

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26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27(2015)年 5月

I . 総括研究報告書

II. 分担研究報告書

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV . 刊 行 物 ・ 別 刷

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 15

2. 各国におけるリステリア症発生状況及び *Listeria monocytogenes* 菌株の
分子疫学的解析に関する研究

岡田 由美子 21

3. 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

豊福 肇 33

4. 食中毒事例が多いキノコの分子系統樹解析と検査法確立

近藤 一成 43

5. 植物毒の毒性評価と毒成分分析

紺野 勝弘 57

6. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

登田 美桜 61

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 93

IV. 研究成果の刊行物・別刷 95

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 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ある生物学的ハザードの中で、細菌類ではサルモネラ菌、赤痢菌、リステリア等を、自然毒では高等植物、きのこに関し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、チアパウダーによる事例が、細菌性赤痢ではインドツアーによる事例が発生した。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ていないため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。本年は、冷製肉を感染源とする死者 17 人の集団事例が発生した。米国では、もやしやリンゴ製品等による集団事例も発生した。国内外からの様々なリステリア汚染検体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行った。また、事例解析として、WHO の INFOSAN Emergency を通じて国際的に警報が発生された事例、欧州緊急警告システム 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本年度アラートが発せられた事例はカナダ産チア種子によるサルモネラアウトブレイクとキャラメルリンゴによるリステリアアウトブレイクであった。これらを含めて、アウトブレイクを輸入時検査のみで食い止めることは難しい。国内侵入後速やかに汚染物質を検出、排除するためには、分離株の同定に必要な菌株情報のデータベース整備と公開が必要である。

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、シークエンス解析・分子系統樹解析の結果をもとに、簡便法である PCR-RFLP 法を作成し、加熱調理試料にも適応可能な方法として確立した。さらに、精度が高いリアルタイム PCR 法（クサウラベニタケは 4 系統マルチプレックス）を確立した。高等植物においても *rbcL* や *matK* の領域を用いた PCR-RFLP 法を開発しているが、本年度はチョウセンアサガオ食中毒事例に適用して、現地調査から回収した試料の同定で繋がり、遺伝子判別法の有用性を示した。また、自然毒を含む食品に関連した

事例、規制、消費者への注意喚起等に関する海外情報収集を行うために、主に RASFF のデータを調査した（2014 年 12 月）。食品安全上注意が必要なものとしてビターアブリコットカーネルのアミグダリン、ハーブティーのピロリジジナルカロイド含有植物が挙げられた。食品に含まれる可能性がある自然毒に関する海外情報収集により、有害な食品の国内侵入の予防に役立つものと考えられた。

A. 研究目的

細菌（サルモネラ、赤痢菌等）のリスクに関する研究

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。国内では 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。そこで、海外で発生した食中毒の情報収集を行う。

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。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。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。そこで、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。

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。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り、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。

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

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 INFOSAN、欧州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。

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で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とともに、迅速な検査方法の確立と整備であると考えられる。国内で食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、全国からサンプルを収集して遺伝子配列を解析し、系統樹解析を行ってきた。これまでに、簡便迅速法として PCR-RFLP 法を開発したが、より信頼性の高い検査法としてリアルタイム PCR 法も今回開発した。

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、各植物特異的な遺伝子領域を標的として PCR-RFLP 法の検討を行ってきたが、本年度は、実際の中毒事例から回収した植物サンプルに適応してその有用性を確認した。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

植物性自然毒を含む食品、あるいは食品への有毒な植物・きのこの混入に関連した、事例、規制、消費者への注意喚起等に関して海外の情報を調査した上で、食品、特に輸入品に含まれる恐れのある自然毒を特定し、今後我が国において注意を向けるべき食品及び自然毒について検討することを目的とした。

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。

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* 130 菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株 13 株、鶏肉由来株 35 株、豚肉由来株 28 株、牛肉由来株 22 株、水産食品由来株 17 株、その他の食品由来株 13 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 (ATCC19115 株) 1 株であった。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の改正版にしたがって、PFGE 解析を実施した。制限酵素は *ApaI* と *AscI* を用いた。

また、2014 年に発生した海外におけるリステリア症の集団事例について、国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部が発表している食品安全情報等を基に、情報を収集した。

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。

きのこの定性リアルタイム PCR 法を用いた検査法確立

クサウラベニタケ（分類した 3 系統）およびウラベニホテイシメジに対する検査法については、上記きのこに加えて、特異性の検討のために市販の食用きのこ 6 種（シイタケ、マイタケ、ブナシメジ、エノキタケ、マッシュルーム、なめこ）も用いた。抽出は DNeasy Plant mini kit を用いて行った。リアルタイム PCR に用いるプライマーおよびプローブは、4 色マルチプレックス用に蛍光色素として FAM、VIC、Texas-Red、Cy5 を用いて食用と毒のクサウラベニタケ 3 系統を同時に検出できるようにした。また、検査の際の陽性対照プラスミドをそれぞれ作成した。リアルタイム

PCR 法の PCR 反応効率および検出限界（LOD）を求めた。

ツキヨタケおよび国内で収集もしくは購入したシイタケ、ヒラタケ、ムキタケに対する検査法についても同様に検討した。ツキヨタケ検出用プローブには FAM で標識した MGB プローブを用いた。

また、昨年度予備検討を行った、ツキヨタケおよび食用シイタケ、ヒラタケ、ムキタケを判別するための PCR-RFLP 法について、加熱加工された食品残渣からの検査できるように、標的配列を短くした short-PCR-RFLP 法を今回確立した。

食中毒事例の多い植物の DNABarcoding 法を利用した鑑別法の活用

青森県で発生した高等植物チョウセンアサガオによる食中毒の現地調査を行った。聞き取り調査とともに、サンプルを持ち帰り、*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* intergenic spacer 領域の DNA 配列のシーケンシング解析および BOLD システムによる判別を行った。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

EU の食品及び飼料に関する緊急警告システム（RASFF：the Rapid Alert System for Food and Feed）のデータ（2014 年 12 月 25 日までの通知）を対象に、食品中の自然毒が問題になった事例、並びに有毒な植物・きのこが実際に食品へ混入した事例を調査した。また、食品中に含まれる又は混入する可能性がある自然毒に関する規制、消費者への注意喚起等について、各国政府の食品安全担当機関などの公的機関による公表資料を中心に調査した。ただし、

かび毒及び菌類が産生する有毒物質（例：
麦角アルカロイド）は対象外とした。

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

今年度を中心に海外で発生した食中毒事例の中で、複数国が関連した事例を調査した。サルモネラについて、2013-14年にかけて発生したチアパウダーによる米国およびカナダの事例は同一事例である。本事例では複数の血清型によって食品が汚染されていた。赤痢菌に関して、2014年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は34株であった。うち、輸入例は25株で、東南アジア14株、南アジア10株、東アジア1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。カンボジア輸入例については、過去1-2年ほどの傾向と同様、南アジア由来株と近縁の型となった。2014年10月にインドツアーによる事例が発生し、関連と推定される株が2株送付されたが、互いに一致した。現在 *S. sonnei* MLVAデータベースは900株ほどになっており、感染地域ごとに整理していく必要がある。データ数が少ない地域もあり、また、カンボジアのように傾向に変化が見られる国もあることから、引き続きデータベースの厚みを増していく必要があると考えられる。

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。

食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *ApalI* 切断による PFGE 解析と *AscI* 切断による結果を比較した。*AscI* を用いた場合の系統樹は、*ApalI* を用いた場合と全体的には同じような結果が得られたが、*AscI* を用いた場合の方が菌株の相同性が高くなる傾向にあることが示された。また、同一食品由来株で異なる血清型の菌株が分離される例が3例あり、血清型が同一でも2菌株間の相同性が低い例も6例見られた。どちらの制限酵素を用いた場合でも、食品由来株は血清型によりクラスターが大別されることが示されたが、患者由来株においては、必ずしも食品由来株による血清型ごとのクラスターと一致しないことが示された。今回の解析では、明太子由来株、鶏肉由来株、食肉製品由来株において患者由来株と高い相同性を示した株が見られた。これらのうち、食品由来株と患者由来株で2種類の PFGE パターンと血清型の全てが完全に一致しているものはなかった。一方、フランス産チーズ、マグロすきみ及びびいくら由来の3菌株が他の菌株と大きく離れたパターンを示しており、極めて独自性の高いクローンであることが明らかとなった。

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

1) INFOSAN Emergency 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る。そのうち、

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、月平均 1.25 件のアラートが発せられる。

平成 26 年度の INFOSAN アラート

平成 26 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次の 2 件発せられた。

事例 1

カナダ産の有機発芽チア (chia) の種子の粉末を含む種々の製品により、アメリカ及びカナダにおけるサルモネラ症アウトブレイク

- ・ 日時：6 月 6 日, 2014
- ・ 関係国：カナダ、米国、バーレーン、アイスランド、インド、シンガポール、スロベニア
- ・ 食品カテゴリー：特殊栄養食品
- ・ 汚染食品：有機発芽チア (chia) の種子の粉末を含む種々の製品
- ・ 報告された疾病：27 人の *Salmonella* Newport 及び Hartford 患者報告 (カナダ)
- ・ 病原体：*Salmonella* Newport 及び Hartford

