| <i>Brucella</i> spp. | 2 | 1 |
| <i>Clostridium botulinum</i> | 7 | 4 |
| <i>Cronobacter sakazakii</i> | 1 | 1 |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | 0 | 1 |
| <i>Escherichia coli</i> | 6 | 4 |
| Hepatitis A Virus | 1 | 0 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 2 | 2 |
| Norovirus | 0 | 1 |
| <i>Salmonella</i> spp. | 10 | 13 |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 0 | 1 |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 1 | 0 |
| 複数の Hazards | 0 | 1 |

通報原因となったハザードとしては *Salmonella* spp. *Clostridium botulinum* 及び *Escherichia coli* が多かった。

2. 欧州の RASFF の解析

2012年の食中毒関連の通報としては乳児13人を含む16人がベルギー産の乳児用調製粉乳の喫食によりサルモネラ症を発症する事例があった。ベルギー政府の当初の調査では汚染源は発見できなかったが、その後、オランダが韓国産のガラクトオリゴ サッカライド (GOS) 中の *Salmonella* Oranienburg を報告し、問題となった乳児用調製粉乳を製造していたベルギーの施設は当該 GOS を乳児用及び医療用の調製粉乳の原材料として使用し、添加後、包装されるまでの間に加熱処理を受けてい

ないことが判明した。これは INFOSAN Emergency として関係国にも情報提供された。

そのほか、INFOSAN Emergency で、通報があった事例としては米国産のピーナッツバターと中国産冷凍ストロベリーの事例があった。

表4 RASFFで食中毒によるアラートが発せされた事例(2012年)

| ハザード | 食品 | 患者 | 原産国 |
|-------------------------------|-------------|-------|---------------|
| <i>Salmonella</i> Oranienburg | 乾燥調製粉乳 | 16 | ベルギー |
| Norovirus (genegroup I& II) | カキ | 18 | アイルランド (仏) 経由 |
| Norovirus (genegroup I& II) | カキ | 20 | アイルランド (仏) 経由 |
| Norovirus | カキ | 4 | アイルランド (蘭) 経由 |
| <i>Salmonella</i> | 食肉製品 | 3 | ルーマニア |
| STEC O157:H7 | スパイシーミンチ肉 | 1 | ベルギー |
| <i>Clostridium botulinum</i> | オリーブ | 1 | イタリア |
| <i>Salmonella</i> Dublin | 未殺菌乳を使ったチーズ | 多数 | 仏 |
| <i>Salmonella</i> Group D | 液卵 | 1 | 仏、UK 経由 |
| Norovirus | 冷凍いちご | 11200 | 中国 |

| | | | |
|-------------------------------|------------------|----|----------|
| <i>Salmonella</i> Bredeney | ピーナ ツツバ ター | 41 | US |
| Norovirus | カキ | 15 | 仏 |
| <i>Salmonella</i> Newport | スイカ | 2 | ブラジ ル |

食品中に病原微生物が検出されたことによる通報事例としては、二枚貝及び軟体動物ではサルモネラ（7から18）及びノロウイルス（2から7）による通報が2012年は2011年よりも増加していた。サルモネラの増加はインドネシア産の冷凍イカからイタリアにおいて、14件サルモネラ属菌が検出されたことによる。

鶏肉のサルモネラの通報が2011年の42件から2012年には54件に増加したが、これは2012年12月1日から生鮮の鶏肉のサルモネラ属の微生物規格が強化されたためである。

また、タイ産のツナ缶で、病原体以外の微生物の増殖により、20件の通報があったが、病原体ではないものの、缶詰でのこのような菌の増殖はボツリヌスのリスクにつながるので注意が必要である。

動物性食品以外では通報は2011年に比べ、2011年は減少していたが、ナッツ類及びその加工品のみは例外でサルモネラ属菌による通報が20件報告されていた。国と食品別でワースト10に入ったのはバングラデシュ産の野菜果実中のサルモネラ属菌のみであった。

引用文献：The Rapid Alert System for Food and Feed(RASFF), 2012 Annual Report

3. i-risk を用いたリスク評価

FDAのiRISKはweb-basedシステムで、食品中のハザードのデータからポピュレーションレベルの健康バーデンを推定することができる。必要とされるデータは食品の喫食量、汚染率、初期汚染濃度、加工・調理法、ハザード、用量反応曲線のパラメータ、ヒトがハザード

ドを摂取した結果もたらされると予測される健康被害等である。これらの要素の各々が、最終的なリスクの推定のベースになる。

ソフト熟成チーズ中の *Listeria monocytogenes*（以下、「LM」という。）についてリスク評価を行った。日本国民が全員年1回、輸入のソフト熟成チーズを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は1.36人、DALYは4.89、一回の喫食機会当たりの感染リスクは 3.83×10^{-8} と推定された。

初期汚染濃度は食品安全委員会リステリアモノサイトゲネスのリスク評価書より輸入ナチュラルチーズのLM分離率2.2%を、初期汚染濃度は同評価書で、MPNとして10未満であったことから、最小0、最大1 log 10 CFU/gの均一分布を適用した。（その結果、初期平均濃度は0.592 log₁₀ cfu/gとなった。）包装単位は製造時、市販時とも200gとした。消費者の保存中のLMの増殖は同評価書から、最小0、モード2.4、最大4 log₁₀cfu/gの増殖という三角分布を適用し、その結果、最終濃度の平均は3.34 log₁₀ cfu/g（汚染率は2.2%のまま）となった。

日本人を65歳以上、周産期、それ以外の3つの集団に分類し、それぞれ、平成23年の人口のデータを用い、またexponential dose responseのrの値をそれぞれ、8.39E-12、4.5E-11、5.34E-14とした。平均の発症確率はそれぞれの集団で、順に4.08E-8、1.09E-7、3.08E-10、年間の患者数は1.22、0.113、0.03人、年間のDALYは3.16、1.58、0.15であった。

次に同モデルを用いてスモークサーモン中のLMについて評価を行った。日本国民が全員年1回、輸入のスモークサーモンを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は819人、DALYは3630、一回の喫食機会当たりの感染リスクは0.0000284と推定された。

初期汚染濃度は食品安全委員会リステリアモノサイトゲネスのリスク評価書よりスモークサーモンの LM 分離率 4.3%を、初期汚染濃度は同評価書で、MPN として 100 未満と 10 未満が 2 検体ずつであったことから、最小 0、最大 $2 \log_{10}$ CFU/g の均一分布を適用した。(その結果、初期平均濃度は $1.33 \log_{10}$ cfu/g となった。)包装単位は製造時、市販時とも 500g とした。消費者の保存中の LM の増殖は同評価書から、最小 2、モード 4、最大 $6 \log_{10}$ cfu/g の増殖という三角分布を適用し、その結果、最終濃度の平均は $6.02 \log_{10}$ cfu/g (汚染率は 4.3%のまま)となった。

チーズと同じ 65 歳以上、周産期、それ以外の 3 つの集団に分類し、同じ exponential dose response の r の値を用いた。平均の発症確率はそれぞれの集団で、順に 0.0000227、0.000125、 $1.50E-7$ 、年間の患者数は 676、128、14.6 人、年間の DALY は 1760、1600、72.9 であった。

この推定は我が国の LM 患者数 200 人という推定値と比べると過剰と考えられることから消費者の保存中の増殖を最小 1、モード 2、最大 $3 \log_{10}$ cfu/g の増殖という三角分布を適用してみたところ、年間の患者数は 2.66 人、DALY は 11.7、一回の喫食機会当たりの感染リスクは $9.13E-8$ と著しく減少した。65 歳以上、周産期、それ以外の 3 つの集団ごとの値も減少し、平均の発症確率はそれぞれの集団で、順に $7.41E-8$ 、 $3.95E-7$ 、 $4.71E-10$ 、年間の患者数は 676、128、14.6 人だったのがそれぞれ 2.21、0.41、0.0456、年間の DALY は 1760、1600、72.9 から 5.74、5.70、0.228 に激減した。現在の日本の患者数から推察すると、この増殖率を用いた後者の推計のほうが近いと考えられた。

次に同モデルを用いて生ハム中の LM について評価を行った。日本国民が全員年 1 回、輸

入の生ハムを喫食すると仮定したところ、年間の患者数は 0.097 人、DALY は 0.939、一回の喫食機会当たりの感染リスクは $9.30E-9$ と推定された。

初期汚染濃度は食品安全委員会リステリアモノサイトゲネスのリスク評価書より生ハムの LM 分離率 4.1%を、初期汚染濃度は 3 検体中 2 検体が 10 未満、1 検体が 40 であったことから、最小 0、モード 1、最大 $1.5 \log_{10}$ CFU/g のトライアングル分布を適用した。(その結果、初期平均濃度は $0.935 \log_{10}$ cfu/g となった。)包装単位は製造時、市販時とも 100 g とした。消費者の保存中の LM の増殖は文献情報によると、生ハムでも水分活性、添加物の組成等により増殖する報告としないとの報告があったことから最小 0、最大 $2 \log_{10}$ cfu/g の増殖という均一分布を適用し、その結果、最終濃度の平均は $2.26 \log_{10}$ cfu/g (汚染率は 4.1%のまま)となった。

チーズと同じ 65 歳以上、周産期、それ以外の 3 つの集団に分類し、同じ exponential dose response の r の値を用いた。平均の発症確率はそれぞれの集団で、順に $1.06E-8$ 、 $5.70E-8$ 、 $6.79E-11$ 、年間の患者数は 0.0316、0.0588、0.000658 人、年間の DALY は 0.0822、0.823、0.0329 であった。

一方、同モデルを用いて鶏肉中の *Salmonella* 属菌について評価を行った。日本国民が全員一日 1 回、輸入の鶏肉を喫食すると仮定したところ、年間の患者数は $2.0E+5$ 人、DALY は 0.0192、一回の喫食機会当たりの感染リスクは $1.50E-10$ と推定された。

初期汚染濃度は食品安全委員会のリスクプロファイルより分離率 15.1%を、初期汚染濃度は最小 1、最大 $4 \log_{10}$ CFU/g の均一分布を適用した。(その結果、初期平均濃度は $3.16 \log_{10}$ cfu/g となった。)包装単位は製造時、

市販時とも 2.5kg とした。チラーでの減少(均一分布で最小 1、最大 $2\log_{10}$ cfu/g)、喫食前の加熱の効果は JEMRA の評価書に基づき Triangular 分布(最小 1、モード 5、最大 $7\log_{10}$ cfu/g) の減少とし、その結果、最終濃度の平均は $-1.000\log_{10}$ cfu/g (汚染率は 0.0844%) となった。

Reference: Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDA/CFSAN), Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN) and Risk Sciences International (RSI). 2012. FDA-iRISK version 1.0. FDA CFSAN. College Park, Maryland. Available at <http://irisk.foodrisk.org/>.

D. 考察

食品の国際貿易の拡大により、微生物ハザードも国境を越え、世界中に移動する。それに伴い、患者発生も世界中に拡散しうる。

本年度は INFOSAN Emergency ではトルコから輸入されたタヒニセサミペーストによる米国及びニュージーランドにおけるサルモネラ症アウトブレイクと冷凍ベリーに関連したデンマーク、フィンランド、ノルウェー及びスウェーデンで発生した A 型肝炎 A (HAV) 感染症が通報され、さらにニュージーランド産の WPC で *C. botulinum* たが、これらの事例を輸入時の検査だけで、水際で食い止めることは現実には不可能であると考えられた。

微生物による食品由来健康被害を防ぎ、または侵入後に速やかに汚染食品を排除するためには、患者や原因食品からの病原体の検出だけではなく、PFGE 等の病原体の遺伝子学的な検索とそのデータベース化、さらにそれらの情報の迅速な共有、及びそれらの情報を検査担当機関がいつでも見えるようになっていることが重要である。

また、デンマーク技術大学や UCLA 等が中心に活動が盛んになっている次世代シーケ

ンスプロジェクト(ゲノムそのものを読んでタイピングを行う手法)もホールゲノムを読む価格が低下してきたことにより拡大しつつあるので、そういったネットワークとの連携も重要であると考えられる。昨年度本研究報告で報告したインド産の魚介類によるアメリカ等で発生したサルモネラ属菌によるアウトブレイクにおいては PFGE では区別できなかったが、ホールゲノムのシーケンスにより、原因株とインド由来のサルモネラの間に関連性が認められ、PFGE での分類の限界をホールゲノムシーケンスは補える可能性が示唆された。

既存の web ベースの定量的確率論的リスク評価ツールを用いてリステリア及びサルモネラのリスク評価を試みた。昨年度実施した半定量モデルより、詳細なモデルを自分で組み立てることもできるし、用量反応データも健康者とハイリスク集団ごとに変えることもできる。それに応じて、要求されるデータの量及び質が増えるので、データがある程度そろっている食品と微生物の組み合わせには、このモデルは極めて有効であると考えられたが、データがないと、多くの仮定を導入せざるをえなくなることから注意が必要であると考えられた。たとえば、ノロウイルスについては、明確な用量反応曲線のモデルが示されていないため、本モデルを適用することは難しかった。

E. 結論

トルコから輸入されたタヒニセサミペーストによるサルモネラ症アウトブレイク、冷凍ベリーに関連した A 型肝炎 (HAV) アウトブレイク、さらに健康被害は発生しなかったが極めて重篤な健康被害の原因になる *C. botulinum* 汚染が疑われた WPC を使用した乳児用調製粉乳を含む食品汚染疑い事例とも、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、サルモネラや HAV ウイルス、さ

らには *C. botulinum* の遺伝子レベルでの解析能力の向上、汚染食品を特定し、速やかに回収する能力を平常時から維持管理することが重要であると考えられた。

また、欧州の RASFF 等との情報交換を緊密にすることで、汚染食品の傾向を事前に予測することが可能になると考えられた。

一方、既存の定量的リスク評価ツールである FDA の i-risk を用いることにより、絶対的な患者発生リスクと DALYs を推定することができた。このモデルを使って、国内に侵入する恐れのある食品と微生物の組み合わせについて、データがあるものについては、リスクランキングを行い、水際対策や平常時のモニタリングの優先順位決定に役立てることができると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 豊福 肇、小林光士、下出俊樹、牛丸藤彦、小野寺 仁、小池史晃、村瀬繁樹：JA 飛騨ミートにおける SSOP 及び HACCP に基づく食品安全管理システムによる微生物制御とその微生物学的検証、日本獣医師会雑誌, 2013, 66(10), p718-24.
- 2) 豊福 肇、長谷川 専、柿沼美智留：既存リスク評価ツールを用いた食品衛生監視指導効果の評価、日本獣医師会雑誌, 2013 66(11), 816-9
- 3) Hajime TOYOFUKU : Regulatory Perspective in Translating Science into policy: Challenges in Utilizing Risk Assessment for the elaboration of Codex standards of Shellfish Safety, Molluscan Shellfish Safety, Springer, 2013,p73-88
- 4) Hajime TOYOFUKU : *Vibrio parahaemolyticus* Risk Management in Japan. , Molluscan Shellfish Safety, Springer, 2013,p129-136.

- 5) 豊福 肇：新しい食中毒、リスクの複雑化とアウトブレイクについて、生食のおいしさとリスク。一色賢司監修、NTS, 2013 , p395 - 410
- 6) 藤井建夫、豊福 肇：魚醤油の品質管理と Codex 規格. 月刊フードケミカル 2014 年 2 月、p52 - 58
- 7) 豊福 肇：世界に通用する衛生管理手法とは. 月刊フードケミカル 2013 年 11 月、p24 - 29.
- 8) 豊福 肇、小坂 健：微生物リスク評価の経緯 . 食品衛生研究. 63(8), 2013. P13-22.
- 9) 小川麻子、加地祥文、豊福 肇：Codex Information. 第 21 回食品残留動物用医薬品部会. 食品衛生研究. 64(2), 2014. P29-44.