事例 2

Listeria monocytogenes に汚染された Bidart Bros.社(ブランド名:Happy Apple, Carnival, 及び Merb's Candies) のリンゴを使用して市販用に製造・包装されたキャラメルリンゴ (caramel apples: 写真参照) によるアウトブレイク

- ・ 米国の 12 州から報告された患者計 35 人。患者の発症日は 2014 年 10 月 17 日 ~ 2015 年 1 月 6 日。
- ・ 食品カテゴリー：野菜果実
- ・ 汚染食品：リンゴ、キャラメルリンゴ
- ・ 報告された患者数：米国 32 人、カナダで同一 PFGE パターン 2 人
- ・ 病原体：*Listeria monocytogenes*



また、INFOSAN Emergency を通じ、欧州の Rapid Alert から連絡のあった、*E.coli* 026:H11 with eae gene (coding for intimine) で汚染されたフランス産の未殺菌山羊乳を用いたチーズ "Crottins de Chavignol" が我が国に流通しているとの情報提供があった。

シガトキシンをコードしている *stx* 遺伝子はこれらの分離株から特定されていないが、大腸菌は *stx* 遺伝子を容易に得たり、失ったりすることが示されており、*eae* 陽性の *E. coli* の分離株は容易に *stx* 遺伝子を得て病原性になり得ることと考えられている。

2011.12 及び 13 年の INFOSAN 活動報告書をレビュー

通報原因となったハザードとしては例年通り *Salmonella* spp. が最も多く、次いで *Listeria monocytogenes*、A 型肝炎ウイ

ルスであり、過去 2 年間多かった、*Clostridium botulinum* 及び *Escherichia coli* は 3 件であった。

欧州の RASFF の解析

その中でも特筆すべき事例は、スウェーデンで 2 名が、EHEC 特有の症状を呈し、調査の結果、スウェーデンの施設で製造されたハンバーガーの喫食が原因。当該ハンバーガーはオランダのカット工場でカットされた原材料を使用、牛肉はハンガリー、ラトビア、ポーランド、英国等の牛肉を用いてカットしていた。オランダは当該カット工場から牛肉が出荷されたフランス、英国、フィンランド、ドイツ等にも警告。このアウトブレイクの前にデンマークで同じ血清型の VTEC による患者 13 名、うち 8 名が HUS を呈する食中毒が報告されていたが、このスウェーデンの事例との関連性は明らかにできなかった。

動物性食品以外では野菜果実の通報が多く、そのほとんどはサルモネラ属菌によるものであった。継続的に英国からバンラデシュ、インド及びタイ産の paan leaves (パーン) 中のサルモネラの通報が多かった。RASFF から日本政府に対し、汚染食品が流通していると通報があった事例は 4 件、日本産の食品が通報対象になったのは 10 件であった。

きのこの定性リアルタイム PCR 法を用いた

検査法確立

PCR-RFLP 法は、簡便法で、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、検査の裾野を拡大する意味でも重要である。一方で、確定法としてリアルタイム PCR を用いた方法を整備すれば、上記検査法で判定ができなかった場合にも最終確認が可能となり結果のさらなる信頼性の向上につながることから検討した。

(1) クサウラベニタケには、他に 2 つの近縁種が毒でありこの 3 系統および食用ウラベニホテイシメジ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。それぞれ特異的に検出可能であり、検出限界(LOD)は 20 コピー付近であった。

(2) 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、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケを含む市販食用きのこには交差反応しない、ツキヨタケ特異的な検出が可能であることが明らかになった。検出限界は、別途構築した標準プラスミドを用いた検討から数百コピー程度であった。

また、いずれの場合も PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent によって抽出した簡易抽出 DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR を行った場合も、抽出キットを用いて DNA 精製した場合と同様の結果が得られ、迅速なリアルタイム定性リアルタイム PCR 法としても期待されることが示唆された。

高等植物による食中毒情報の収集と遺伝子鑑別法の適応

本年度は、青森県で発生した患者 2 名によるチョウセンアサガオによる食中毒の現地調査を行った。八戸保健所は、青森県産業技術センター野菜研究所によりチョウセンアサガオと推定した。本検体をこれまでに開発した遺伝子判別法を用いて同定を試みた。当該植物から抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR-RFLP 法を適応するとともに、*rbcL*(部分断片)、*matK*(部分断片)および *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を PCR にて増幅後、DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をクエリーとし、DNA データベース (BOLD Systems, GenBank/ DDBJ/ EMBL) を用いたところ、食中毒原因植物はナス科植物 (ヨウシュチョウセンアサガオ) であると推定された。本遺伝子鑑別法が、実際の中毒原因植物にも有効に適用できることが確認できた。

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

本研究では、海外において食品中の自然毒が問題になった事例、有毒な植物・きのこが食品へ混入した事例として EU RASFF データベースの情報をもとに調査し、どのような自然毒や食品が問題になりやすいのかを特定した。その結果のうち自然毒を含む植物が問題になった事例、きのこが問題になった事例を解析した。

植物が問題になった事例は、1982 ~ 2014 年 12 月 25 日の通知として 157 件が確認できた。主なものは、シキミ (有毒成分: アニサチン)、トロパンアルカロイド含有植物、青酸配糖体含有植物、イヌサフラン (コルヒチン)、ピロリジジンアルカ

ロイド含有植物、イヌハウズキ (グリコアルカロイド)、高濃度のクマリン、松の実による味覚異常 (通称パインマウス)、トウゴマ (リシン) などであり、件数ではトロパンアルカロイド含有植物、青酸配糖体含有植物、高濃度のクマリンが多かった。ソバ及びソバ粉へのトロパンアルカロイドの混入については過去に EU 内で食中毒が発生して問題になっており、フランス食品衛生安全庁 (AFSSA: 現フランス食品・環境・労働衛生安全庁) はソバ粉についてアトロピン及びスコポラミンの基準値が必要であると提案している。一方、青酸配糖体関連の大部分はビターアプリコットカーネルのアミグダリンに関する通知であり、混入というよりも製品そのものが問題の事例だが、中毒も発生しているため自然毒関連の問題としては注意が必要である。さらにビターアプリコットは健康志向 (がん予防) を目的とした製品として販売されていることも気に留めておく必要がある。

きのこが問題になった事例は植物よりも少なく 13 件のみであった。その中で影響地域が広がったのはルーマニア産の冷凍セイヨウタマゴタケ (*Amanita caesarea*) にタマゴテングタケが混入した事例で、通知したスペイン以外にポルトガルや米国に対しても通知されていた。他に、中国産の乾燥きのこへのテングダケの混入などが通知されていた。きのこの冷凍品や乾物は輸入されることもあると考えられるため、まれではあるものの毒きのこが混入する可能性があることに留意する必要がある。

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。

また、INFOSAN や RASFF の提供する情報を継続的にモニターし、収集解析することも重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担報告書に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 26 年度分担研究報告書

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

研究分担者 泉谷秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部 第二室 室長）

研究要旨

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。本年度は米国ではチアパウダーを原因食品とするサルモネラの食中毒事例などが発生した。また、昨年わが国で発生した輸入食材を推定原因食品とするナグビブリオの食中毒事例株についてさらに分子疫学的解析の検討を行った。

A. 研究目的

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

サルモネラは、国内外で多くの食中毒の原因となっている。わが国では 1990 年代にサルモネラ食中毒のピークがあったが、現在でもなお、細菌性食中毒発生の原因物質別で上位を占めている。サルモネラは 2,500 種以上の血清型から成り、海外でも多様な原因食品を介して多くの食中毒が発生している。とくに、サーベイランス体制が確立されている欧米からの報告が多い。

細菌性赤痢は赤痢菌に汚染された食品や水を介して感染する。国内の患者発生数は年間 100 名前後であり、大半は海外渡航者による輸入例である。しかしながら、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。また、昨年度は発生したナグビブリオの食中毒関連株について、分子疫学的解析手法の検討も行った。

B. 研究方法

海外事例の情報収集は論文雑誌・米国

CDC、欧州 CDC からの資料などを参考にした。

赤痢菌およびナグビブリオ分離株に関しては、パルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析 (multilocus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA) を使用した。得られたデータを BioNumerics ソフトウェアに取り込み、データベースの構築、並びにクラスター解析を行った。

C. 研究結果および考察

今年度を中心に最近海外で発生した食中毒事例の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例を表 1 にまとめた。2013-14 年にかけて発生したチアパウダーによる米国およびカナダの事例は同一事例である。本事例では複数の血清型によって食品が汚染されていた。2011-13 年にかけて発生した七面鳥肉による欧州での事例は、同時期に *Salmonella* Stanley 感染事例が 710 例発生し、PFGE パターン一致例が 234 例であった。2011 年ノルウェーの事例では、原因物質が *Shigella sonnei* であり、同時期に発生した 2 件の事例の菌株及び疫学情報の解析から輸入バジルが原因食とされた。本食品はオランダを通じでイスラエルから輸入されたものであった。

2013 年に発生したナグビブリオ O144 を原因物質とする食中毒事例関連株について、コレラ菌で使用されている 7 か所の遺伝子座を用いて MLVA を実施した。結果として、おそらく血清型ごとに分かれていると推測されるが、患者株の大半を占め、起因菌と考えられた O144 株は全て同じタイプであ