2. 学会発表

- 1) 豊福 肇、小林光士、下出俊樹、牛丸藤彦、小野寺 仁、小池史晃、住奥寿久、石橋俊之、小嶋高則、鷺見隆治、村瀬繁樹、安江智雄、小林幹子、島村真弓：JA 飛騨ミートにおける HACCP に基づく食品安全管理システムによる微生物制御とその微生物学的検証. 第 105 回日本食品衛生学会学術講演会、2013. 5 月、東京
- 2) 豊福 肇：世界に通用する衛生管理手法とは ifia Japan 2013. 第 12 回食の安全・科学フォーラム、2013 年 5 月、東京
- 3) 豊福 肇、小林光士、下出俊樹、牛丸藤彦、小野寺 仁：JA 飛騨ミートのデータを用いた Moving Window によるサンプリング計画の評価 . 第 34 回日本食品微生物学会学術総会、2013 年 10 月、東京
- 4) 小林幹子、坂下幸久、村瀬繁樹、小林光士、牛丸藤彦、下出俊樹、小野寺 仁、小池史晃、島村真弓、豊福 肇：JA 飛騨ミートにおける自主検査の従業員教育への活用 . 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会、2013. 11 月、沖縄

- 5) 豊福 肇： *Listeria monocytogenes* の微生物規格に関する考察．第 106 回日本食品衛生学会学術講演会、2013. 11 月、沖縄

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

研究分担者 近藤一成 国立医薬品食品衛生研究所・代謝生化学部

研究要旨

きのこによる食中毒は、形態学的に判別が難しい食用きのこの誤食が主な原因である。日本国内で中毒被害が多いツキヨタケ、クサウラベニタケ、カキシメジ、ニガクリタケのうち、特に近縁種が多く、かつ形態学的な判別が困難なクサウラベニタケ、およびツキヨタケについて、間違えやすい食用きのこ合わせて国内より広くサンプリングして分子系統樹解析を行った。その結果、1種と考えられていたクサウラベニタケは3種存在することが判明した。この結果を用いて、クサウラベニタケについて、調理加工後サンプルでも適用可能な *Msi*I を用いる新たな食毒判別用迅速 PCR-RFLP 法を確立した。ツキヨタケについては、生のきのこを対象とした PCR-RFLP 法を構築し、各種市販きのこ中でも判別できることを示した。クサウラベニタケおよびツキヨタケについて、確定法となるリアルタイム PCR 法を開発し、これまで調理後の原型をとどめていないために形態判別が不可能であったサンプルに対しても、確定検査が可能となった。本法により、きのこ中毒被害事例数の半分を占める、原因きのこ不明の事例の特定につながると考えられる。

研究協力者

中村公亮、野口秋雄、坂田こずえ、小林友子、福田のぞみ（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

日本国内では植物性自然毒(高等植物ときのこ)による食中毒被害が毎年発生する。その中で、きのこによる食中毒被害は、多くの野生きのこが発生する9月から11月に集中している。夏の終わりから秋にかけて、野生のきのこの発生時期に重なり、多くの人がかきのこ採取を行い、多くの場合には採取したきのこの鑑定を行わずにそのまま自宅に持ち帰るために、摂取後中毒に至る場合が多い。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。一方で、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である。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、さらには、摂取後吐瀉物の場合に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、もう一つは迅速にかつ科学的なエビデンスに基づく検査方法の確立と整備であると考えられる。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* と現在考えられている) 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、ヨーロッパにおける *Entoloma rhodopolium* として公開されているものと同様かどうかを含めて、現在まで詳しく検討されたことはなかった。そこで、本研究班においてこれまでに、クサウラベニタケとその近縁種について全国からサンプルを収集して遺伝子配列解析を行い、系統樹解析を行ってきた。また、その結果を用いて生のきのこの判別に有効な PCR-RFLP 法を昨年作成したが、本年度は、加熱調理や吐瀉物を想定し、加熱および人口胃液処理したサンプルでも適用可能な PCR-RFLP 法を考案した。さらに、ツキヨタケについても同様の検討を行い、PCR-RFLP 法を確立するとともにリアルタイム PCR 法についても検討を行った。

B. 研究方法

クサウラベニタケ

クサウラベニタケの ITS 領域解析の実験

(1) 試料

昨年度に引き続き、今年度はさらに栃木、福島産のウラベニホテイシメジを収集し、さらに標本試料を用いた。

(2) DNA 抽出

試料は蒸留水でよく洗浄し、1.5mL tube にて 0.3~0.7g のサンプルを採取し、マイクロ乳棒を用いてホモジナイズし、65 °C の AP1 buffer 600 μ L と RNaseA 4 μ L を加え、混合した。次に、AP1 buffer 195 μ L を加え、ボルテックスでよく混合した後、氷上で 10 分間静

置した。次に、室温で 14,000 \times g、10 分間遠心し、その上清を QIAshredder Mini spin column に負荷し、室温で 14,000 \times g、1 分間遠心し得られた溶出液を 2mL tube に移した。溶出液は 1.5 倍量の AP3/E buffer を加え混合し、650 μ L ずつ数回に分けて DNeasy Mini spin column に負荷した。その際、10,000 \times g、1 分間遠心し、溶出液は廃棄した。次に、AW buffer 500 μ L を DNeasy Mini spin column に負荷後、10,000 \times g、1 分間遠心し溶出液は廃棄した。これを 3 回繰り返し、最後に、10,000 \times g、15 分間遠心し、余分なアルコールを除去した。DNeasy Mini spin column は新しい 1.5mL tube に移し、65 °C に加温しておいた AE buffer 40 μ L をシリカメンブレンに負荷し、5 分静置後、10,000 \times g、1 分間遠心し溶出液を回収した。再度、同様の操作を行い、合計 80 μ L の DNA 抽出液を得た。

(3) PCR 条件

使用したプライマー対

rDNA ITS 領域 (ITS) 解析用として

ITS1F:5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'

ITS4B:5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG-3'

を用いた。

PCR 用反応液は 50 μ L /well として調製する。その組成は以下のとおりである。10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L、2.5mM dNTP 4 μ L、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 μ mol/L) 各 0.5 μ L、TaKaRa Ex Taq HS 0.25 μ L、蒸留水 34.75 μ L を混合調製し、DNA 試料液 5 μ L (10 ng/ μ L) を添加した。また、反応条件は、95

で5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95 30秒、55 30秒、72 1分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行った。その後、72 5分伸長反応、4 保存を行った。PCR産物は1%アガロースゲル(エチジウムブロマイド溶液 0.1 µg/mL)で電気泳動後、目的のバンドである約1 kb付近をUV下で検出した。

(4) シークエンス解析および系統樹作成

PCR産物は、アガロースゲルで電気泳動後、目的のバンドをゲルから切り出し、DNAを精製した。それをシークエンス解析(ファスマック)に用いた。シークエンス解析で得た塩基配列はGENETYX ver.12およびCLC Genomic workbench ver.6.5を使用してMUSCLEアライメント解析および最尤法(Maximum likelihood)を用いて分子系統樹作成を行った。

クサウラベニタケのPCR-RFLP法の実験

(1) PCR-RFLP法のための制限酵素の選択

国内から広く集めた毒きのこであるクサウラベニタケと食用ウラベニホテイシメジのシークエンス解析の結果をもとに、食毒判別が可能な制限酵素部位と種類を、*In silico*で検討を行った。検討には、*In silico* simulation of molecular biology experiments (<http://insilico.ehu.es>)および遺伝子解析ソフトGENETYXを用いて行った。

加熱調理あるいは吐瀉物からでも適用可能にするために、増幅断片長を200 bpとする領域を標的としたPCR反応用(short-PCR)プライマーを設計した。

(2) PCR条件

PCR条件は生のきのこ対象としたRFLP法と同一である。

Short PCRプライマーの配列を示す。

[5'-Primer] Short-MsII-PCR Fw:

5'- GCTCTTCTTAAATGCATTAGC -3'

[3'-Primer] Short-MsII-PCR Rev:

5'- TCGCTTCGTCAACCTG -3'

加熱調理(30-60分)、人口胃液処理(30分)したきのこを100 mg測り取り、よく洗浄する。これにPrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400 µLを加え、100 、10分間処理し、13,000 × g、2分間遠心して上清を取る。これを、PCR反応の鋳型とする。次のPCR条件で行い、制限酵素処理を行った。

95 , 3 min

95 , 30 sec

55 , 30 sec

72 , 1 min

} 45 サイクル

(3) PCR-RFLP条件

加熱調理、人口胃液処理したきのこ試料の場合は、食毒判別のみの特化するために、短い増幅断片長(200 bp)のPCR産物に対して、MsII(37 、30 min)で処理した。酵素反応後、2%アガロースゲルを用いて泳動して、MsII処理での切断の有無の違いにより判別した。

(4) 市販流通きのこ中での混入試料への適用

作成した検査法の適用範囲を広げるために、市販のきのこ(ブナシメジ、マッシュルーム、ナメコ、エノキ、エリンギ、マイタケ、シイタケ)中に含まれた場合でも、毒のクサウラベニ

タケが検出可能かどうかを検討した。疑似試料として、市販きのこに一部クサウラベニタケを含むものを調製し、DNA 抽出、PCR 反応、*MspI* を用いた PCR-RFLP を行った。

(5) リアルタイム PCR 法の検討

PCR-RFLP 法で得られた結果を、最終的に確認するためのリアルタイム PCR 法について検討した。

ツキヨタケ

ツキヨタケの ITS 領域解析の実験

(1) 試料

ツキヨタケおよびヒラタケ、ムキタケは、鳥取、島根、山形、北海道などから収集したものをを用いた。さらに標本試料を用いた。

(2) DNA 抽出条件および (3) PCR 条件

クサウラベニタケと同じ条件およびプライマーを用いて行った。

(4) シークエンス解析および系統樹作成

PCR 産物は、アガロースゲルで電気泳動後、目的のバンドをゲルから切り出し、DNA を精製した。それをシークエンス解析 (ファスマック) に用いた。シークエンス解析で得た塩基配列は GENETYX ver.12 を使用して ClustalW2 アライメント解析および NJ 法を用いて分子系統樹作成を行った。

ツキヨタケの PCR-RFLP 法の実験

(1) PCR-RFLP 法のための制限酵素の選択

アライメント解析結果をもとに、ツキヨタケに対する PCR-RFLP 法に用いる制限酵素を、

Sau96I、*Bpu10I*、*SfcI* および *DrdI/HincII* に設定した。

(2) 市販流通きのこ中での混入試料への適用

作成した検査法の適用範囲を広げるために、市販きのこ (ブナシメジ、マッシュルーム、ナメコ、エノキ、エリンギ、マイタケ、シイタケ) 中に含まれた場合でも、毒のツキヨタケが検出可能かどうかを検討するために、ITS 領域の PCR 産物 (800 bp) および各制限酵素で切断した時の泳動パターンを比較した。

(3) リアルタイム PCR 法の検討

PCR-RFLP 法で得られた結果を、最終的に確認するためのリアルタイム PCR 法について検討した。

C. 研究結果

1. 分子系統解析

クサウラベニタケについて、昨年までの結果から、遺伝的バリエーションがあるクサウラベニタケおよび近縁種の解析に、さらなる食用のウラベニホテイシメジのサンプル数が必要と考えられたため、栃木県および福島県からサンプルを収集し、これまでのデータと合わせて再解析した。また、outgroup として、*Clitocybe dealbata*、*Collybia tuberosa*、*Rugosomyces carneus*、*Lyophyllum leucopaetum* を用いた。その結果、食用であるウラベニホテイシメジは他からよく分離した系統樹が得られ、データベース上の *Entoloma sarcopum_Ec3* (GenBank: AB301603.1) に一致した。一方、形態学的にクサウラベニタケと考えられたきのこは、分子系統樹解析結果から *Entoloma rhodopolium* clade I~III の 3 つのグループに分類された (Fig.1)。このうち、*Entoloma*

rhodopolium clade II が日本でクサウラベニタケと考えられてきたもので、データベース上の *Entoloma rhodopolium*_Er3 (GenBank: AB301602.1) に一致した。しかしながら、この種のきのこがよく分類研究されているヨーロッパでは、*Entoloma rhodopolium* と呼ばれているものは、今回解析した *Entoloma rhodopolium* clade III と考えられており、したがって、clade I および II は分類上では新種である可能性も示唆された。

一方、ツキヨタケとこれに似た間違えやすい食用きのこであるシイタケ、ムキタケおよびヒラタケは、お互いに属が異なることから分子系統樹解析では明確に分離され、クサウラベニタケのように近縁関係にあるきのこは少ない。また、遺伝的なバリエーションもほとんど見られなかった (Fig.2)

2. PCR-RFLP 法

クサウラベニタケについて、本研究班で昨年度の研究成果として、生きのこに対して適用可能な PCR-RFLP 法を報告した。しかしながら、喫食前の中毒防止とともに、摂取した後の原因きのこ特定にも使える検査法の整備が必要であることから、加熱調理などの操作後で DNA 断片化が一部進んでいる試料に適用可能な 200 bp を標的とする Short-PCR-RFLP 法を検討した (Fig.3)。その結果、標的とした 200 bp の断片は 60 分の加熱および人工胃液処理 (トリプシン含まず) においてもバンドが消失せず、その後の *MsII* 制限酵素処理で、食用のウラベニホテイシメジと確実に区別できた (Fig.4)。

一方、ツキヨタケと他の食用きのこである、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する PCR-RFLP 法では、*Bpu10I* および *SfiI* 制限

酵素処理した時に、ツキヨタケのみ切断されることから、他と明確に区別可能であることが判った。一方、*Sau96I* では、シイタケ以外のすべてのきのこが切断されるが、その泳動パターンはツキヨタケとそれ以外では異なることから、3 つの制限酵素の複数をを用いることで判別同定可能である (Fig.5)

市販の多様な食用きのこ存在下でも、その中に一部毒のクサウラベニタケが混入したような試料でも検出可能 (>20 mg の試料)あり、原型をとどめていない多種のきのこ中に混入しても検出できることが示唆された (Fig.6)。ツキヨタケにおいても、市販の多様なきのこ制限酵素処理後の泳動パターンは特徴的で、特に *Bpu10I* 処理ではツキヨタケが切断され他と明確に区別できた (Fig.7)

さらに、毒性を持つツキヨタケのみ制限酵素で切断しないパターンでも検討するために、*DrdI* および *HincII* で処理したところ、食用のシイタケ、ヒラタケ、ムキタケのみ切断されることが判った (Fig.8)。これにより、制限酵素が万が一機能しなかった時に、毒のツキヨタケを食用と誤判定する危険性を除くことができる。

3. リアルタイム PCR 法

PCR-RFLP 法は、PCR 反応後にそれぞれに特異的な制限酵素で処理して、電気泳動した時の泳動パターンの違いで判別するもので、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あり、検査の裾野を拡大する意味でも重要である。一方で、これらの結果を確認するための高感度な確定法としてリアルタイム PCR を用いた方法があれば最終確

認が可能となり結果の信頼性がさらに向上する。

クサウラベニタケについては、他に2つの近縁種が毒でありこの3系統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。その結果、プローブをうまく設計することで、それぞれを特異的に検出できることが明らかになった (Fig.8)。一方、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、食用のシイタケ、ムキタケ、ヒラタケには交差反応しない、ツキヨタケ時的検出が可能であることが明らかになった (Fig.9)。

D. 考察

植物性自然毒の中でも、きのこ毒について、原因物質が特定されているものは非常に少ない。また、ツキヨタケやカキシメジのように原因物質が明らかになっているものも存在するが、LC/MSなどで分析しようと考えても標準品が存在しないという重要な問題に直面する。さらに、野生きのこの場合には、その成分含量は非常に大きく変動し(数十から数百倍)、ある毒きのこを検出する場合、ある地域からの試料は検出可能であっても、別の地域からの試料は検出下限以下になることも想定される。その成分が明らかな唯一の原因物質である場合には、測定した試料が検出下限以下であれば問題はない。しかしながら、きのこ毒の原因物質には類縁体が多く存在し、かつ毒性を示す成分も複数あることが多いため、ある特定の化学的成分の分析のみに依存すると、リスク管理上問題となることが考えられる。