った (図 1)。また、PFGE が同株と一致した食品株も同じ MLVA 型であった。一方その他のマイナーな患者株および食品株のほとんどは異なる型を示した。これは PFGE の結果とほぼ一致し、本事例関連株に限っては MLVA も有用であると考えられた。ただし、今後種々のナグビブリオに本法が対応可能かどうかについては検討すべきであろう。

2014 年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は 34 株であった。うち、輸入例は 25 株で、東南アジア 14 株、南アジア 10 株、東アジア 1 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。カンボジア輸入例については、過去 1-2 年ほどの傾向と同様、南アジア由来株と近縁の型となった (図 2)。2014 年 10 月にインドツアーによる事例が発生し、関連と推定される株が 2 株送付されたが、互いに一致した。

現在 *S. sonnei* MLVA データベースは 900 株ほどになっており、感染地域ごとに整理していく必要がある。データ数が少ない地域もあり、また、カンボジアのように傾向に変化が見られる国もあることから、引き続きデータベースの厚みを増していく必要があると考えられる。

D. 結論

近年の食および人のグローバル化により、海外から様々な食品および人が国内に入りやすくなっている。と同時に、食中毒菌により汚染された食品が入ってくる機会も増加していると考えられる。昨年度のナグビ

ブリオの事例など、これまで国内ではあまり発生しなかった菌種による食中毒事例について MLVA の有効性を検討し、一定の成果は得られた。今後の動向によっては、種々の事例に対応できるような試験系の構築を検討する必要があるだろう。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

論文発表

Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-52} -carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 2014 Dec;58(12):7545-7.

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
2014年1-8月	<i>Salmonella</i> Newport, Hartford, Oranienburg	チアパウダー	米国	31		カナダでも発生
2013年10月- 2014年6月	<i>Salmonella</i> Newport, Hartford, Oranienburg, Saintpaul	チアパウダー	カナダ	63		米国でも発生
2011-2013年	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥肉	欧州	234		PFGE一致例
2011年10月	<i>Shigella</i> <i>sonnei</i>	輸入バジル	ノルウェー	46		イスラエルからの輸入食品

図1 .ナグビブリオによる食中毒事例関連株のMLVAの結果。下は *NotI*-PFGE 解析の結果。
紫が患者株、赤が食品由来株。

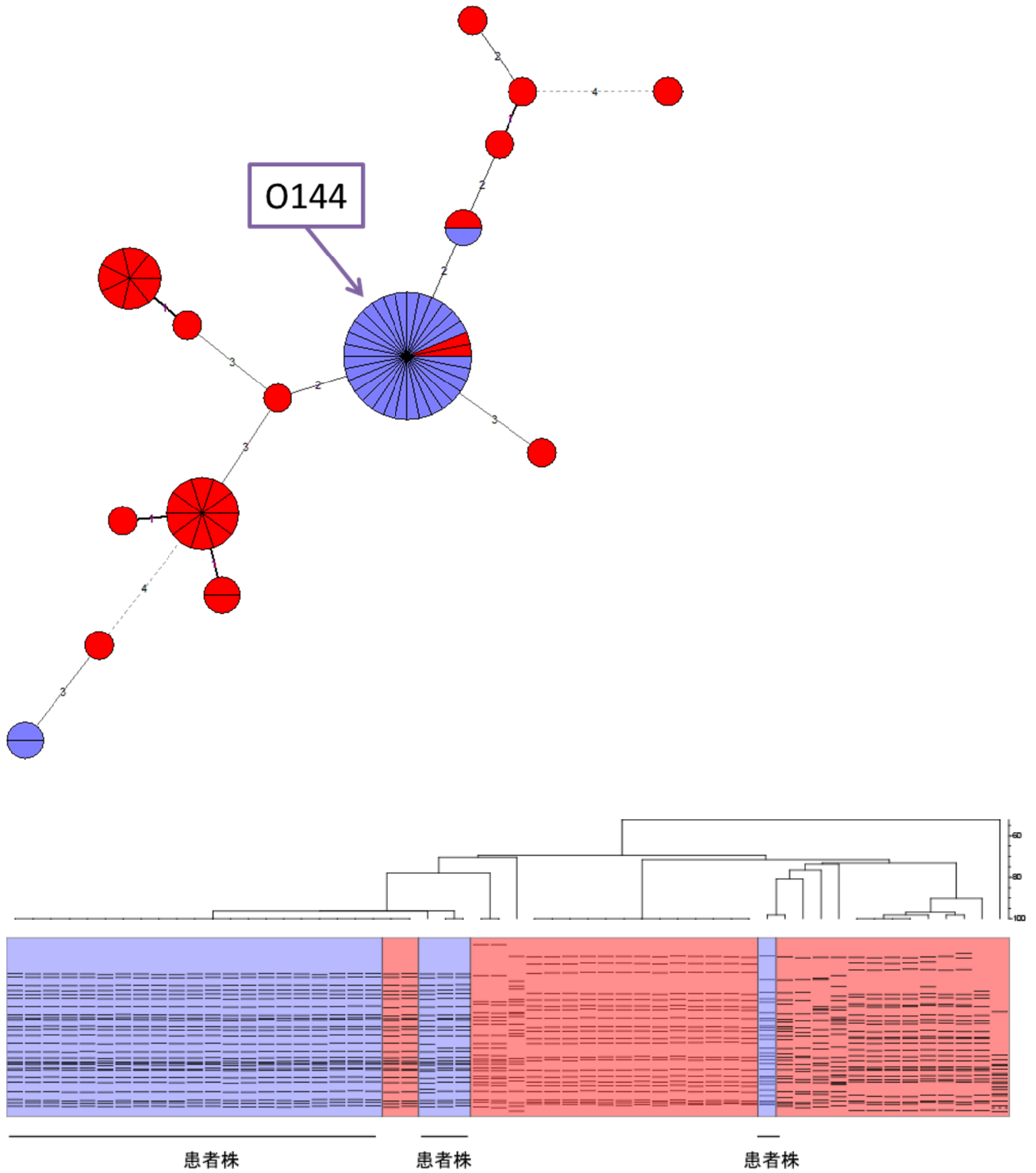
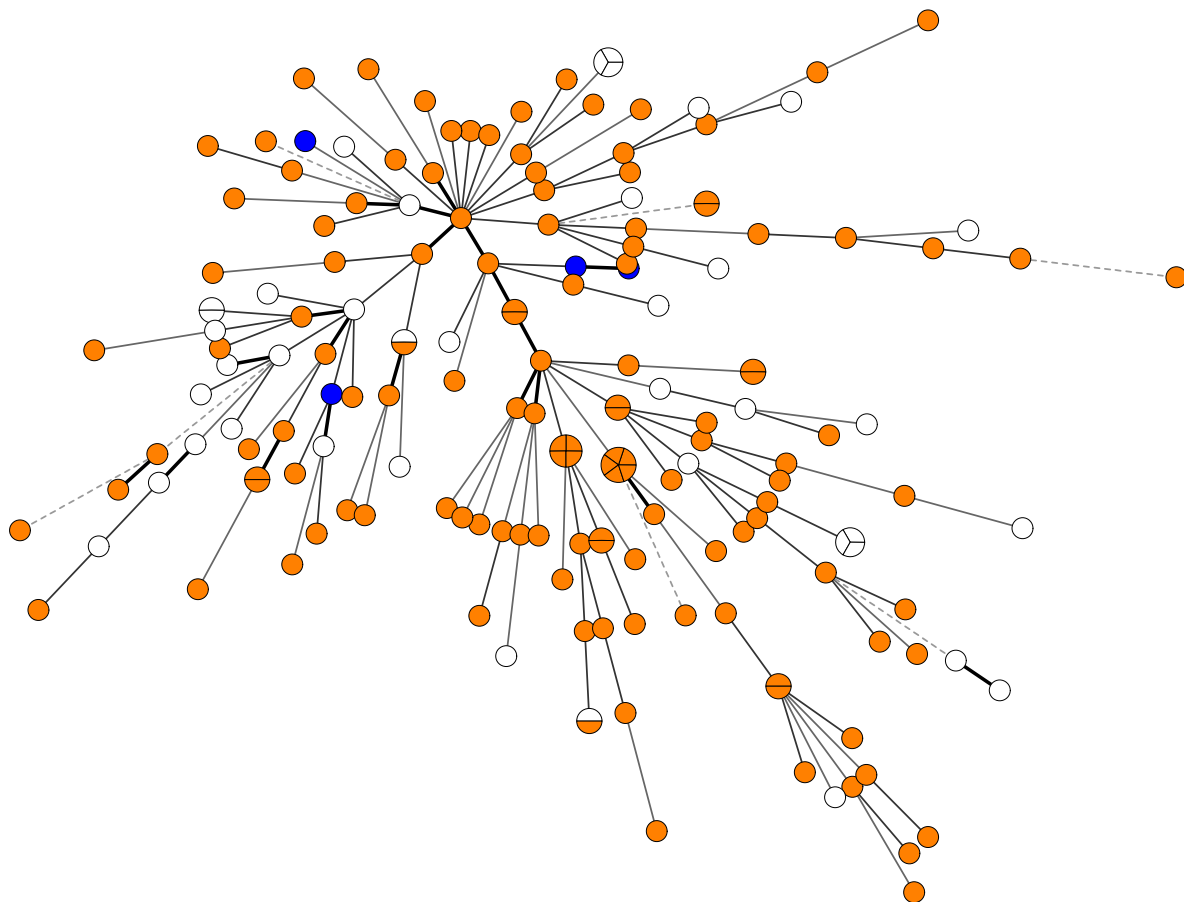