そこで、本研究班では食中毒被害事例が多いきのこについて、採取時期や採取地域、測定までの保存時間と状態により、化学成分(低分子有機化合物やペプチド、タンパク質)のように変動しない検査対象として、きのこ自身が持つ遺伝子塩基配列を用いた信頼性の高い、かつ迅速で簡便な試験検査法を確立し、これまで中毒被害防止と中毒発生時の原因きのこ特定のための、健康危機管理に必要な必要な試験法を整備することが極めて重要である。

今年度開発したクサウラベニタケとその近縁種、およびツキヨタケに対する迅速簡便な同定法とより高感度で確定検査としても重要な特異性の高い定性リアルタイムPCR法を開発することができた。調理加熱後の試料でも適用できることから、これを今後は全国の検査可能なところに普及していくことが必要であると考えられた。

最後に Table I には、過去13年間のきのこによる食中毒事例をまとめたものを示した。

E. 結論

1. 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。これら毒性を持つ3種の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。さらに、確定法としてMultiplex定性リアルタイムPCR法を開発した。
2. ツキヨタケについて、誤食原因であるシイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する簡便迅速な検査法としてPCR-RFLP法を他の多様な市販きのこ存在下でも適用可能な方法として確立した。さらに、確定法としてマル

チプレックス定性リアルタイム PCR 法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 坂田こずえ, 小櫃冴未, 中村公亮, 小林友子, 野口秋雄, 福田のぞみ, 最上(西巻)知子, 手島玲子, 近藤一成: クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法(第 2 報): 加熱、消化処理サンプルへの適用

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

2. 菅野陽平, 坂田こずえ, 野口秋雄, 中村公亮, 小林友子, 福田のぞみ, 佐藤正幸, 最上(西巻)知子, 手島玲子, 長澤栄史, 近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種の PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

3. 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 坂田こずえ, 小林友子, 福田のぞみ, 手島玲子, 最上(西巻)知子: 毒きのこドラフトゲノムシーケンス

第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

本研究で得られたクサウラベニタケとその近縁種の分子系統樹解析および PCR-RFLP 法に関して、昨年度出願したものの適用範囲拡大のために再出願した。

出願番号: 特願 2014-006142

出願人: 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称: キノコの同定方法、及び、同定

キット

出願日: 平成 26 年 1 月 16 日

発明者: 近藤一成、小櫃冴未、坂田こずえ

弊所整理番号: 26H006

さらにツキヨタケとシイタケ、ムキタケ、ヒラタケに対する PCR-RFLP 法およびリアルタイム PCR 法に関して出願した。

出願番号: 特願 2014-103555

出願人: 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称: きのこの同定方法および同定キット

出願日: 平成 26 年 5 月 19 日

発明者: 近藤一成

弊所整理番号: 26H105

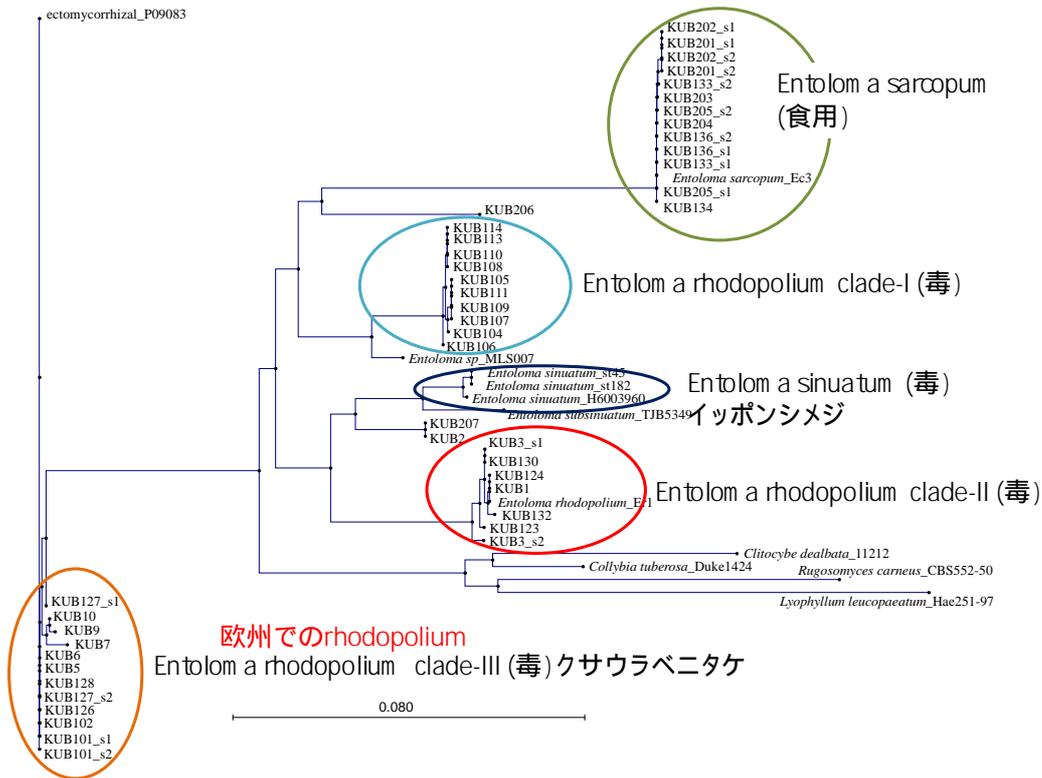


Fig.1. クサウラベニタケとその近縁種の分類

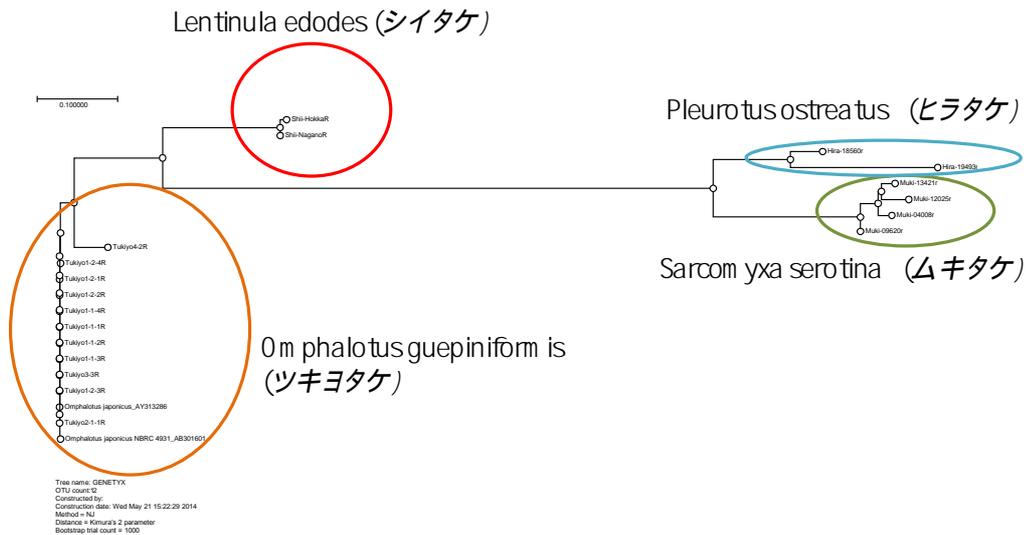


Fig.2. ツキヨタケとその形態学的に似ているきのこの分類

Short-PCR 法的设计

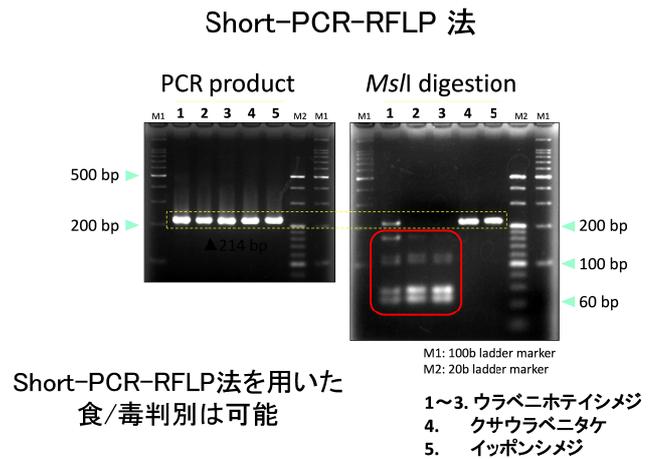
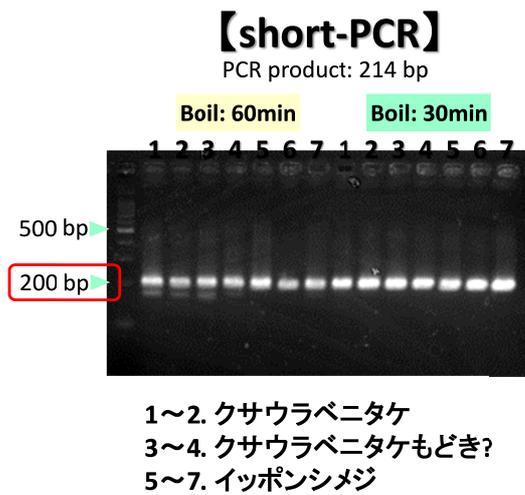
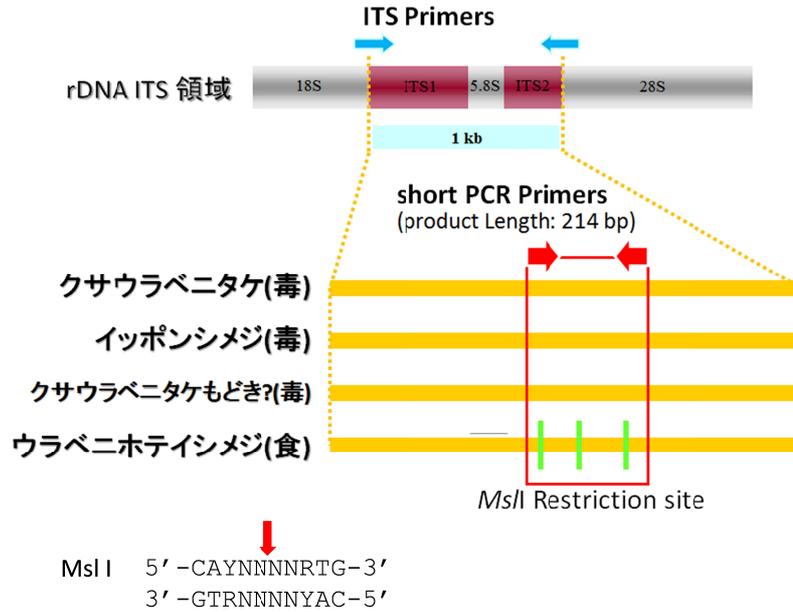
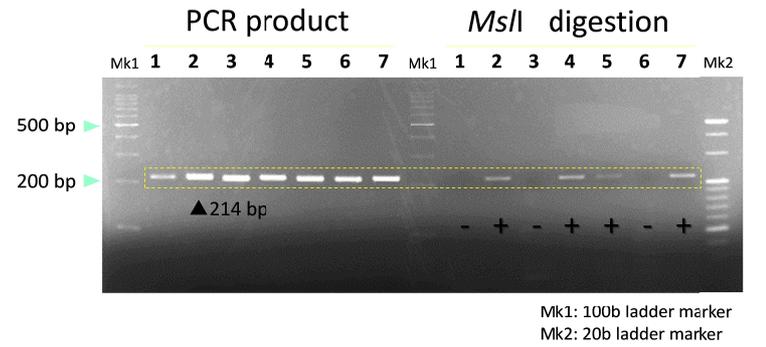


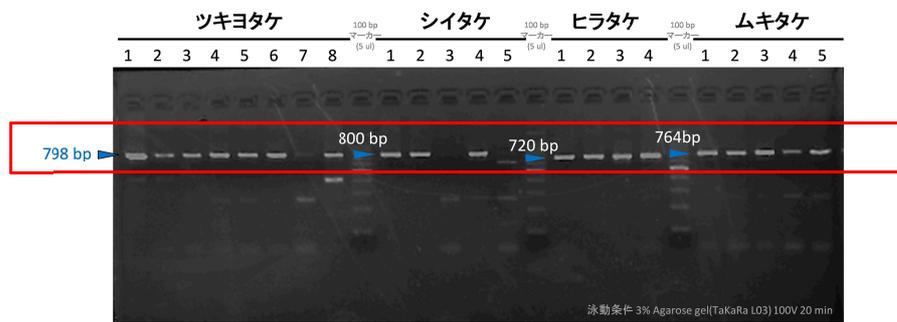
Fig.4. Short-PCR-RFLP 法を用いた結果

Short-PCR-RFLP 法の混合きのこ試料への適用

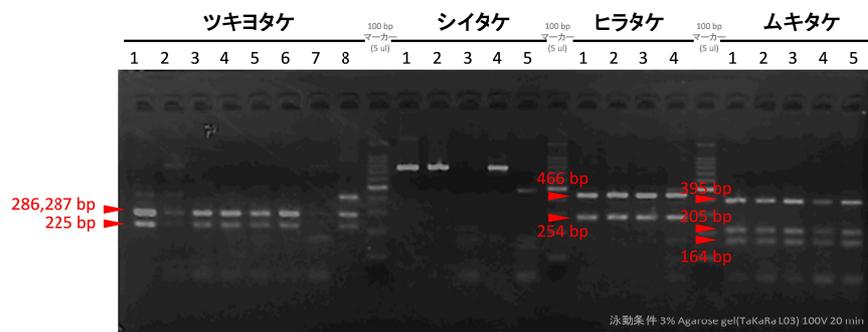


| # | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-------|-------|-------|-------|
| Sample | Control-1 | Control-2 | Control-3 | Mix-1 | Mix-2 | Mix-3 | Mix-4 |
| クサウラベニタケ の混入 | - | + | - | + | + | - | + |

Fig.5 市販きのこを用いた疑似試料中のクサウラベニタケの検出



FastDigest **Sau96I** digestion



Restriction site

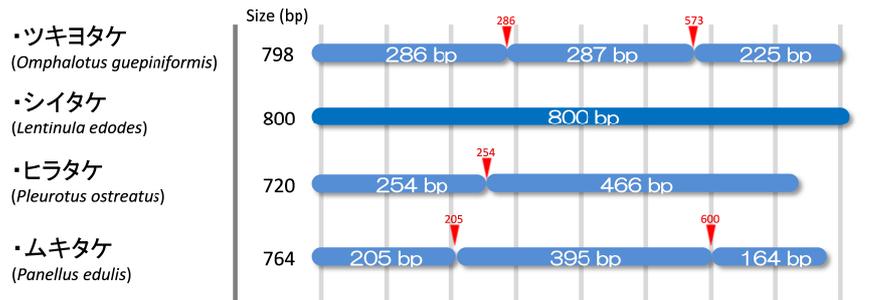
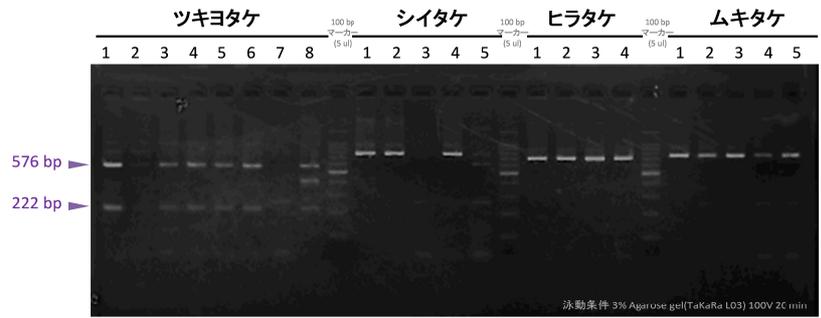


Fig.6 ツキヨタケ、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケの ITS1-5.8S-ITS2 領域の増幅(上)と PCR-RFLP 法 *Sau96I* 切断パターン

FastDigest **Bpu10I** digestion



Bpu10I

Restriction site

5' -CCTNAGC-3'

5' -CCTAAGC-3' ・ツキヨタケ
(*Omphalotus guepiniformis*)

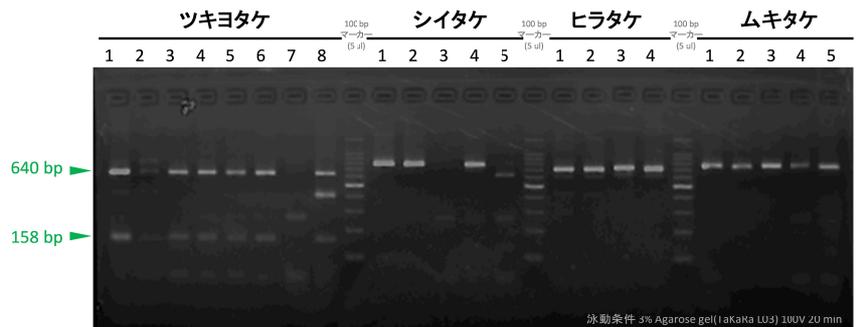
5' -TCTAACC-3' ・シイタケ
(*Lentinula edodes*)

5' -TCCCAGC-3' ・ヒラタケ
(*Pleurotus ostreatus*)

5' -CCGCAAC-3' ・ムキタケ
(*Panellus edulis*)



FastDigest **Sfcl** digestion



Sfcl

Restriction site

5' -CTRYAG-3'

5' -CTGTAG-3' ・ツキヨタケ
(*Omphalotus guepiniformis*)

5' -TTGTAG-3' ・シイタケ
(*Lentinula edodes*)

5' -GAGTGA-3' ・ヒラタケ
(*Pleurotus ostreatus*)

5' -GGGTGA-3' ・ムキタケ
(*Panellus edulis*)

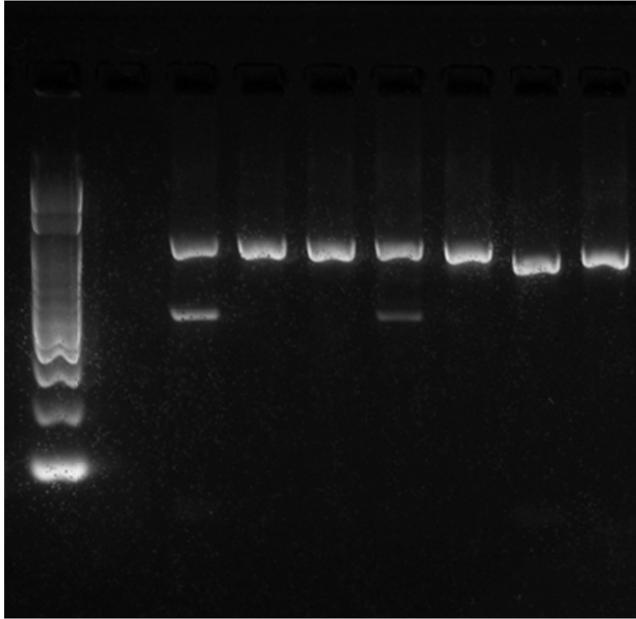


Fig.7 ツキヨタケ、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケの PCR-RFLP 法 *Bpu10I* (上) および *Sfcl* (下) 切断パターン

No digestion

100bp
マーカー
(Wako)

ツキヨタケ
ツキヨタケ
ツキヨタケ
ツキヨタケ
シイタケ
ヒラタケ
ムキタケ



DrdI(GACNNNN|NNGTC) & *HincII*(GTY|CAC)

100bp
マーカー
(Wako)

ツキヨタケ
ツキヨタケ
ツキヨタケ
ツキヨタケ
シイタケ
ヒラタケ
ムキタケ

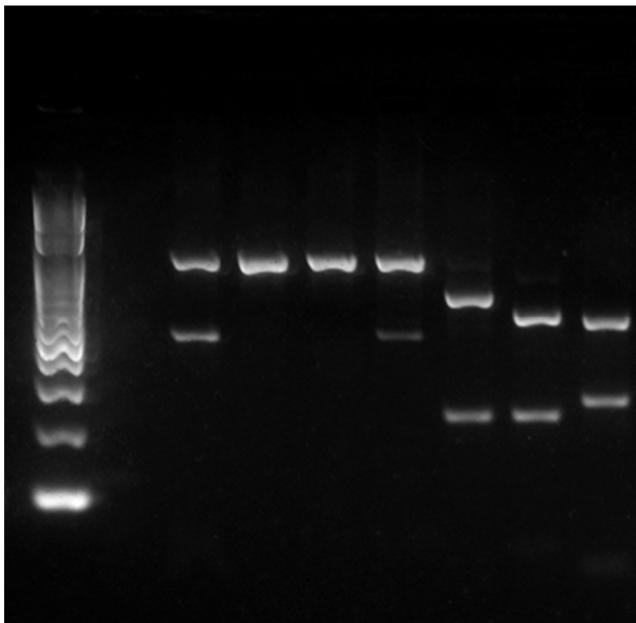


Fig.8 ツキヨタケ、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケの PCR-RFLP 法未処理 (上) および *DrdI* & *HincII* (下) 切断パターン

市販食用きのことのPCR-RFLP法泳動パターン比較

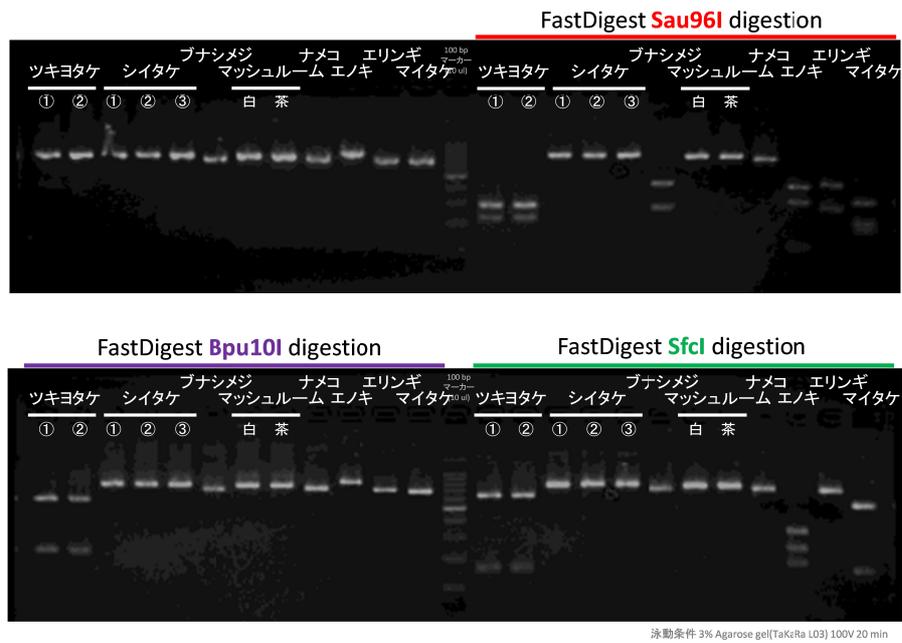
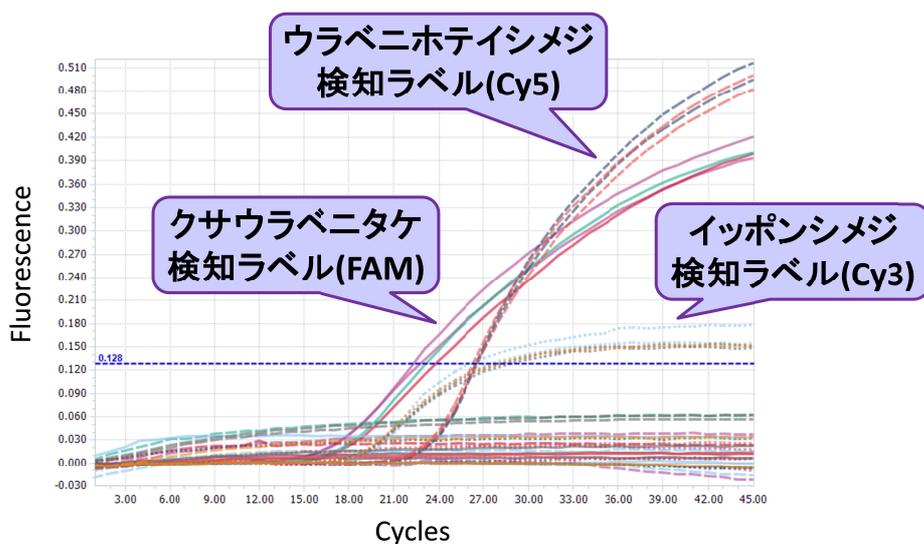


Fig.9 ツキヨタケ、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケおよびのPCR-RFLP法 *Bpu10I* (上) および *SfiI* (下) 切断パターン

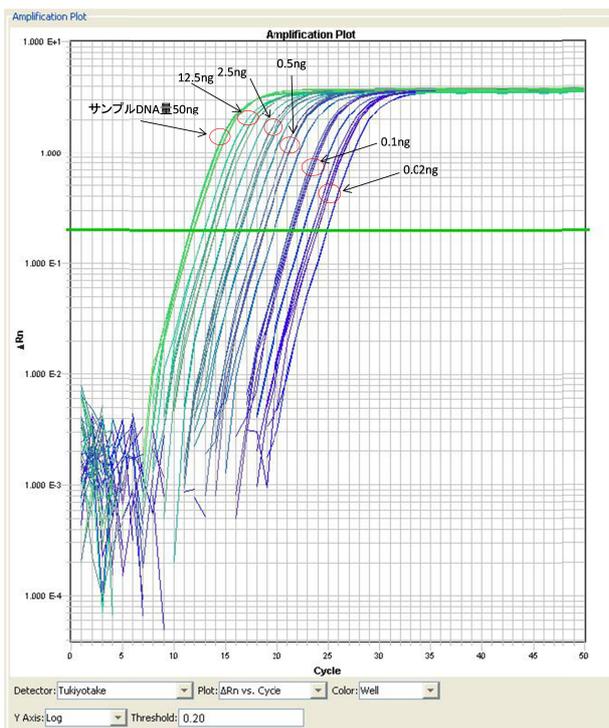
Multiplex Real-time PCRによる確認試験法



機器: Roche LightCycler® 96

Fig.10 クサウラベニタケとその近縁種の Multiplex リアルタイム PCR を用いた同定

ツキヨタケ



シイタケ、ムキタケ、ヒラタケ

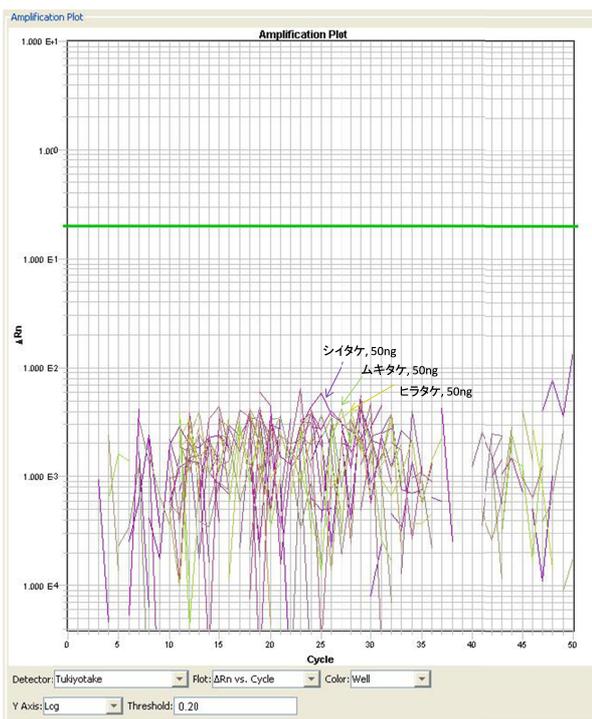


Fig.11 ツキヨタケ特異的定性リアルタイム PCR を用いた同定

| /年度 | きのこ/キノコ | | | | クサウラベニタケ | | | | ツキヨタケ | | | | 以下のきのこ | | | |
|------|---------|-------|-----|-----|----------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 |
| 2012 | 20 | 60 | 54 | 0 | 7 | 21 | 18 | 0 | 23 | 85 | 74 | 0 | 3 | 6 | 6 | 0 |
| 2011 | 10 | 26 | 20 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 13 | 46 | 49 | 0 | 11 | 22 | 20 | 0 |
| 2010 | 38 | 112 | 105 | 0 | 19 | 102 | 66 | 0 | 18 | 64 | 62 | 0 | 16 | 31 | 29 | 0 |
| 2009 | 12 | 40 | 39 | 0 | 2 | 13 | 11 | 0 | 19 | 67 | 61 | 0 | 7 | 15 | 15 | 0 |
| 2008 | 13 | 39 | 35 | 0 | 7 | 29 | 26 | 0 | 19 | 78 | 70 | 0 | 22 | 66 | 46 | 0 |
| 2007 | 16 | 61 | 51 | 2 | 8 | 31 | 30 | 0 | 15 | 63 | 59 | 0 | 15 | 41 | 37 | 0 |
| 2006 | 11 | 50 | 43 | 0 | 6 | 15 | 15 | 0 | 17 | 65 | 61 | 0 | 9 | 24 | 22 | 2 |
| 2005 | 13 | 34 | 31 | 0 | 5 | 17 | 13 | 0 | 15 | 70 | 63 | 0 | 9 | 25 | 22 | 3 |
| 2004 | 28 | 125 | 99 | 1 | 16 | 42 | 41 | 0 | 16 | 53 | 52 | 0 | 20 | 58 | 44 | 0 |
| 2003 | 14 | 53 | 49 | 1 | 4 | 71 | 48 | 0 | 11 | 39 | 36 | 0 | 19 | 59 | 45 | 0 |
| 2002 | 17 | 78 | 77 | 0 | 8 | 25 | 24 | 0 | 19 | 110 | 91 | 0 | 12 | 36 | 32 | 0 |
| 2001 | 7 | 30 | 23 | 1 | 2 | 8 | 8 | 0 | 3 | 45 | 45 | 0 | 4 | 9 | 9 | 0 |
| 2000 | 28 | 110 | 101 | 0 | 3 | 10 | 8 | 0 | 13 | 61 | 67 | 0 | 10 | 34 | 29 | 1 |

| /年度 | イボシゲタケ | | | | フングタケ | | | | ドクササコ | | | | ドクツルタケ | | | | ベニシゲタケ | | | |
|------|--------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 |
| 2012 | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | | | | |
| 2011 | 3 | 4 | 3 | 0 | 2 | 7 | 7 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 2010 | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 3 | 2 | 0 | | | | | | | | |
| 2009 | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 2008 | 2 | 3 | 3 | 0 | 3 | 7 | 6 | 0 | 3 | 12 | 4 | 0 | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 2007 | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 2006 | | | | | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 4 | 3 | 0 | | | | | | | | |
| 2005 | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 | 2 | 5 | 3 | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | | | | |
| 2004 | | | | | 5 | 9 | 9 | 0 | 3 | 9 | 7 | 0 | | | | | | | | |
| 2003 | | | | | 3 | 4 | 4 | 0 | 4 | 17 | 7 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 2002 | | | | | 1 | 2 | 1 | 0 | 4 | 8 | 6 | 0 | | | | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | | | | | 1 | 3 | 2 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 4 | 4 | 0 | | | | |

| /年度 | タマゴタケモドキ | | | | タマゴテングタケモドキ | | | | タマゴタケ | | | | シロタマゴテングタケ | | | | ヒカゲシビレタケ | | | | |
|------|----------|-------|-----|-----|-------------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|------------|-------|-----|-----|----------|-------|-----|-----|--|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2010 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 2009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2008 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2007 | | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | |
| 2006 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | 1 | 5 | 5 | 0 | |
| 2005 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | |
| 2004 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | |
| 2003 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 4 | 4 | 0 | |
| 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | |

| /年度 | クロハツモドキ | | | | ニセクロハツ | | | | ドクヤマドリ | | | | カキシメジ | | | | ニガリタケ | | | | |
|------|---------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|--|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | 1 | 4 | 4 | 0 | | | | | |
| 2010 | | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | |
| 2009 | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | |
| 2008 | | | | | | | | | | | | | 1 | 4 | 3 | 0 | | | | | |
| 2007 | 1 | 6 | 6 | 0 | | | | | 1 | 5 | 5 | 0 | | | | | | | | | |
| 2006 | | | | | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | 1 | 5 | 5 | 0 | | | | | |
| 2005 | | | | | 1 | 2 | 2 | 2 | | | | | 2 | 8 | 7 | 0 | | | | | |
| 2004 | | | | | | | | | 1 | 16 | 8 | 0 | 2 | 7 | 7 | 0 | | | | | |
| 2003 | | | | | | | | | 2 | 5 | 4 | 0 | 1 | 7 | 4 | 0 | | | | | |
| 2002 | | | | | | | | | 1 | 6 | 5 | 0 | 4 | 27 | 17 | 0 | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | 2 | 6 | 6 | 0 | | | | | |
| 2000 | | | | | | | | | | | | | 1 | 10 | 8 | 0 | 1 | 3 | 3 | 0 | |

| /年度 | ハイロシメジ | | | | イッポンシメジ | | | | ヒメアジロガサ | | | | ニセショウロ | | | | ヒメカタショウロ | | | | |
|------|--------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|----------|-------|-----|-----|--|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2010 | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| 2009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2008 | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 1 | 0 | | | | | |
| 2007 | 2 | 5 | 5 | 0 | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | |
| 2006 | | | | | | | | | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | | | | | |
| 2005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2004 | | | | | 1 | 5 | 4 | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| 2003 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2002 | 1 | 2 | 2 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | | | | | 1 | 4 | 4 | 0 | | | | | | | | | | | | | |