図2 . *Shigella sonnei* MLVA - MST の一部。青、2013-2014年カンボジア渡航歴ありの患者由来株。オレンジ、南アジア渡航歴ありの患者由来株。



各国におけるリステリア症発生状況 及び *Listeria monocytogenes* 菌株の分子疫学的解析に関する研究

研究分担者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 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

人に脳脊髄膜炎、流死産及び敗血症を引き起こすリステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes*（リステリア）の主要な感染経路は、本菌に汚染された食品であることが明らかとなっている。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存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乳製品、水産加工品、野菜等様々な食品から本菌の検出が報告されている。欧米諸国では数年に一度の頻度でリステリア症の集団感染が起こっており、その原因食品も食肉製品や乳製品のみならず、セロリ、メロン、リンゴ菓子等々である。現時点では、日本国内においてリステリア症の集団感染事例はほとんど見られていないが、散発事例の発生件数は海外と比較して極端に低いわけではない。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、国内の散発事例における原因食品の同定は大変困難である。

本研究では、平成 24 年度より海外から侵入しうる感染症の原因菌として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を用いた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行い、国内産食品や輸入食品および患者由来株のデータを蓄積すると共に、得られた情報の解析を行った。

A. 研究目的

重篤な食品媒介感染症であり人獣共通感染症でもあるリステリア症は、発症時の致命率が 20 - 30%にも及び、主な症状は脳脊髄膜炎、敗血症である。また、妊産婦の感染時には流死産を引き起こすことが知られている。その原因菌である *Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は、動

物の腸管内、土壌、河川水や食品工場、冷蔵庫内など様々な環境に存在している。また、本菌は高度な環境抵抗性をもち、-1 もの低温下での低温増殖能、20%もの高食塩濃度下での生存能を有し、食品の一次汚染並びに加工・保存過程での二次汚染の制御が困難である。ヨーロッパ諸国では数年に一度の頻度で、北米ではほぼ毎年リステ

リア症の集団事例が見られている。2008年にはカナダで、1工場で製造されたローストビーフ等の食肉加工品数品目を原因食品とする集団事例により、57名が発症、うち23名が死亡した。平成23年9月には米国でカンタロープメロンを原因食品とした複数の州にまたがる集団事例が発生し、146名の患者数、うち30名の死亡が報告された。また、デンマークでは2013年から2014年に冷製肉を感染源とする患者数41人、死者17人に上る集団事例が発生し、2014年に米国ではもやしやリンゴ菓子製品等を原因とした集団事例が発生している。その他、過去の事例における原因食品としてはナチュラルチーズ等の乳製品、スモークサーモン等の水産物及びその加工品、ローストビーフ等の食肉及びその加工品、サラダ等様々な食品が報告されている。国内においては、リステリア症は報告義務のない疾患であり、2008 - 2011年の患者数は感染症研究所による院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた調査で、307例で、人口100万人当たりの推定罹患率は約1.6人であった。一方、日本国内では集団事例はほとんど報告されておらず、2001年の国内産ナチュラルチーズを原因食品とする1例が確認されているのみである。リステリア症は健康成人には主に下痢や風邪様症状を主症状とする非侵襲性となるが、高齢者、基礎疾患を持つ人、妊産婦等のハイリスクグループには流産、髄膜炎、敗血症等を引き起こす侵襲性リステリア症を引き起こす。潜伏期間は前者で数日、後者は長い場合には3ヶ月にも達する。そのため、侵襲性リステリア症の散発事例で原因食品が特定されることはほとんどない。また、過去の調査により、国内で流通する

食品がある程度本菌に汚染されていることが明らかとなっている。分担研究者らが実施した平成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、様々な由来のリステリア菌株の分子型別データを収集、蓄積することにより、国内発生事例の原因食品同定に役立てることを目的として、研究室保有の輸入食品、国内産食品及び患者由来株計130株を用いた*L. monocytogenes*のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による分子疫学的解析を実施した。

B. 研究方法

1. 検体

日本国内で分離された*L. monocytogenes* 130菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株13株、鶏肉由来株35株、豚肉由来株28株、牛肉由来株22株、水産食品由来株17株、その

他の食品由来株 13 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 (ATCC19115 株) 1 株であった (表 1)。それらのうち、牛肉は 11 検体から、豚肉は 14 検体から各 2 株、鶏肉は 12 検体から各 2 株分離されたものを用いた。血清型の内訳は、1/2a が 64 株、1/2b が 21 株、1/2c が 25 株、4b が 13 株、その他の血清型が 6 株、血清型不明株が 2 株であった。

2. PFGE による分子型別

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の改正版にしたがって、PFGE 解析を実施した。制限酵素は *ApaI* と *AscI* を用いた。得られた画像は BioNumerics ソフトウェア (ver.6.1) を用いて解析した。系統樹作成には、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean、UPGMA 法) を用い、tolerance は 1.0 に設定した。

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

2014 年に発生した海外におけるリステリア症の集団事例について、国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部が発表している食品安全情報等を基に、情報を収集した。

C. 研究結果

1. PFGE による分子型別

食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *ApaI* 切断による PFGE 解析の結果を図 1 に、*AscI* 切断の結果を図 2 に示した。*AscI* を用いた場合の系統樹は、*ApaI* を用いた場合と全体的には同じような結果が得られたが、*AscI* を用い

た場合の方が菌株の相同性が高くなる傾向にあることが示された。同じ食品由来の 2 株の解析結果の比較においても、*ApaI* を用いた場合の方が *AscI* を用いた場合よりも高い相同性が検出される傾向が示された (表 2)。また、同一食品由来株で異なる血清型の菌株が分離される例が 3 例あり、血清型が同一でも 2 菌株間の相同性が低い例も 6 例見られた。また、どちらの制限酵素を用いた場合でも、食品由来株は血清型によりクラスターが大別されることが示された。しかしながら、患者由来株においては、必ずしも食品由来株による血清型ごとのクラスターと一致しないことが示された (図 1 及び 2)。また、わずかではあるが食品由来株においても血清型ごとのクラスターの中に別の血清型の菌株が分類されるものがあった。今回の解析では、明太子由来株、鶏肉由来株、食肉製品由来株において患者由来株と高い相同性を示した株が見られた。これらのうち、食品由来株と患者由来株で 2 種類の PFGE パターンと血清型の全てが完全に一致しているものはなかった。また、フランス産チーズ、マグロすきみ及びいくら由来の 3 菌株が他の菌株と大きく離れたパターンを示しており、極めて独自性の高いクローンであることが明らかとなった。

2. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

2014 年に諸外国で発生した患者数が 3 名以上のリステリア症集団事例は 6 例見られた。原因食品は、3 例が乳製品、1 例がデリミート、1 例が野菜、1 例が果物であった (表 3)。発生国は米国、カナダ、デンマークであった。

D. 考察

本研究において、国内患者由来株 13 株、食品由来株 115 株、環境由来株 1 株及び標準菌株の計 130 菌株について PFGE による解析を実施した結果、制限酵素 *ApaI* を用いた解析は分解能が高く、*AscI* を用いた解析は菌株間の類似性の検出に優れていることが明らかとなった。これは、リステリアゲノム中の *ApaI* 切断部位が *AscI* 切断部位よりも多く存在することに起因していると思われた。どちらの制限酵素を用いた解析でも、食品由来株は血清型と高い相関をもって分類されることが示された。一方、患者由来株は異なる傾向を示したため、これらの菌株について PCR 法などを加えた血清型の詳細な再検討が必要であるとともに、患者由来株について更にデータを蓄積する必要があると思われた。また、牛肉、豚肉及び鶏肉において、同一検体から分離された同一血清型の複数の菌株において、PFGE パターンが異なる例が複数見られ、一つの食品が複数のクローンに汚染されている例がしばしば存在することが示された。このことから、食中毒発生時の原因食品究明時には、疑い食品から分離された本菌の複数のクローンについて血清型別及び分子疫学解析をする必要があることが示唆された。以上の結果から、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の分子疫学的データを蓄積し、解析していくことで、散发例を含むリステリア症事例の原因食品を推定し、検疫強化や消費者への情報提供を通じて、食品媒介リステリア症の発生を低減しうる可能性が示唆された。そのためには、より多くの食品由来株や患者由来株について、多面的な分子疫学的解析を行い、国内

の多くの試験所からの情報を統合、データベース化するとともに、国際的な情報の共有が必要であると思われた。また、国際的にリステリア症の集団事例の原因物質は従来多かった動物性食品から、野菜、果物等多様な食品に広がってきており、国内への侵入経路として様々な食品を考慮に入れる必要性が高まっていると思われた。

E. 結論

本研究の結果、リステリアの PFGE 解析において、制限酵素 *ApaI* を用いた解析は分解能が高く、*AscI* を用いた解析は菌株間の類似性の検出に優れていることが示された。これらのデータの継続的蓄積と有効活用により、米国等で行われているのと同様に、現在原因食品が特定されていない国内のリステリア症事例の原因食品を推定することが可能になると思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Yumiko Okada, Shuko Monden, Hodaka Suzuki, Akiko Nakama, Miki Ida, Shizunobu Igimi. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated from the imported and the domestic foods in Japan. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, (2015) Vol. 3, p70-73.
2. Sayaka Asahata, Yuji Hirai, Yusuke Ainoda, Takahiro Fujita, Yumiko Okada, Ken Kikuchi. Fournier's

gangrene caused by *Listeria monocytogenes* as the primary organism.

Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, (2014) In press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 . 使用菌株の由来と血清型

血清型	合計	鶏	豚	牛	水産物	その他	患者
1/2a	64	20	12	8	13	7	4
1/2b	21	7	7	1	1	3	1
1/2c	25	4	8	9	0	2	2
4b	13	3	0	4	2	1	3
その他	8	1	1	0	1	2	3
合計	130	35	28	22	17	15	13

表 2 . 同一食品由来の 2 菌株における PFGE パターンの相同性

由来食品	制限酵素	同一食品由来の 2 菌株間の相同性 (%)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
牛	<i>Apal</i>	89.4	97.6	50.7	100	100	96.3	92.2	100	59.9	90.1	95.9	-	-	-
	<i>Ascl</i>	98.7	100	46.8	98.7	100	98.7	100	93.1	54.1	100	100	-	-	-
豚	<i>Apal</i>	63.9	46.8	50.7	87	87	100	93.8	100	100	97.7	-	95.9	100	90.9
	<i>Ascl</i>	64.7	50.7	46.8	88.6	88.6	100	95	96.3	99.3	89.7	-	94.8	100	100
鶏	<i>Apal</i>	100	100	91.6	100	96.8	100	95.1	94.7	50.7	94.7	55.4	97.3	-	-
	<i>Ascl</i>	100	100	97.3	100	100	100	100	100	46.8	92.3	54.1	100	-	-

太字は 2 菌株間の血清型が異なるもの

表 3 . 2014 年に発生した主なリステリア症集団事例

	国名	発生時期	原因食品	患者数	死者数	母子感染
1	USA	2014.2	チーズ	8	1	2 組
2	デンマーク	2013.9 ~ 2014.8	デリミート	41	17	
3	USA	2014.6 ~ 8	もやし	5	2	
4	USA	2013.9 ~ 2014.8	チーズ	3	1	1
5	USA・カナダ	2014.10 ~ 12	キャラメルアップル	34	6	
6	USA	2015	チーズ及びサワークリーム	3	1	

図 1 . 制限酵素 *Aba*I を用いた PFGE 解析の結果 (1/3)

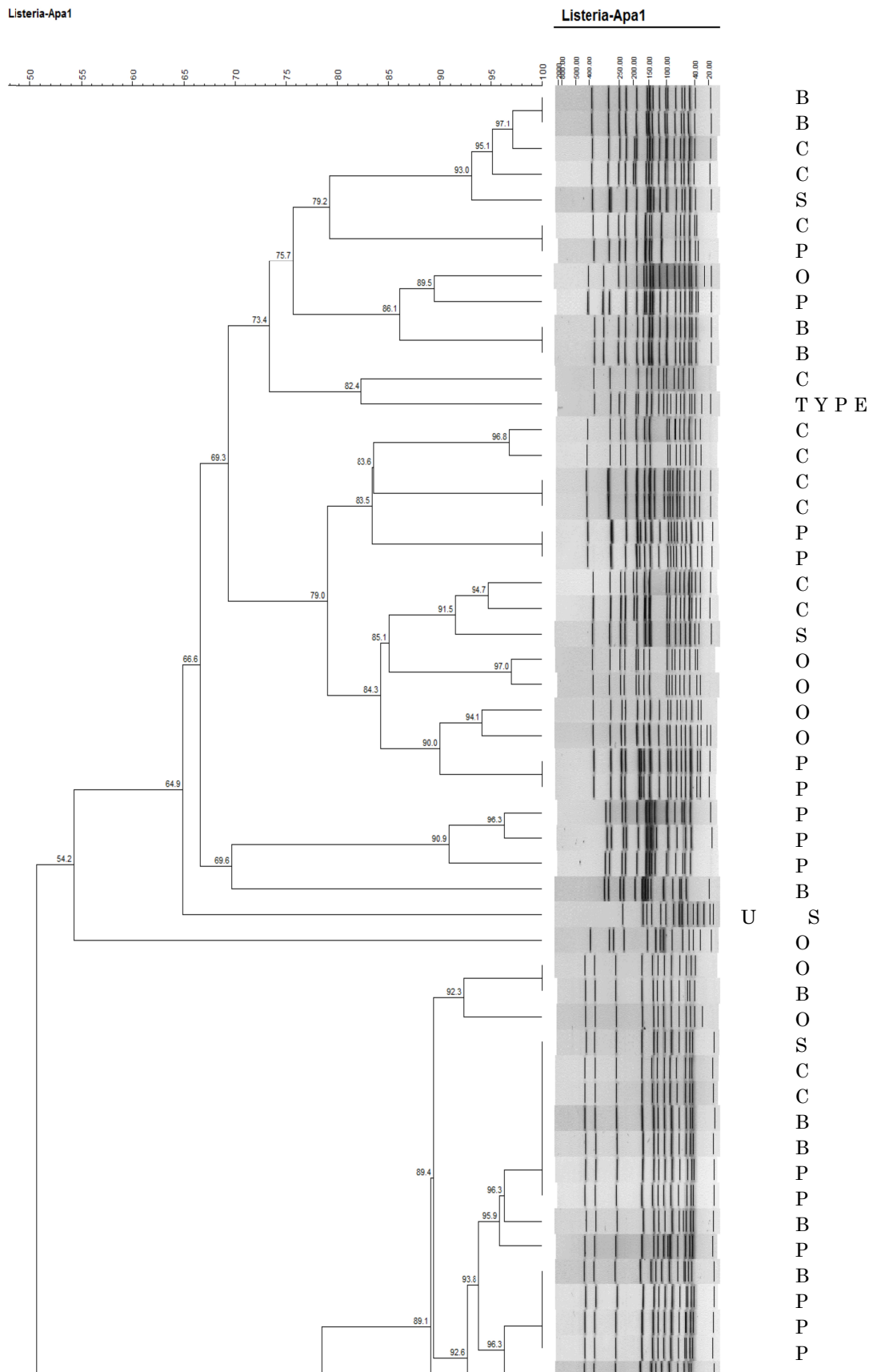


図 1 . 続き (2/3)