Table I 過去 13 年間の食中毒きのこ事例のまとめ (continued)

| /年度 | ネズミシメジ | | | | カエンタケ | | | | オオキヌハダヤマタケ | | | | オオシロカサカサタケ | | | | オオウライタケ | | | |
|------|--------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|------------|-------|-----|-----|------------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | |
| 2010 | | | | | | | | | | | | | 2 | 3 | 3 | 0 | | | | |
| 2009 | | | | | | | | | | | | | 3 | 5 | 5 | 0 | | | | |
| 2008 | | | | | | | | | | | | | 3 | 7 | 7 | 0 | | | | |
| 2007 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2006 | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 2005 | | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 | | | | | |
| 2004 | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | |
| 2003 | 2 | 10 | 10 | 0 | | | | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | 2 | 3 | 3 | 0 | | | | | |
| 2000 | | | | | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 2 | 0 | | | | | | | | |

| /年度 | オシロイシメジ | | | | キツチシギタケ | | | | ツチシギタケ | | | | オオシビレタケ | | | | コクサウラベニタケ | | | |
|------|---------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|-----------|-------|-----|-----|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2010 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2009 | | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 | | | | | |
| 2008 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2007 | | | | | | | | | | | | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 2006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2003 | | | | | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 2002 | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| /年度 | ウスキゲンタケ | | | | カオリツムタケ | | | | カブラアセタケ | | | | ヨカブイヌシメジ | | | | コウタケ | | | |
|------|---------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|---------|-------|-----|-----|----------|-------|-----|-----|------|-------|-----|-----|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 2 | 0 | | | | |
| 2010 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 |
| 2009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2008 | | | | | 1 | 5 | 4 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 2007 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2006 | | | | | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 2005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| /年度 | コテンダケモドキ | | | | コレラタケ | | | | カヤタケ属 | | | | シビレタケ属 | | | | モリ/カレバタケ属 | | | |
|------|----------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|--------|-------|-----|-----|-----------|-------|-----|-----|
| | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 | 発生件数 | 摂食者総数 | 患者数 | 死者数 |
| 2012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2011 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2010 | 1 | 3 | 3 | 0 | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | | | | | 1 | 5 | 4 | 0 |
| 2009 | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 2008 | | | | | | | | | 1 | 3 | 3 | 0 | | | | | | | | |
| 2007 | | | | | | | | | 1 | 5 | 5 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | | | | |
| 2006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2004 | | | | | | | | | 1 | 3 | 1 | 0 | | | | | | | | |
| 2003 | | | | | | | | | | | | | 1 | 6 | 6 | 0 | | | | |
| 2002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Table I 過去 13 年間の食中毒きのこ事例のまとめ

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」
分担研究報告書

植物毒の毒性評価と毒成分分析

分担研究者 紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所
研究協力者 佐竹元吉 お茶の水女子大学生活環境教育研究センター
研究協力者 篠崎淳一 昭和薬科大学天然物化学研究室

研究要旨

有毒植物の誤食による食中毒では、原因植物の迅速かつ正確な同定が求められる。しかし、通常の聞き取り調査や化学分析では、しばしば時間がかかりすぎることが問題となっている。そこで、PCR-RFLP法を利用した遺伝子鑑別による迅速・簡便な有毒植物同定法を開発し、その分析条件を確立した。本法では、特に高価な機器を必要とせず、簡便な操作および短時間で、容易に植物種を同定できる。また、調理済みの試料にも適用可能である。

A. 研究目的

有毒植物による食中毒が発生した場合、中毒原因植物の迅速かつ正確な同定は、初期対応・治療のためにも必要不可欠である。通常、患者や関係者への聞き取り調査、形態学的鑑定、および化学分析による有毒成分の同定によって行われているが、しばしば結論に至るまで時間がかかりすぎることが問題となっている。そこで、PCR-RFLP法を利用した遺伝子鑑別法を用いて、有毒植物の迅速・簡便な同定法の開発を検討する。

B. 研究方法

1. 食中毒事例の多い植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

1) 試料

日本各地（東京、北海道、青森、福島）で採集あるいは購入した植物を以下の実験に供した。用いた植物は以下のとおり：

バイケイソウ（3 個体）

チョウセンアサガオ（1 個体）

トリカブト（4 個体）

スイセン（1 個体）

ギョウジャニンニク（2 個体）

ゴボウ（1 個体）

ニリンソウ（2 個体）

ニラ（1 個体）

2) DNA 抽出

試料（約 0.1g）は蒸留水でよく洗浄後、液体窒素下、乳棒・乳棒を用いてホモジナイズし、1.5 mL チューブに移した。その後の操作は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて、プロトコールに従いゲノム DNA（100 μ L, 8~90 μ g/mL）を抽出した。

3) PCR 条件

PCR 用反応液は 50 μ L として調製した。DNA 抽出液約 50 ng を鋳型として Ex Taq HS を用い標準的な条件にて PCR 反応を行っ

た(プライマーは表1参照)、PCR産物(5 µL)は1%アガロースゲル電気泳動し、UV照射下バンドを検出した。

4) 制限酵素処理

バイケイソウ・ギョウジャニンニクおよびチョウセンアサガオ・ゴボウ識別用として *Bgl*III、トリカブト・ニリンソウ識別用として *Eco*RV、スイセン・ニラ識別用として *Nco*I を用いた。制限酵素反応はPCR産物2 µLを用い全量50 µLとして行った。37°Cで5分反応後、反応液(10 µL)を3%アガロースゲル電気泳動し、UV照射下バンドを検出した。

2. 模擬調理サンプルからの direct PCR

バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンを10分間煮沸した後、約5 mm²を1.5 mLチューブに移した。そこに、Lysis Buffer (TaKaRa) 100 µLを加え、ペレットミキサーで組織を破碎し、Proteinase K 1 µLを加えた。この破碎液を65°Cで5分反応後、98°Cで2分加熱し酵素を失活させた上清をPCR反応の鋳型とした。

PCR用反応液は50 µLとして調製した。上清2.5 µLを鋳型として、Tks Gflex DNA Polymerase を用いた標準的な条件にてPCR反応を行った。PCR産物(5 µL)は1%アガロースゲル電気泳動し、UV照射下バンドを検出した。

3. *trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長の比較による食中毒原因植物の推定

平成元年～22年に日本で食中毒原因植物と同定された植物を比較した。比較領域はプライマー対 *trnH*(GUG)および *psbA*(Vijayan and Tsou, *Curr. Sci.*, vol. 99, 1530–1541, 2010)で増幅される領域を比較した。対象塩基配列はDNAデータベースを検索し、塩基配列長を確認した。当該領域の塩基配列がデータベースに登録されていない植物については、入手可能な植物から順次PCRで増幅後、塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. 食中毒事例の多い植物の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法の開発

登田らの報告(食衛誌, 53, 105–120, 2012)によると、有毒植物の誤食による食中毒には以下の特徴がある；

- 1) 発生件数別の原因植物上位4種で全体の約80%を占める
- 2) 採取しようとした植物(食用)と誤認する食中毒原因植物との組合せがかなり固定されている。

このような傾向から、発生件数の多いバイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンの迅速・簡便な鑑別法を構築することとした。

そこで、バイケイソウとギョウジャニンニク、チョウセンアサガオとゴボウ、トリカブトとニリンソウ、スイセンとニラとを識別するためのPCR-RFLP法を構築した(図1)。本法を適用するために選択したDNA領域は *rbcL* または *matK* の一部とした。両領域は中程度の識別能を有する領域として知られている。よって、同一種間の個体差による相違は検出されず、比較する植物とは明確に識別できることが期待される。

また、制限酵素にNew England Biolabs社のTime-Saver™品質の酵素を選択することにより、反応時間を短縮させる(通常1時間のところ5分で同等の結果が得られる)ことが可能であることを確認した。

2. 模擬調理サンプルからの direct PCR

食中毒事例の原因食品は調理されたものが想定される。そのため、調理された試料に対してもDNA分析を適用することが可能であるかを検討した。バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンに対して模擬調理(10分間の煮沸)を行った後、DNAの粗抽出および増幅を試みた(図2)。その結果、模擬調理サンプルから抽出したDNAが、

新鮮材料を用いて抽出した DNA と遜色なく PCR の鋳型として適用可能であることを確認した。

3. *trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長の比較による食中毒原因植物の推定

調理済みの食中毒原因食品は植物の形態学的な特徴を欠くことが想定される。そのため、迅速な原因植物の推定が、適切な治療を早期に開始することにつながる。

葉緑体ゲノム上の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域は種により塩基配列長の変化が顕著にあらわれる領域として知られている。そこで、平成元年～22年に日本で食中毒原因植物と同定された植物の当該領域を比較した。現時点で入手可能なデータに関しては、塩基配列長は 162 bp から 611 bp にわたっている。食中毒発生時期や地域などの情報と合わせて利用することにより、食中毒原因植物の推定をすることが可能になると思われる。

D. 考察

有毒植物の誤食による食中毒はウイルスや細菌の汚染による食中毒と比較して、発生件数や患者数は少ないものの致死率が高いため、医療現場における初期対応がより重要となる。食中毒原因植物の同定は患者などによる聞き取り調査や原因成分の化学分析が行われているが、結論に至るまでに時間がかかることが問題となっている。

そこで我々は、迅速・簡便な食中毒原因植物の同定法を開発することを目的に研究を行った。はじめに、誤食例の多い有毒植物 4 種の PCR-RFLP 法を利用した鑑別法を開発した。さらに、上記 4 種を含め過去に誤食例のあった有毒植物の推定においても PCR 法が適用可能であることを示した。

今回開発した鑑別法の特徴は、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。よって、本分析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るものと考えている。

E. 結論

PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑別法により、迅速・簡便な有毒植物鑑別法を確立した。本法は、高価な機器や高度な実験手技を必要とせず、簡便な操作および短時間で、容易に植物種を同定できるので、食中毒患者への初期対応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。

F. 研究発表

1. 数馬恒平, 佐竹元吉, 紺野勝弘: 重症トリカブト中毒事例とその食品衛生学的背景. 食品衛生学雑誌, 2013, 54 (6), 419-425.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

【資料】

表 1. PCR-RFLP 用プライマー

| 対象植物 | Primer | Sequence (5' 3') |
|-----------|---------|-----------------------------|
| バイケイソウ | BG-rF1 | GTCTTGATCGTTACAAAGGACG |
| ギョウジャニンニク | BG-rR2 | CATTACGATAGGAACTCCCAATTC |
| チョウセンアサガオ | CG-rF12 | AGTAACTCCTCAACCTGGAGTTCC |
| ゴボウ | CG-rR13 | CATTCATAAACAGCTCTACCGTAG |
| トリカブト | TN-mF3 | CCTATCCATCTGGAACCTATTGGTTC |
| ニリンソウ | TN-mR4 | TGAATTTTCTAACATTTGACTCCTTAC |
| スイセン | SN-rF5 | ACTGTGTGGACTGATGGACTTACCA |
| ニラ | SN-rR6 | GCTCTACCGTAGTTTTTTTGCGGATA |

表 2. 食中毒原因植物の *trnH-psbA* intergenic spacer 領域の塩基配列長

| 食中毒原因植物 | 塩基配列長 (bp) |
|-----------|-----------------|
| ニホンスイセン | 611 (GQ923940) |
| タマスダレ | 604 (KC704256) |
| クワズイモ | 590 |
| ヨウシュヤマゴボウ | 516 (DQ006209) |
| タバコ | 510 (NC_001879) |
| チョウセンアサガオ | 497 |
| イヌサフラン | 477 (JF934069) |
| アジサイ | 394 (HE983395) |
| ジギタリス | 393 |
| オクトリカブト | 346 |
| コバイケイソウ | 281 (JF807783) |
| バイケイソウ | 266 (JF807759) |
| ドクニンジン | 243 (DQ006135) |
| ヒョウタン | 162 (GQ248323) |

塩基数の後のカッコは accession number。

Accession number のないデータは今回決定した。

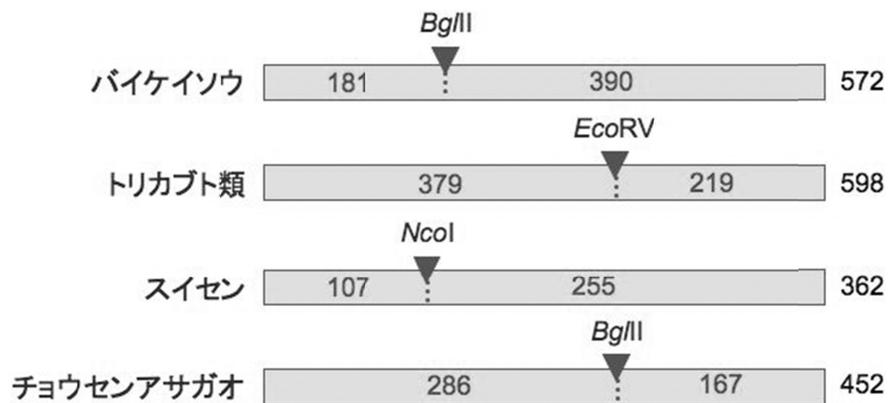
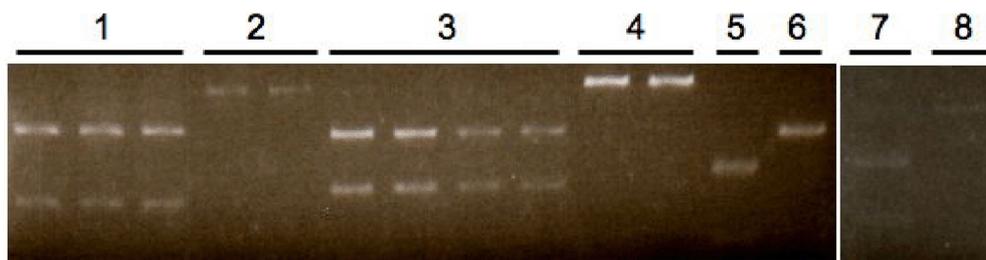


図 1. PCR-RFLP 分析のアガロースゲル電気泳動像.

有毒植物 (1、3、5、7) は制限酵素処理により DNA が切断される。1: バイケイソウ、2: ギョウジャニンニク、3: トリカブト、4: ニリンソウ、5: スイセン、6: ニラ、7: チョウセンアサガオ、8: ゴボウ

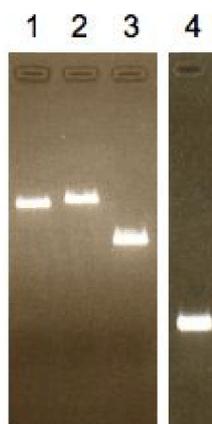


図 2. 模擬調理サンプルからの direct PCR.

レーン 1~3 は 3%アガロースゲル、レーン 4 は 1%アガロースゲルで電気泳動を行った。1: バイケイソウ、2: トリカブト、3: スイセン、4: チョウセンアサガオ

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」
分担研究報告書

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

| | | |
|-------|--------|--------------|
| 分担研究者 | 登田美桜 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究協力者 | 畝山智香子 | 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 研究協力者 | 與那覇ひとみ | 国立医薬品食品衛生研究所 |

研究要旨

自然毒による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。従って、今後、より効果的に消費者へ自然毒に関する情報を提供できるようにするための資料として、消費者が自然毒についてどの程度の知識を持ち、どのように考えているかを調査した。その結果、消費者は、実際にリスクが高い自然毒よりも、行政的に管理されリスクも低い残留農薬や輸入食品の方を不安に感じていることが確認された。また、自然毒関連用語については、比較的身近なテトロドトキシンや貝毒、テングタケ、ニコチン、トリカブトなどはよく知られていたが、他については全体的に認知度が低かった。今回の調査結果によると、自然毒に関して消費者が広く、そして正しく認識しているとは言えず、食中毒発生の予防対策が十分ではないと考えられた。現在も国や自治体が様々なかたちで情報提供を行っているが、今後は、自然毒に関する消費者の認知度が依然として低いことを認識し、その内容と提供方法をより一層工夫することが求められる。

A. 研究目的

自然毒による食中毒の大部分は動物性・植物性ともに「家庭」で発生しており、消費者の自然毒についての知識不足が原因である場合が多い。以前、国内の自然毒による食中毒に関するリスク管理の現状を把握するために、自治体（都道府県、保健所設置市、特別区）の食品安全担当者を対象としたアンケート調査を実施した。その調査結果によると、多くの自治体が、自然毒による食中毒の発生を低減するには、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した。そのような認識のためか、自治体による取り組みとしては、ウェブサイトでの情報提供、広報誌・冊子・ポスターの配布・展示が多かった。ただし、提供されている情報

の内容（自然毒の種類、詳しさの度合い、等）は自治体によって様々であり、何らかの自然毒による食中毒が発生した時に注意喚起の一環としてその自然毒に関する情報を提供している場合もある。自然毒の種類は非常に多く、全てに関して情報提供をするのは難しい。地域によって問題となる自然毒の種類も異なる。また、自然毒の中でも、フグ毒のように消費者の認知度が高いと考えられるものもあれば、一般的にはほとんど知られていないものもある。このような背景から、焦点を絞って、より効果的に消費者へ自然毒に関する情報提供を行うためには、まずバックグラウンド情報として消費者の自然毒に関する認知度を知る必要がある。従っ

て、本研究では、消費者の自然毒に関する認知度を知るためのアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

消費者が自然毒をどのように捉えているか、またどの程度知っているかを理解できるようにするためのアンケート調査表(添付1)を作成した。2013年10~12月、山口県で開催された事業者・大学生・教職員向け講習会の出席者、宮城県の大学生・教職員・公務員向け講習会、神奈川県及び群馬県の一般向け講習会に参加した計370名を対象にアンケート調査表を配布し、調査を実施した。講習会の内容は主に食品関連(ただし、自然毒との関連性はない)のものであった。

回収されたアンケート調査の回答をもとに、自然毒に関する消費者の考えや認知度について検討した。

C. 研究結果及び考察

1. 食品に関する問題の不安について

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(図1)。その結果、微生物による食中毒(75%)、輸入食品(69%)及び残留農薬(66%)については、「とても不安」「やや不安」と回答した人が6割を超えていた。一方、自然毒については56%のみで、不安に感じていない人が半数近くいることが確認された。

健康リスクの観点からすると、発生件数・患者数がともに多い微生物による食中毒については、不安を感じる人の割合が多くなるのは妥当である。しかしながら、行政的に管理されて

おりリスクも低い輸入食品及び残留農薬よりも、毎年食中毒が発生し死者も出ている自然毒の方が不安を感じる人の割合が低いのは問題である。よって、自然毒の危険性の周知は不十分な状況であり、今後さらなる取り組みが必要だと考えられる。

2. 自然毒による食中毒に関する知識について

関連分野の研究者や自治体の食品安全担当者であれば当然知っていることでも、消費者が知らないことはよくある。そのため、提供する情報の内容を検討するにあたり、消費者が自然毒についてどのような知識を持っているか知っておくのは有用である。今回、自然毒による食中毒の発生状況や発生要因に関連する基本的な内容について、消費者が正しい知識を持っているか、またどのように考えているか調査した。

1年間の食中毒の発生件数はキノコ毒を原因とする事例が最も多く、そのことを89%の回答者は正しく認識していた(図2)。食中毒の発生場所の多くはフグ毒・キノコ毒ともに家庭であるが、回答者は、キノコ毒についてはそのことを認識しているものの(図4)、フグ毒については家庭と答えた人は約半数で、残りは飲食店又は宿泊施設と回答していた(図3)。また、フグ毒が過去の死亡事例の最も多い原因であることを知っていたのはわずか8%のみであった(図5)。食用にできるフグ種が決まっていることを知らないと回答した人が30%(図6)、フグの肝臓は毒性が高く食べてはいけないことを知らないと回答した人が12%いることがわかった(図7)。フグについては取扱いに関して厚生省環境衛生局長通知「ふぐの衛生確保について」(昭和58年、環乳第59号)が出

されており、フグが毒を持つことはよく知られているため、他の自然毒に比べて認知度は高いものと推定していた。しかしながら、以上の回答を考慮すると、食用にできるフグ種が決められていること、肝臓は毒性が高くて食べてはいけないことについて、必ずしも周知できているとは言えない状況であることが確認された。今後は、まずは現在のフグの取扱いについてどのような通知内容になっているか、食中毒の主な原因となっている自ら捕獲した魚を食べること、特に肝臓等の内臓を食べることのリスクについて周知徹底する必要がある。

キノコ毒による食中毒の多くは、食べられるキノコと外観がよく似ている毒キノコを誤認してしまうことが主な原因である。しかも、キノコの採集者が親戚や隣人に譲り渡すことにより、被害が拡大したケースも少なくない。今回のアンケート調査結果によると、キノコ採りでたくさん採れても知り合いには分けないと答えた回答者は60%であったが、反対に分けると回答した人は12%であった(図8)。また、図鑑があれば食べられるキノコと毒キノコを見分けられるかとの問いに対し、そう思わないと答えた人は77%で大半を占めたが、その一方で14%の人は分からないと回答し、5%の人は見分けられると思うと回答していた(図9)。キノコは、個体差が大きく、同じキノコ種でも色、大きさ、形が異なることがよくある。図鑑に掲載された写真は最も典型的な外観や特徴を示したものであり、それだけでは目の前のキノコの種類を特定するのは難しい。そのため、約2割の人は図鑑があれば見分けられる、あるいは分からないと回答していることを考慮すると、キノコの判別の難しさを消費者により強く伝えていくことが重要だと考えられる。

キノコや高等植物による食中毒事例の中には、偶然に見つけたものを食べて中毒を発症した事例がある。しかしながら、美味しそうに見えるキノコ(図10)や木の実(図11)を見つけたら採集して食べると答えた人はいずれも数%のみで、その点については注意が向けられているものと考えられる。

高等植物による食中毒の発生状況の最近の特徴の一つに、ジャガイモによる食中毒が毎年発生しているということがある。そのほとんどが小学校の授業の一環でジャガイモを栽培し、それを喫食した事例である。これは、栽培に不慣れな教師や生徒が育てるために、栽培や保管が不適切となり、未成熟化や光に当たって有毒成分のソラニン類が多い状態のイモを食することが主な原因である。幸いにも、授業の一環なので喫食量はそれほど多くなく、重症例はない。しかしながら、毎年発生してその都度注意喚起がなされているにも係わらず、発生が決してなくらいというのが問題である。そこで、消費者がジャガイモによる食中毒についてどの程度知っているかを調査した。ジャガイモによる食中毒が毎年発生していることを知っていたのは回答者のうち44%のみであり、52%は知らなかったと回答した(図12)。また、ジャガイモによる食中毒はどこで発生していると思うかとの問いに対しては、74%の人が家庭と回答し、正しく学校と回答したのはたったの13%であった(図13)。これらの結果から、ジャガイモによる食中毒について正しく認識している人は少ないことが確認され、今後は教育現場や子どものいる家庭を対象に重点的に注意喚起を行う必要がある。

3. 自然毒に関連する用語について

消費者が自然毒に関してどの程度知っているかを確認するため、関連用語の認知度を調査した。ただし、23名の回答者が全ての問いに対して無回答であったため、それらは集計に入れなかった。

3-1. マリントキシン等

食中毒の原因となり得る魚類やマリントキシン等の用語(8つ)について、聞いたことがある又は自然毒と関連することを知っているか質問した。8つの用語のうち回答者の半数以上に認知されていたのは、テトロドトキシン(71%)、ヒスタミン(61%)、麻痺性貝毒(55%)及び下痢性貝毒(50%)であり、他は半数に満たなかった(図14)。認知度が高かったものについては、アンケートを実施した平成23年に食中毒の発生や汚染製品の回収等に関する報道がなされたため、そのことが影響した可能性が考えられた。シガテラ(20%)、テトラミン(19%)及びアブラソコムツ(14%)は、20%以下で認知度が非常に低かった。

3-2. 毒キノコの種類

食中毒の原因となる主な毒キノコの名前について、聞いたことがある又は自然毒と関連することを知っているか質問した。キノコによる食中毒の発生件数及び患者数ともに多いのがクサウラベニタケとツキヨタケである。これら2種でこれまで国内で発生したキノコによる食中毒事例の半分を占めるため、その食中毒予防がリスク管理上有効といえる。しかしながら、それらの認知度を調べてみると、ツキヨタケは回答者の40%、クサウラベニタケは20%と低いことが確認され、依然としてこれらの毒キノコの名前及び危険性について周知できていないことがわかった(図15)。一方、昔から毒キノコとして有名なテングタケについては7割

以上の回答者が知っていると答えた。また、強毒性で症状が重篤化しやすいドクツルタケやカエンタケについても認知度が低かった。

3-3. 有毒な高等植物の種類及び成分

食中毒の原因となる主な高等植物及びその成分について、聞いたことがある又は自然毒と関連することを知っているか質問した。最もよく知られていたのはトリカブトとニコチンであった(図16)。他に、回答者の半数以上に認知されていたのは、ギンナン、ヒガンバナ、青梅、ワラビ及びソラニンであった。逆に認知度が低かったのは、グロリオサ(3%)、イヌサフラン(10%)とその有毒成分であるコルヒチン(13%)であった。平成23年にイヌサフランによる食中毒が2件発生しており、厚生労働省からも注意喚起の通知が出された。コルヒチンは毒性が強く、過去には死亡例も報告されている。しかも、最近ではイヌサフランやグロリオサを園芸植物として見かけることも多くなり身近になっていることを考慮すると、もう少し認知度を上げた方が良くと考えられる。ただし、トリカブトのように食用山菜との誤認による食中毒の発生だけでなく自殺目的に意図的に摂取する場合があることを考慮すると、強毒性の植物の場合は注意喚起の内容や方法を慎重に検討する必要がある。他に認知度が低かったのがバイケイソウとクワズイモである。平成元年~22年の食中毒統計によると、高等植物による食中毒の中でバイケイソウ類(バイケイソウ・コバイケイソウ・オオバイケイソウ)による事例が最も発生件数が多いのにもかかわらず、バイケイソウの認知度は6%のみであった。クワズイモの認知度は10%であった。バイケイソウ類の次に食中毒の発生件数が多いチョウセンアサガオの認知度は34%であった。

4. 行政による情報提供の仕方について

消費者に対して行政がいくら情報提供をしようとしても、それが消費者まで届かないのであれば意味がない。そこで、どのような方法で情報提供すれば効果的であるのか、消費者の視点から調査することにした。ただし、アンケート調査票作成者が思いつく範囲で選択型の質問形式にしたので、内容についてはバイアスがある。結果は、行政が消費者に対して自然毒に関する情報提供をする場合にどのような方法が効果的だと思うかとの問いに対し(複数回答可)、「テレビによる広報」、「小中学校での教育」及び「新聞による広報」と回答した人が多かった(表1)。国の行政機関や各自治体などの公的機関が情報伝達の方法として利用していることが多いHPでの情報公開、広報誌、講習会は、新聞やテレビなどのメディアや学校教育に比べると回答者は少なかった。また、「講習会は、ある程度興味のある方しか来られないと思うので、あまり効果的でないと思う」「ホームページを見ないような層にも、積極的な情報提供が必要」といった意見も寄せられ、現在の情報提供の方法に加えて何らかの工夫が必要であることが示唆された。

研究目的の項で記した以前のアンケート調査において、自治体から国への要望として、啓発用リーフレット等の資料の作成・配布を行って欲しいという回答が特徴的であった。そのため、本研究では、作成した資料をどのような場所に配布等をするか効果的であるか調査することにした。パンフレットについては、「スーパーマーケット」「小中学校」で配布するのが効果的だとする回答者が多く、次いで「都道府県や市町村の役所・公民館」「保健所」などの

公的施設、「飲食店」が多かった(表2)。ポスターの展示場所についての回答も、パンフレットとほぼ同様の傾向であった(表3)。しかしながら、「スーパーマーケットに有毒魚のポスターが貼ってあると、お店に並んでいる魚がすべて有毒に見えてしまう」といった意見も寄せられ、食品を取り扱っているスーパーマーケットでの配布・展示については、消費者が目にする機会は多いかもしれないが、消費者心理に留意して営業妨害にならないようにしなければならない。また、他の意見として「自然毒についてはあまりPRされていません。ニュースや新聞でPRしなくては市民に知識が全くない」というものがあり、先の効果的な情報提供の方法に関する質問の回答結果も踏まえると、メディアを介した情報提供や注意喚起が最も有効なようである。さらに、いずれの質問についても小中学校での教育が上位にきていることから、自然毒について学べる環境作りが重要だと認識されていることが示唆された。

5. 回答者について

本研究の回答者370名の性別、年齢、職業については図17~19、アンケートを実施した都道府県については図20、釣り・キノコ狩り・山菜採りに行く回数については図21~23に結果を示した。アンケートを実施した地域が限定されたため、そのことが自然毒の関連用語の認知についてはバイアスになっている可能性がある。