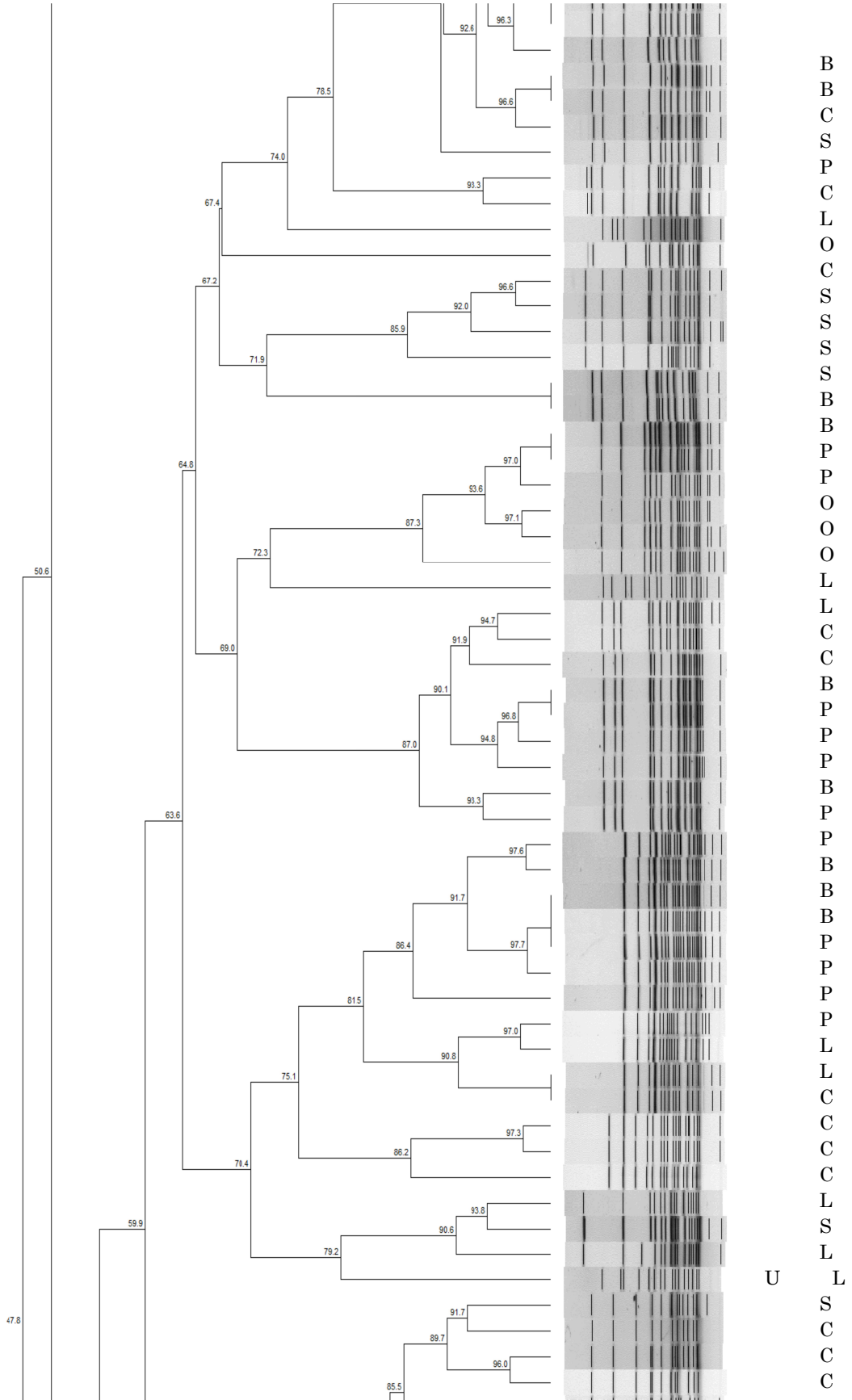
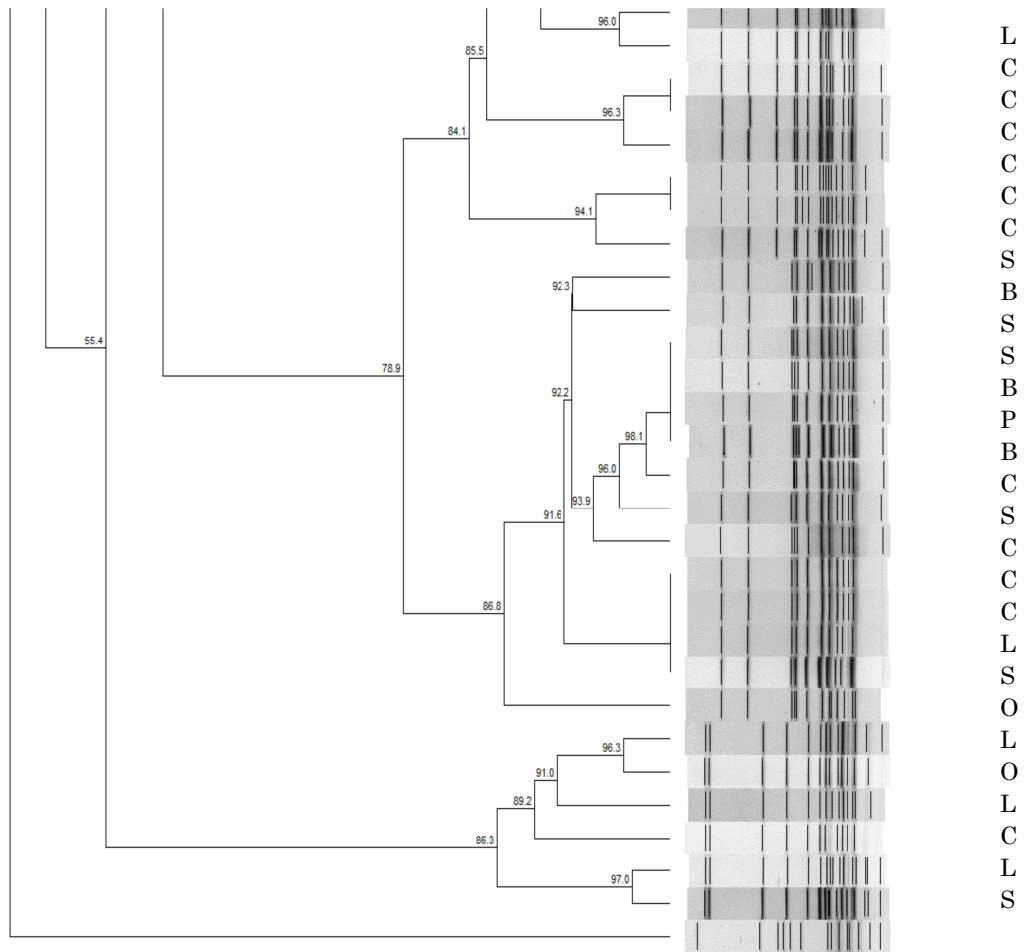


図1 . 続き (3/3)



C:鶏肉、B:牛肉、 P:豚肉、 S:水産食品、 O:その他、 L: 臨床、 TYPE:標準菌株
 : 血清型 1/2b、 : 4b、 : 3b、 : 4d、 : 1/2a、 : 1/2c、 : 3b、 U:不明

図2 . 制限酵素 *AscI* を用いた PFGE 解析の結果
(1/3)

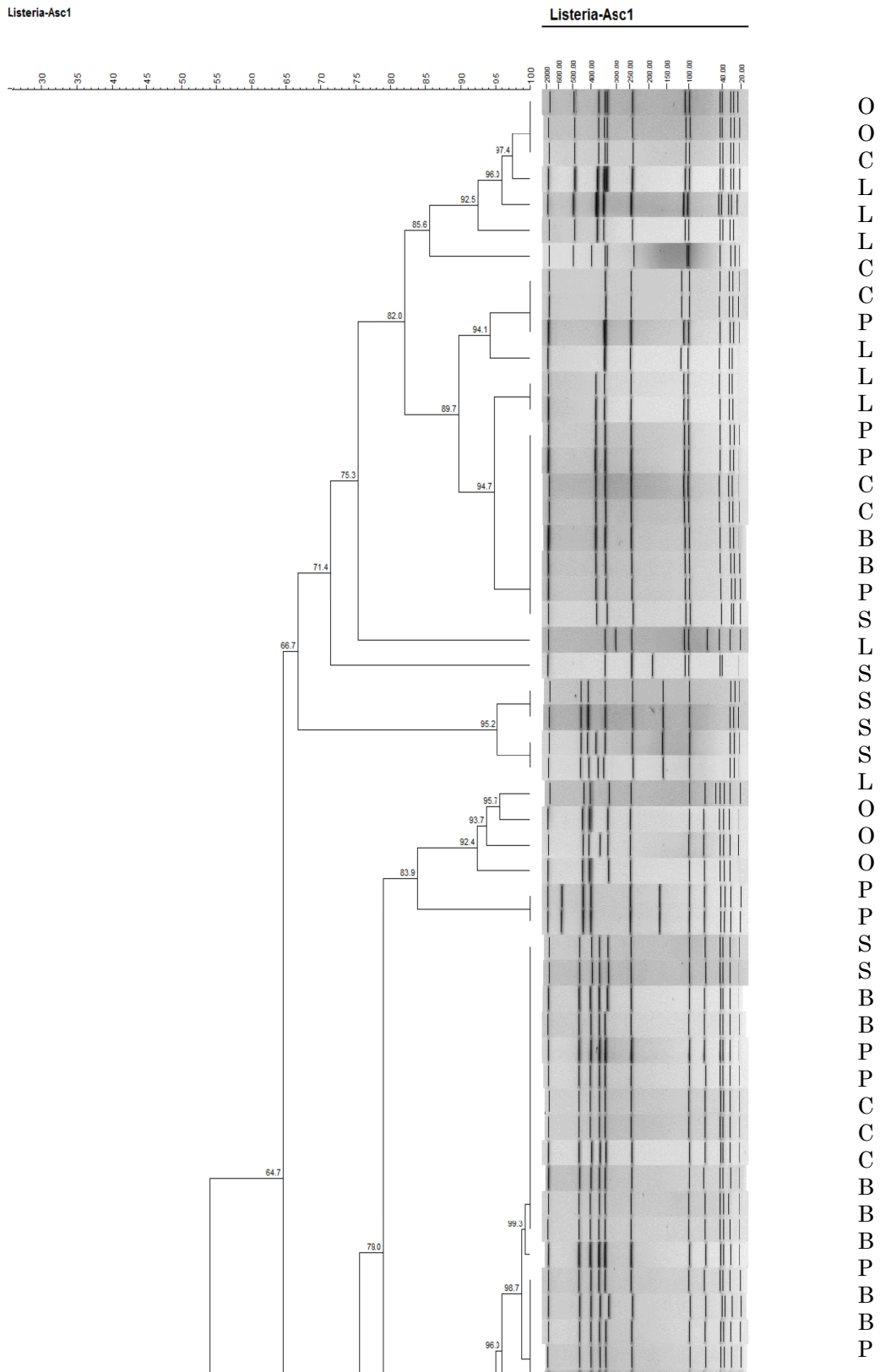


図 2 . 続き (2/3)

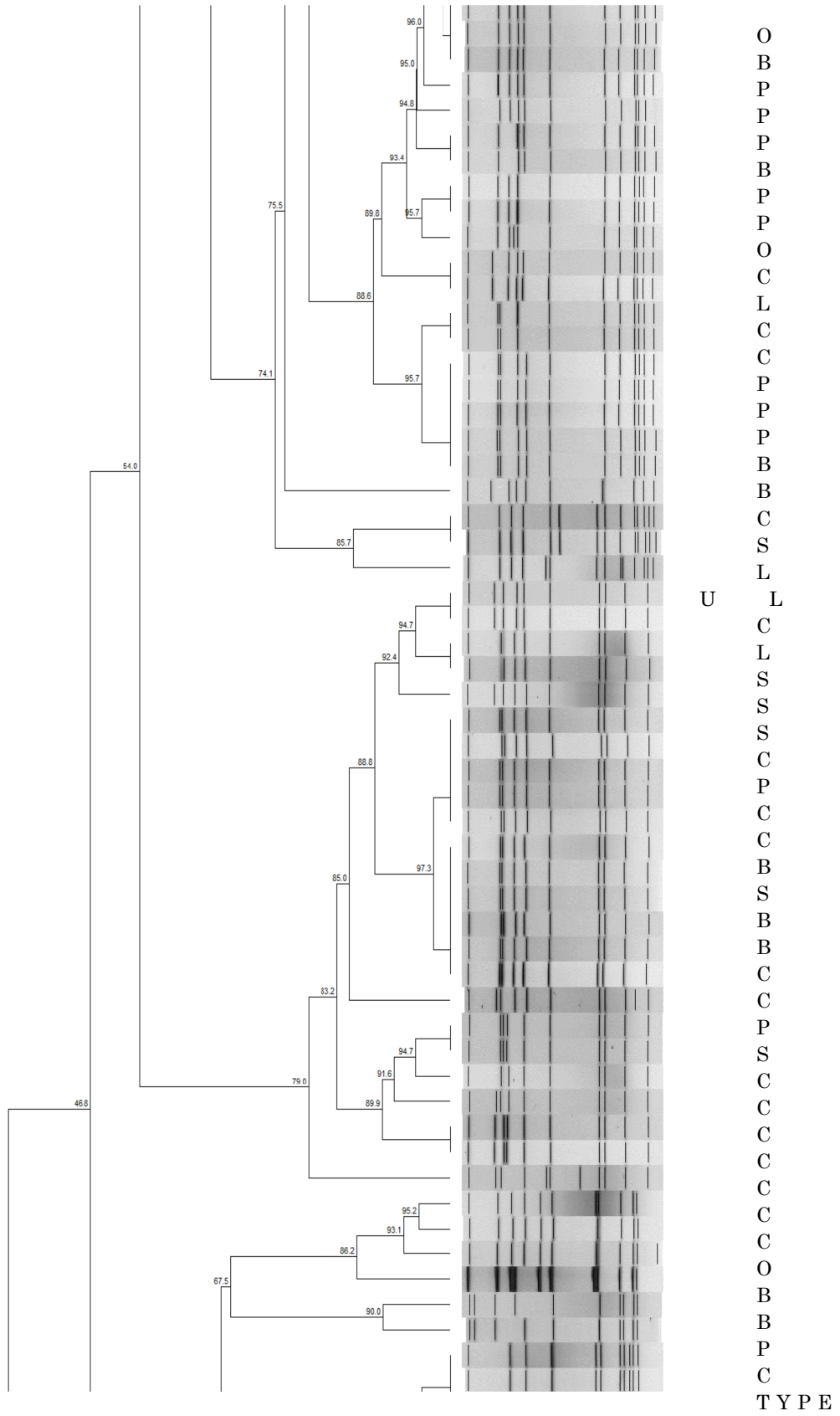
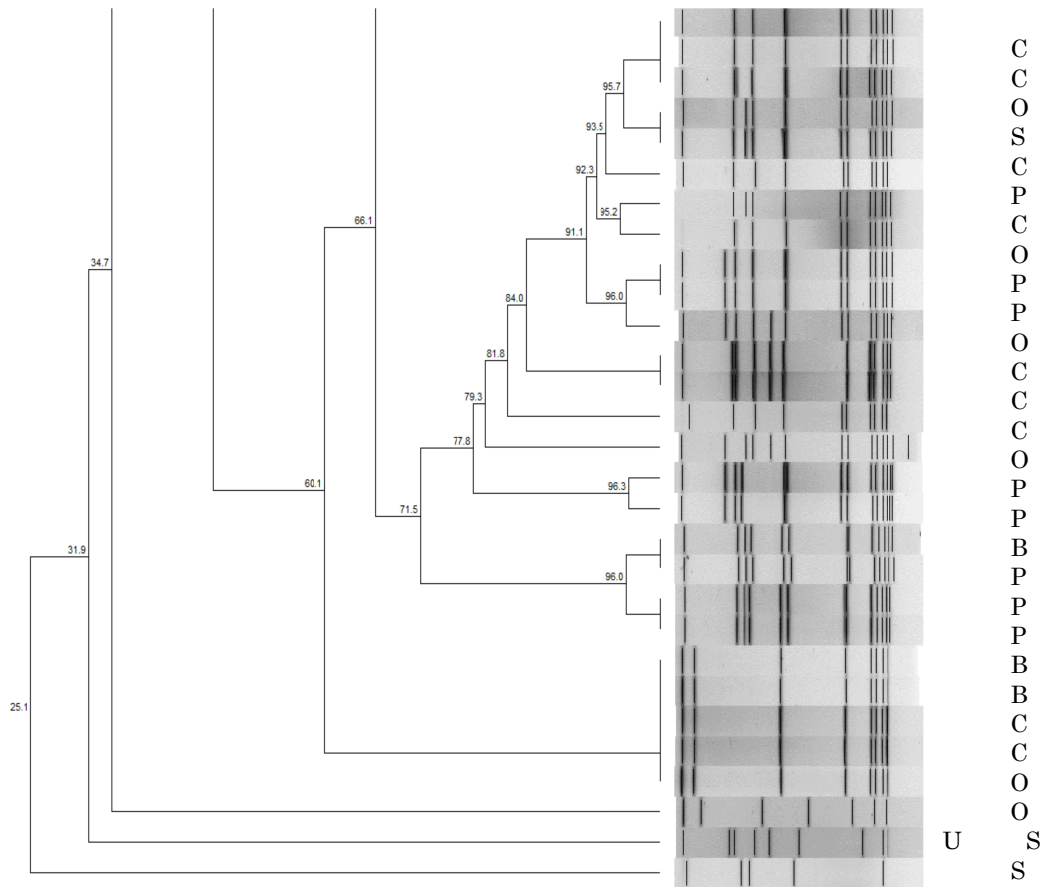


図 2 . 続き (3 / 3)



微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

研究分担者 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早く発見し、リスクを低減させるかについて検討した。

A. 研究目的

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 INFOSAN、欧州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。

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、製品のトレース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 26 年度の INFOSAN アラート

平成 26 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。

事例 1

カナダ産の有機発芽チア (chia) の種子の粉末を含む種々の製品により、アメリカ及びカナダにおけるサルモネラ症アウトブレイク

- 日時：6 月 6 日 2014 年
- 関係国：カナダ、米国、バーレーン、アイスランド、インド、シンガポール、スロベニア
- 食品カテゴリー：特殊栄養食品
- 汚染食品：有機発芽チア(chia)の種子の粉末を含む種々の製品

- 報告された疾病：27 人の *Salmonella* Newport 及び Hartford 患者報告 (カナダ)
- 病原体：*Salmonella* Newport 及び Hartford

事例 2

Listeria monocytogenes に汚染された Bidart Bros.社 (ブランド名：Happy Apple, Carnival, 及び Merb's Candies) のリンゴを使用して市販用に製造・包装されたキャラメルリンゴ (caramel apples: 写真参照) によるアウトブレイク

- 米国の 12 州から報告された患者計 35 人。患者の発症日は 2014 年 10 月 17 日 ~ 2015 年 1 月 6 日。
- 食品カテゴリー：野菜果実
- 汚染食品：リンゴ、キャラメルリンゴ
- 報告された患者数：米国 32 人、カナダで同一 PFGE パターン 2 人
- 病原体：*Listeria monocytogenes*



また、INFOSAN Emergency を通じ、欧州の Rapid Alert から連絡のあった、*E.coli* O26:H11 with eae gene (coding for intimine) で汚染されたフランス産の未殺菌山羊乳を用いたチーズ "Crottins de Chavignol" が我が国に流通しているとの情報提供があった。

シガトキシンをコードしている *stx* 遺伝子はこれらの分離株から特定されていないが、大腸菌は *stx* 遺伝子を容易に得たり、失ったりすることが示されており、*eae* 陽性の *E. coli* の分離株は容易に *stx* 遺伝子を得て病原性になり得ることと考えられている。

INFOSAN 活動報告書のレビュー

2011、12 及び 13 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	INFOSAN Emergency イベント		
	2011 年の数 : 46	2012 年の数 : 42	2013 年の数 : 44
Africa (AFRO)	2	2	0
Americas (AMRO)	22	19	17
Eastern Mediterranean (EMRO)	6	3	6
Europe (EURO)	21	27	30
South-East Asia (SEARO)	3	6	5
Western Pacific (WPRO)	17	19	16

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 1)

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	2013 年 44 件
アルコール飲料	2	1	1
動物用飼料	1	1	0
シリアル及びシリアルベースの食品	0	2	2
複合食品	4	0	0
動物由来の脂肪及びオイル	1	0	0
魚及びその他の海産食品	3	4	5
乳児用及び小児用食品	1	2	0
果実及びその製品	7	5	3
ハーブ、スパイス 及び 香辛料	3	3	2
豆類	1	0	0
食肉及びその製品	5	5	5
乳及び乳製品	3	6	7
ナッツ及びオイルシード	5	2	2
特殊栄養用途食品	3	3	3
スナック、デザート及びその他の食品	0	1	1
砂糖及び菓子	1	2	1