D. 結論

自然毒による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。従って、今

後の取り組みのためのバックグラウンド情報として、消費者が自然毒についてどの程度の知識を持ち、どのように考えているかを調査した。その結果、消費者は、行政的に管理されリスクも低い残留農薬や輸入食品の方が、実際にリスクが高い自然毒よりも不安に感じていることが確認された。また、フグの肝臓は毒性が高く食べてはいけないこと、毎年食中毒が発生しているキノコの名前、小学校で毎年ジャガイモによる食中毒が発生していることなど、消費者に知っておいて欲しい基本的なことさえ認知度が低いことも確認された。自然毒関連用語については、比較的身近なテトロドトキシンや貝毒、テングタケ、ニコチン、トリカブトなどはよく知られていたが、他は全体的に認知度が低かった。自然毒による食中毒の多くは自ら捕獲又は採集したものの喫食であることから、消費者に、自然毒にはどのようなものがあり、どのような危険性があるのか知って貰うだけでも予防としての効果がある。しかしながら、今回の調査結果によると、自然毒に関して消費者が広く、そして正しく認識しているとは言えず、食中毒発生の予防対策が十分ではないと考えられた。消費者側からすると、メディアでの情報提供、小中学校での教育が効果的だと考えられている。現在も国や自治体が様々なかたちで情報提供を行っているが、今後は、自然毒に関する消費者の認知度が低いことを認識し、その内容と情報提供の方法をより一層工夫することが求められる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 登田美桜：CODEX INFORMATION
FAO/WHO 合同食品規格計画 第7回汚染

物質部会．食品衛生研究，63(9)，47-62
(2013)

- 2) 登田美桜，畝山智香子，春日文字：過去50年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向．食品衛生学雑誌，55(1)，55-63
(2014)

2. 学会発表

- 1) Toda M, Uneyama C, Kasuga F：Trends of food poisonings caused by poisonous plants in Japan, 1989-2010. 第13回国際トキシコロジー学会，2013年7月，韓国ソウル．
- 2) 登田美桜，畝山智香子，春日文字：わが国における動物性自然毒による食中毒の傾向．第106回日本食品衛生学会学術講演会，2013年11月，宜野湾市．
- 3) 登田美桜：日本国内で発生する自然毒による食中毒．第50回全国衛生化学技術協議会年会，2013年11月，富山市．
- 4) 登田美桜，畝山智香子，春日文字：昭和36年～平成22年に報告された高等植物による食中毒事例の傾向．第28回日本中毒学会東日本地方会，2014年1月，東京都．

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 謝辞

消費者の自然毒に関する認識に関するアンケート調査にご協力いただいた皆様に心から感謝申し上げます。

【A. 食品に関する問題の不安について】

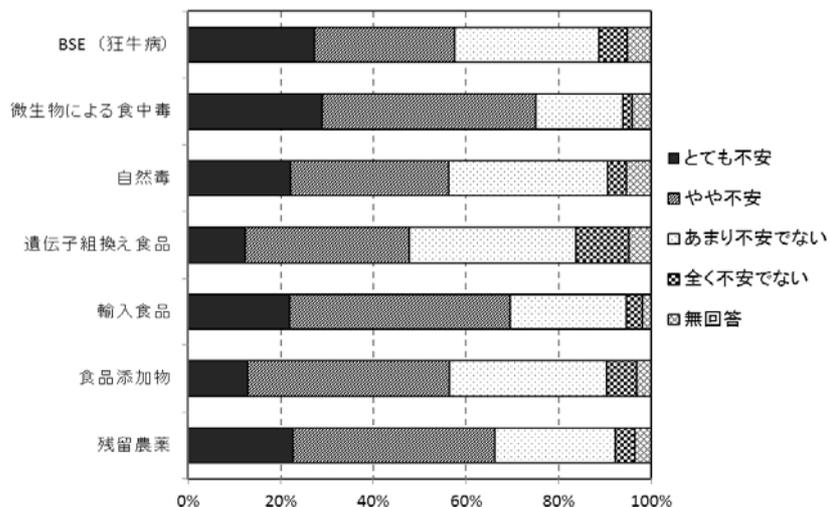


図1. 食品に関する問題の不安について

【B. 自然毒による食中毒に関して】

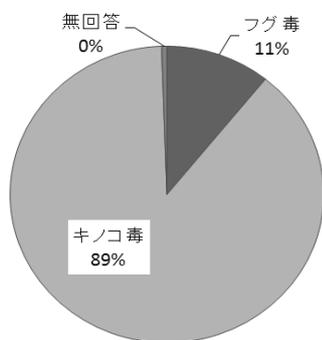


図2. <Q1> 1年間に発生する食中毒の件数はフグ毒とキノコ毒のどちらが多いと思いますか？ (正解：キノコ毒)

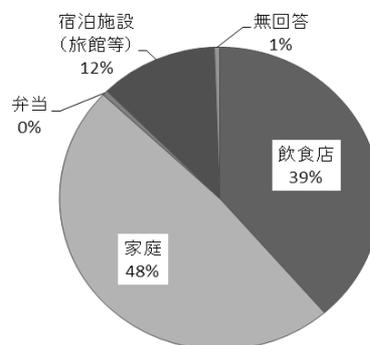


図3. <Q2> フグ毒による食中毒の発生場所等はどこが一番多いと思いますか？ (正解：家庭)

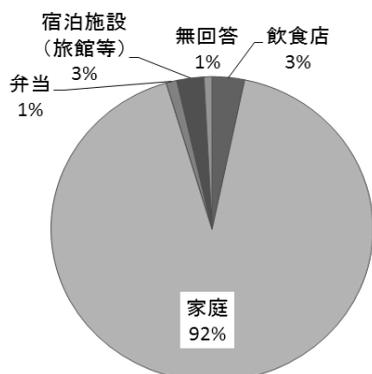


図4. <Q3> キノコ毒による食中毒の発生場所等はどこが一番多いと思いますか？ (正解：家庭)

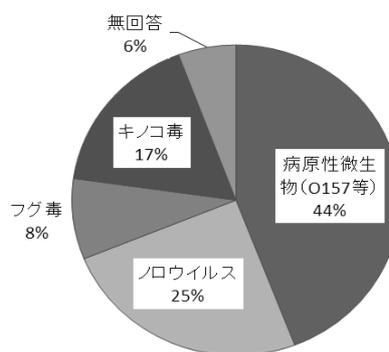


図5. <Q4> 過去20年間の食中毒による死亡事例のうち最も多い原因はどれだと思いますか？ (正解：フグ毒)

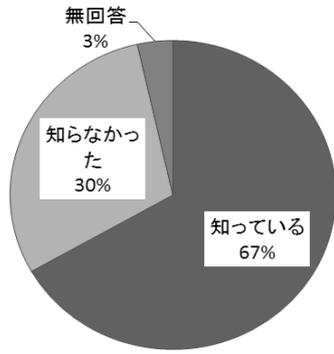


図6. <Q5> 食用にできるフグの種類が決まっていることをご存知ですか？

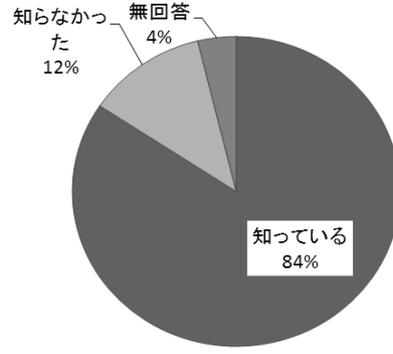


図7. <Q6> フグの肝臓は毒性が高いので食べてはいけないことをご存知ですか？

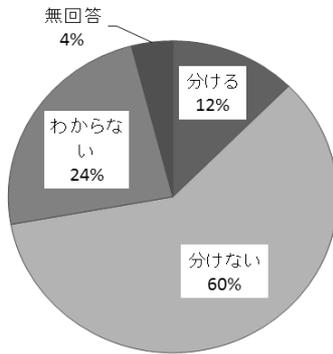


図8. <Q7> キノコ採りでたくさん採れたら知り合いに分けたいと思いますか？

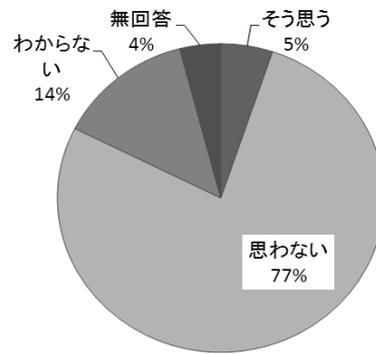


図9. <Q8> 図鑑があれば食べられるキノコと毒キノコを見分けられると思いますか？

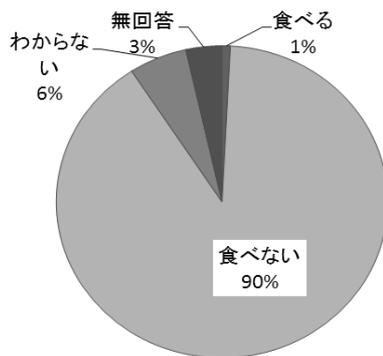


図10. <Q9> 美味しそうに見えるキノコを見つけたら持ち帰って食べますか？

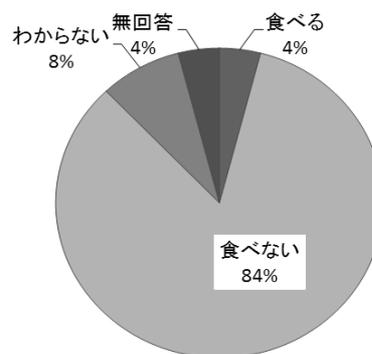


図11. <Q10> 美味しそうに見える木の美を見たら摘んで食べますか？

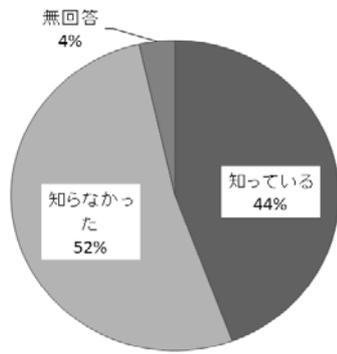


図12. <Q11>ジャガイモによる食中毒が毎年発生していることをご存知ですか？

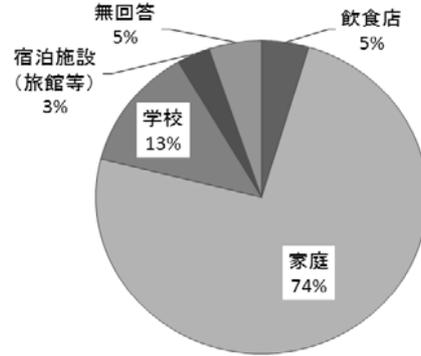


図13. <Q12>ジャガイモによる食中毒はどこで発生していると思いますか？(正解：学校)

【C. 自然毒に関連する用語について】

<Q> 次の用語は全て自然毒に関連するものです。聞いたことがある又は自然毒と関連することについて、あなたをご存知の用語に○をご記入下さい。

- ある：聞いたことがある又は自然毒と関連することを知っている
- ない：聞いたことがない又は自然毒と関連することを知らない

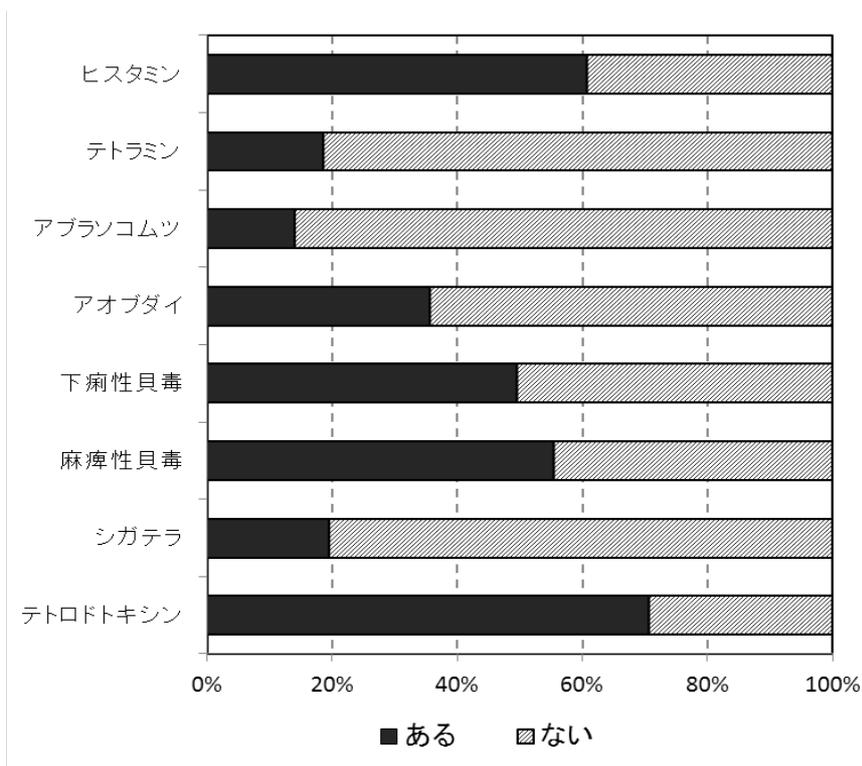


図14. マリントキシン等関連用語

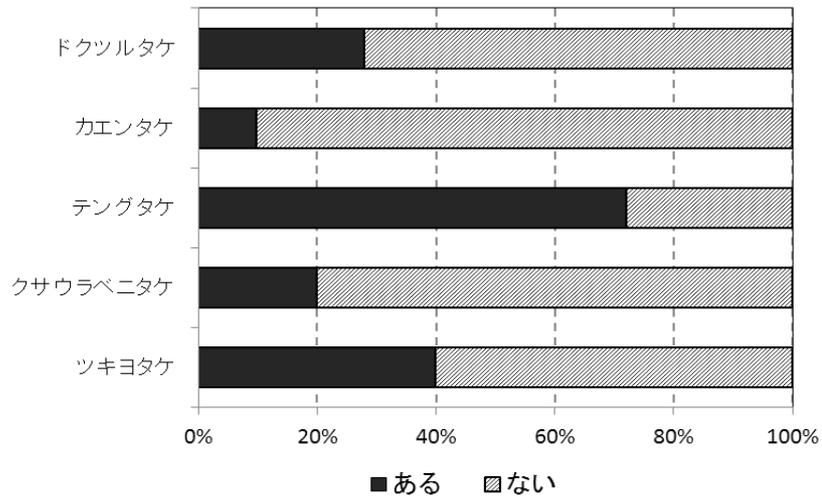


図15. 毒キノコの種類

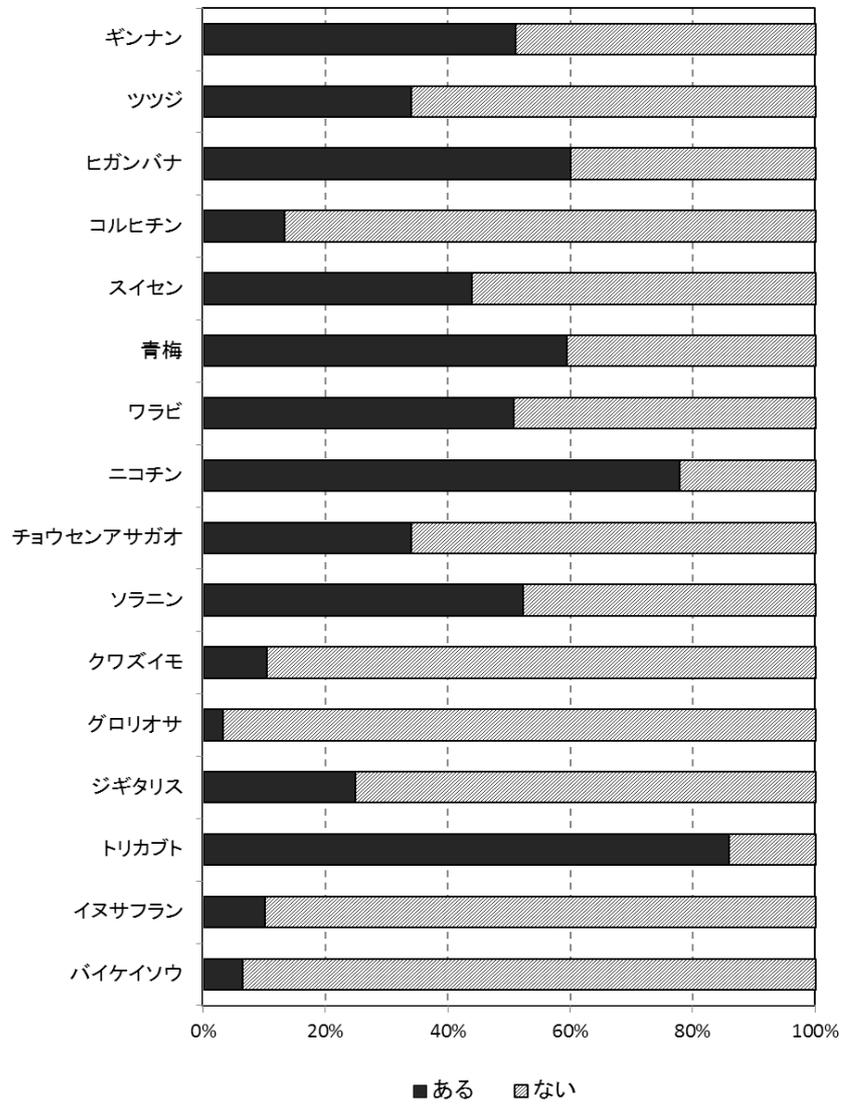


図16. 有毒な高等植物の関連用語

【D. 行政による情報提供の仕方について】

表1. <Q1> 行政が消費者に対して自然毒に関する情報提供をする場合、どのような方法が効果的だと思いますか。(複数回答可)

| 方法 | 回答数 | (その他の回答) |
|--------------|-----|--|
| テレビによる広報 | 275 | ・SNS等のネット上のコンテンツで広く提供するな |
| 小中学校での教育 | 235 | ・NHK「ためしてガッテン」みたいな番組 |
| 新聞による広報 | 183 | ・電車、バスの車内 |
| 自治体広報誌 | 145 | ・身近なお年寄りから習いました |
| 政府・自治体HP | 140 | ・職場のパパ向けの講演会 |
| ポスター掲示 | 127 | ・メール |
| ラジオによる広報 | 87 | ・山 |
| 消費者向け講習会 | 84 | ・家庭に配布してほしい |
| 街灯などでの展示コーナー | 47 | ・自然毒についてはイメージできるように絵がよい ・TwitterでのPR。フォローしなくてもできるもの |

- ・講習会は、ある程度興味のある方しか来れないと思うので、あまり効果的でないと思う
- ・ホームページを見ないような層にも、積極的な情報提供が必要
- ・ニュースだけでなく、ワイドショーやクイズ番組などのメディア利用であると良いのでは

表2. <Q2> 自然毒に関する情報をまとめたパンフレットを消費者に配布する場合、どこに置いておくのが効果的だと思いますか。(複数回答可)

| 場所 | 回答数 | (その他の回答) |
|-----------------|-----|---|
| スーパーマーケット | 262 | ・家庭に配る ・回覧板に添付(回答5件) |
| 小中学校での配布 | 231 | ・コンビニ(回答2件) ・事業所、会社(回答2件) |
| 都道府県や市町村の役所、公民館 | 151 | ・病院 ・ポストに入れる。 |
| 飲食店 | 149 | ・イベント会場 ・電車、バスの車内 |
| 保健所 | 123 | ・山 |
| 鉄道駅 | 74 | ・広報と一緒に配布(県政・市政だより)(回答3件) |
| 図書館 | 45 | ・携帯ショップの待合室、銭湯などの温泉施設、病院 ・ショッピングセンター、人が多く集まる場所 |

表3. <Q3> 自然毒に関する情報をまとめたポスターを展示する場合、どこに置いておくのが効果的だと思いますか。(複数回答可)

| 場所 | 回答数 | (その他の回答) |
|-----------------|-----|-----------------------|
| スーパーマーケット | 268 | (その他の回答) |
| 小中学校 | 218 | ・電車、バスの車内(回答2件) |
| 都道府県や市町村の役所、公民館 | 174 | ・ショッピングセンター、人が多く集まる場所 |
| 飲食店 | 157 | ・広報誌(回覧板)(回答2件) |
| 鉄道駅 | 124 | ・イベント会場 |
| 保健所 | 122 | ・大学、高校 |
| 図書館 | 44 | ・山 |

- ・飲食店、飲み屋、信号待ちで見えるところ、地面に埋め込む
- ・自然毒についてあまりPRされていません。ニュースや新聞でPRしなくては市民は知識が全くない
- ・毒きのこがある山の入り口、毒のある魚がよく獲れる海の周り
- ・スーパーマーケットに有毒魚のポスターが貼ってあると、お店に並んでいる魚がすべて有毒に見えてしまう

【E. 回答者について】

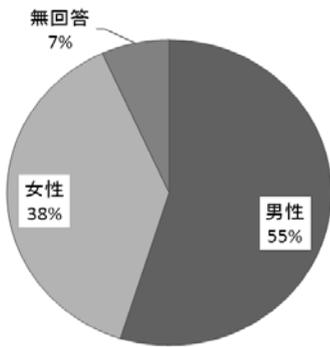


図17. 回答者の性別

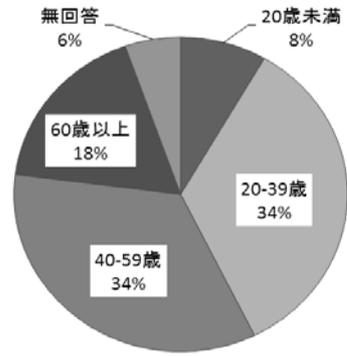


図18. 回答者の年齢

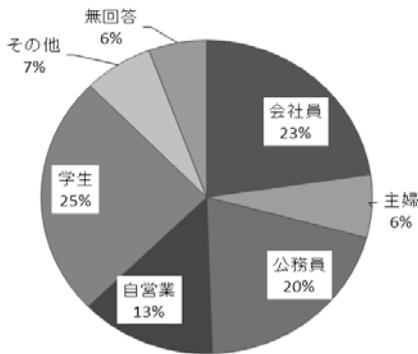


図19. 回答者の職業

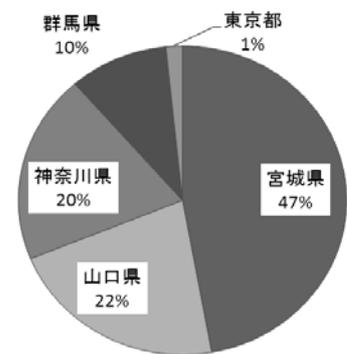


図20. アンケートを実施した都道府県

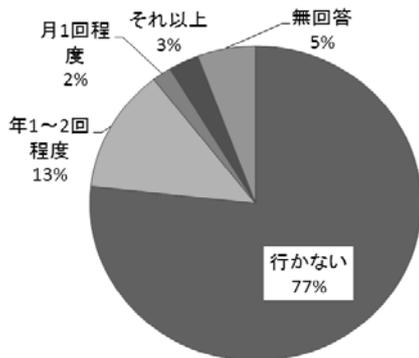


図21. 回答者が釣りに行く回数

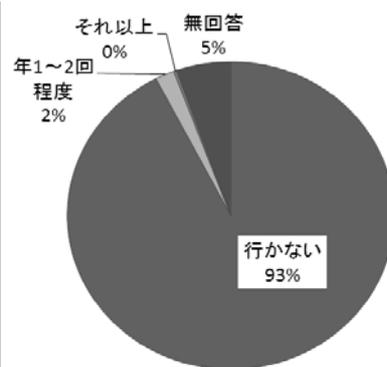


図22. 回答者がキノコ狩りに行く回数

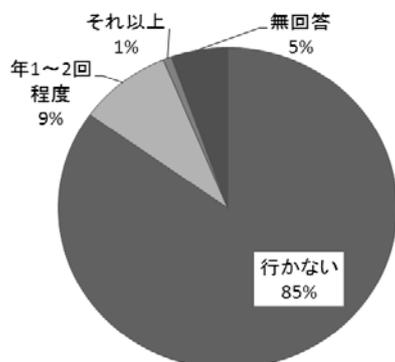


図23. 回答者が山菜採りに行く回数

アンケート調査票

自然界の動物や植物等に含まれ、ヒトや動物へ有害な影響を与える毒素のことを「**自然毒**」と言います。身近なものでは、フグ毒、キノコ毒、植物毒などがあります。

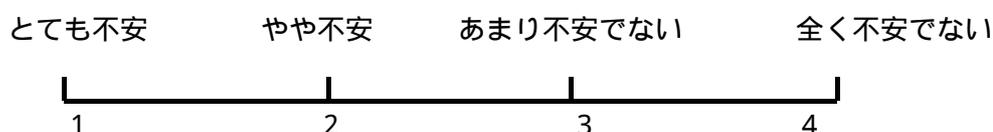
このアンケートは、消費者の皆様が「**自然毒**」をどのように捉えているかを理解し、行政機関による今後の自然毒による食中毒予防に役立てるためのものです。

どうかご協力をよろしくお願い申し上げます。

A. 食品に関する問題の不安について

次のものについて不安を感じますか？

それぞれについて、次の1～4のうち1つ選び()にご記入下さい。



| | |
|-----------|----------|
| 残留農薬 | () |
| 食品添加物 | () |
| 輸入食品 | () |
| 遺伝子組換え食品 | () |
| 自然毒 | () |
| 微生物による食中毒 | () |
| BSE (狂牛病) | () |

B. 自然毒による食中毒に関して

それぞれの問いに対して、最も適切だと思うものを で囲んで下さい。

Q1. 1年間に発生する食中毒の件数はフグ毒とキノコ毒のどちらが多いと思いますか？

フグ毒 キノコ毒

Q2. フグ毒による食中毒の発生場所等はどこが一番多いと思いますか？

飲食店 家庭 弁当 宿泊施設 (旅館等)

Q3. キノコ毒による食中毒の発生場所等はどこが一番多いと思いますか？

飲食店 家庭 弁当 宿泊施設 (旅館等)

Q4. 過去20年間の食中毒による死亡事例のうち最も多い原因はどれだと思いますか？

病原性微生物 (O157等) ノロウイルス フグ毒 キノコ毒

Q5 . 食用にできるフグの種類が決まっていることをご存知ですか？

知っている 知らなかった

Q6 . フグの肝臓は毒性が高いので食べてはいけないことをご存知ですか？

知っている 知らなかった

Q7 . キノコ採りでたくさん採れたら知り合いに分けたいと思いますか？

分ける 分けない わからない

Q8 . 図鑑があれば食べられるキノコと毒キノコを見分けられると思いますか？

そう思う 思わない わからない

Q9 . 美味しそうに見えるキノコを見つけたら持ち帰って食べますか？

食べる 食べない わからない

Q10 . 美味しそうに見える木の実を見たら摘んで食べますか？

食べる 食べない わからない

Q11 . ジャガイモによる食中毒が毎年発生していることをご存知ですか？

知っている 知らなかった

Q12 . ジャガイモによる食中毒はどこで発生していると思いますか？

飲食店 家庭 学校 宿泊施設（旅館等）

C . 自然毒に関連する用語について

次の用語は全て自然毒に関連するものです。聞いたことがある又は自然毒と関連することについて、あなたがご存知の用語に をご記入下さい。

テトロドトキシン () シガテラ () 麻痺性貝毒 () 下痢性貝毒 ()
アオブダイ () アブラソコムツ () テトラミン () ツキヨタケ ()
クサウラベニタケ () テングタケ () カエントケ () ドクツルタケ ()
バイケイソウ () イヌサフラン () トリカブト () ジギタリス ()
グロリオサ () クワズイモ () ソラニン () チョウセンアサガオ ()
ヒスタミン () ニコチン () ワラビ () 青梅 () スイセン ()
コルヒチン () ヒガンバナ () ツツジ () ギンナン ()

D . 行政による情報提供の仕方について

Q 1 . 行政が消費者に対して自然毒に関する情報提供をする場合、どのような方法が効果的だと思いますか。あなたが効果的だと思うものに をご記入下さい(複数回答可)

- 政府・自治体のホームページでの掲載 ()
- 自治体広報誌への掲載 ()
- 消費者向け講習会の開催 ()
- ポスター展示 ()
- テレビによる広報 ()
- ラジオによる広報 ()
- 新聞による広報 ()
- 街頭などでの展示コーナー設置 ()
- 小中学校での教育 ()
- その他 (自由にお書き下さい:)

Q 2 . 自然毒に関する情報をまとめたパンフレットを消費者に配布する場合、どこに置いておくのが効果的だと思いますか。あなたが効果的だと思うものに をご記入下さい(複数回答可)

- 都道府県や市町村の役所、公民館 ()
- 保健所 ()
- 小中学校での配布 ()
- スーパーマーケット ()
- 鉄道駅 ()
- 図書館 ()
- 飲食店 ()
- その他 (自由にお書き下さい:)

Q 3 . 自然毒に関する情報をまとめたポスターを展示する場合、どこに展示するのが効果的だと思いますか。あなたが効果的だと思うものに をご記入下さい(複数回答可)

- 都道府県や市町村の役所、公民館 ()
- 保健所 ()
- 小中学校 ()
- スーパーマーケット ()
- 鉄道駅 ()
- 図書館 ()
- 飲食店 ()
- その他 (自由にお書き下さい:)

平成 25 年度 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-----------------|---|----------------|----------------------------|----------|-------|------|-----|
| Hajime TOYOFUKU | Regulatory Perspective in Translating Science into policy: Challenges in Utilizing Risk Assessment for the elaboration of Codex standards of Shellfish Safety | Sauvé, Gilbert | Molluscan Shellfish Safety | Springer | spain | 2013 | 73 |
| Hajime TOYOFUKU | Vibrio parahaemolyticus Risk Management in Japan. | Sauvé, Gilbert | Molluscan Shellfish Safety | Springer | spain | 2013 | 129 |
| 豊福肇 | 新しい食中毒、リスクの複雑化とアウトブレイクについて、生食のおいしさとリスク。一色賢司監修、NTS | 一色 賢司 | 生食のおいしさとリスク | NTS | 日本 | 2013 | 395 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|---|--|------------------|----|-----|------|
| 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 | 19 | 823 | 2013 |
| 豊福 肇、小林光士、下出俊樹、牛丸藤彦、小野寺仁、小池史晃、村瀬繁樹 | JA 飛騨ミートにおける SSOP 及び HACCP に基づく食品安全管理システムによる微生物制御とその微生物学的検証 | 日本獣医師会雑誌 | 66 | 718 | 2013 |
| 豊福 肇、長谷川 専、柿沼美智留 | 既存リスク評価ツールを用いた食品衛生監視指導効果の評価 | 日本獣医師会雑誌 | 66 | 816 | 2013 |
| 藤井建夫、豊福肇 | 醤油の品質管理と Codex 規格 | 月刊フードケミカル | | 52 | 2014 |
| 豊福 肇 | 世界に通用する衛生管理手法とは。 | 月刊フードケミカル | | 24 | 2012 |
| 豊福 肇、小坂 健 | 微生物リスク評価の経緯 | 食品衛生研究 | 63 | 13 | 2013 |
| 小川麻子、加地祥文、豊福 肇 | Codex Information. 第 21 回食品残留動物用医薬品部会 | 食品衛生研究 | 64 | 29 | 2014 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|-------------------|---|---------|----|-----|------|
| 数馬恒平, 佐竹元吉, 紺野勝弘 | 重症トリカブト中毒事例とその食品衛生学的背景 | 食品衛生学雑誌 | 54 | 419 | 2013 |
| 登田美桜 | CODEX INFORMATION, FAO/WHO 合同食品規格計画 第7回汚染物質部会 | 食品衛生研究 | 63 | 47 | 2013 |
| 登田美桜, 畝山智香子, 春日文子 | 過去50年間のわが国の高等植物による食中毒事例の傾向 | 食品衛生学雑誌 | 55 | 55 | 2014 |