不明	2	2	3
野菜およびその製品	4	3	6

Emergency アラートが多い食品は 2013 年も、過去 2 年と同様、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 2)

Norovirus	0	1	1
<i>Salmonella</i> spp.	10	13	7
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	1	1
Schmallenberg virus	1	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	0	0
複数の Hazards	0	1	0

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	2013 年 44 件
African Swine Fever Virus	1	0	0
<i>Influenza A virus (H7N9)</i>	0	0	1
<i>Bacillus cereus</i>	0	1	0
<i>Brucella</i> spp.	2	1	0
<i>Clostridium botulinum</i>	7	4	3
<i>Clostridium sporoneges</i>	0	0	1
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	1	0
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0	1	0
<i>Datura stramonium</i>	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	6	4	3
Hepatitis A Virus	1	0	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	2	5

通報原因となったハザードとしては例年通り *Salmonella* spp. が最も多く、次いで *Listeria monocytogenes*、A 型肝炎ウイルスであり、過去 2 年間多かった、*Clostridium botulinum* 及び *Escherichia coli* は 3 件であった。

2. 欧州の RASFF の解析

2013 年の食中毒関連の通報としては 2012 年より増え 53 事例であった。

表 4 RASFF で微生物による食中毒でアラートが発せされた事例 (2013 年)

ハザード	食品	患者	原産国
Norovirus	活はまぐり	5	ポルトガル
Norovirus	カキ	8	スペイン
<i>Salmonella</i> Rissen	乾燥有機クロレラ	1	中国(英国経由)
ヒスタミン	マグロロイン	3	スペイン
ヒスタミン	マグロロイン	4	スペイン
Norovirus	チルド活カキ	9	フランス

Norovirus (group I&II)	チルド 活カキ	3	フランス	ヒスタミン	チルド イワシ	2	伊
ヒスタミン	冷凍 マグロ	4	ベトナム	HAV	冷凍 いちご	90	モロッコ、 エジプト (ベルギー で包装)
ヒスタミン	チルド マグロ ロイン	11	スペイン	<i>Clostridium perfringens</i>	豚骨付き 肉	2	伊
ヒスタミン	生鮮 マグロ	4	スペイン	<i>Salmonella Enteritidis</i>	卵	49	スペイン
ヒスタミン	チルド マグロ ステーキ	2	スペイン	Norovirus (G II)	カキ	9	仏
VTEC O157:H7	冷凍ハン バーガー	2	蘭、ポーラ ンド	HAV	?	16	アイルラン ド
Norovirus	チルド カキ	9	仏	?	卵	13	スペイン
Norovirus	カキ	1	仏	HAV	冷凍ベリ ーミックス	2	イタリア (原材料は チリ、ポー ランド、セル ビア、ス ウェーデン)
Norovirus (G I&G II)	チルド カキ	5	仏	<i>Clostridium botulinum</i>	アーモン ドピュレ	1	仏
Norovirus (G I&G II)	チルド カキ	10	蘭	<i>Listeria monocytogenes</i>	未殺菌 羊乳 チーズ	3	仏
Norovirus (G I&G II)	カキ	37	スペイン (蘭経由)	<i>Salmonella typhimurium</i>	加熱ハム	49	英国(原材 料はDK)
ヒスタミン	ツナ缶(オ リーブ油 入り)	1	原材料コー トジボアー ル、仏製	<i>Salmonella</i> spp.	冷凍 塩漬 鶏肉	1	タイ(蘭経 由)
Norovirus	はまぐり	12	ポルトガル	HAV	冷凍 ミックス ベリー	1	ブルガリ ア、ポーラ ンド
HAV	イガイ	?	スロベニア	Norovirus	冷凍ラズ ベリー	29	ポーランド
HAV	チルド カキ	1	仏及び蘭	ヒスタミン	アン チョビ フィレ	2	モロッコ
HAV	冷凍 ベリー	4	伊 (原材料は ブルガリ ア、カナダ、 ポーランド、セル ビア)	Norovirus (GI)	冷凍ラズ ベリー	13	ポーランド (原材料は セルビア)
ヒスタミン	オリーブ 油アン チョビ	5	スペイン				

その中でも特筆すべき事例は、スウェーデンで2名が、EHEC特有の症状を呈し、調査の結果、スウェーデンの施設で製造されたハンバーガーの喫食が原因。当該ハンバーガーはオランダのカット工場でカットされた原材料を使用、牛肉はハンガリー、ラトビア、ポーランド、英国等の牛肉を用いてカットしていた。オランダは当該カット工場から牛肉が出荷されたフランス、英国、フィンランド、ドイツ等にも警告。このアウトブレイクの前にデンマークで同じ血清型のVTECによる患者13名、うち8名がHUSを呈する食中毒が報告されていたが、このスウェーデンの事例との関連性は明らかにできなかった。

もう1つはイタリア産の冷凍ベリーによるA型肝炎ウイルスのアウトブレイクである。A型肝炎ウイルスの潜伏期間の長さとしてベリーはあらゆるケーキやお菓子に用いられたことで、国をまたいだ追跡調査は非常に困難で、EFSA、ECDCが作業部会を立ち上げ追跡調査を調整した。患者はイタリア、アイルランド、フランス、英国、ドイツ、オランダ、スウェーデン等に及ぶが、実際の汚染源の究明には至っていない。また、2013年3月から5月に、北欧4か国において、モナコ及びエジプト産で、ベルギーで包装されたいちごによるA型肝炎ウイルスのアウトブレイクも報告されていた。

病原微生物による通報は642例と2012年より増加していた。これは食肉と二枚貝からの検出事例が増えたことによる。

二枚貝ではノロウイルスが7件から27件に増加したが、これはイタリアとデンマークから通報されるフランス産カキと、輸入時の検査で発見されたトルコ及びチェニ

ジア産活はまぐりによる。二枚貝のサルモネラは2012年の4件から2013年には17件と増加していたがこれは、ベトナム産ボイル済二枚貝がRTE食品なのに、サルモネラが25g中から不検出というfood safety criteriaを遵守しなかったことによる。

鶏肉以外の食肉では腸管出血性大腸菌(STEC)の通報が2012年の18件から2013年には70件に増加した。これは主にアルゼンチン及びブラジル産のチルドビーフによる。そのほか、イタリアがオーストリア産の鹿肉からSTECの報告をしている。鶏肉のサルモネラ属は2012年の54件から3倍に増加したが、半数はブラジル産(60件)、次いでポーランド産の家禽肉(29件)であった(欧州では鶏肉からサルモネラは検出されてはならない規則である)。

動物性食品以外では野菜果実の通報が多く、そのほとんどはサルモネラ属菌によるものであった。継続的に英国からバングラデシュ、インド及びタイ産のpaan leaves(パーン)中のサルモネラの通報が多かった。ノロウイルスはポーランド産のラズベリー及び中国産のストロベリーの通報が多く、後者は2012年にドイツで発生した中国産ストロベリーによる大規模食中毒以降、輸入時の検査を強化し、発見されたものである。その他のウイルスとして2013年に特筆すべきはA型肝炎ウイルスであり、種々の食品素材から同ウイルスを分離する技術を有するイタリアから11件の通報があった。

国別ではオランダから家禽肉以外の食肉からSTECの通報が40件、英国から野菜果実からサルモネラ属菌の検出が34件が国別届出件数トップ10に入っていた。

RASFF から日本政府に対し、汚染食品が流通していると通報があった事例は 4 件、日本産の食品が通報対象になったのは 10 件であった。

引用文献：The Rapid Alert System for Food and Feed(RASFF), 2013. Annual Report

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 ではトルコからカナダ産の有機発芽チア (chia) の種子の粉末を含む種々の製品により、アメリカ及びカナダにおけるサルモネラ症アウトブレイクと *Listeria monocytogenes* に汚染されたシナモンアップルが通報されたが、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。

今回調査した 2 つの緊急通報で、頻繁に通報される病原体はサルモネラ属菌、STEC、norovirus などが多かったが、RASFF では HAV に汚染された野菜果実の通報が増えており、HAV は潜伏期間が長く原因食品を追及するのが難しいことに加え、輸入ベリー類はケーキ等の原材料として幅広い食品に使用されることも多く、追跡調査を行うことは難しい。

果実等のノロウイルスに対策については、ベリー類のノロウイルス汚染を対象に微生物学的基準を設定することは、HACCP ベースの食品安全管理システムの妥当性確認

および検証に役立ち、食品事業者やその他の関係者に対し、何が許容可能または不可能かを伝えることに利用できるが、現時点では、ベリー類のノロウイルス汚染について工程衛生基準 (Process Hygiene Criteria) や食品安全基準 (Food Safety Criteria) を設定することは、必要なリスクベースのデータの蓄積が不十分なため、難しい。冷凍ラズベリーやイチゴのノロウイルス汚染に対する管理対策の改善を支援するため、適切なデータの収集とそれに続くリスクベースでの微生物学的基準の作成が優先事項として検討されるべきである。

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ズプロジェクト (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ズにより、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ズは補える可能性が示唆された。

E. 結論

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。

輸入時、微生物モニタリングを行う場合には、喫食前に微生物を死滅させる工程がない食品をターゲットにし、サルモネラ、STEC、Norovirus、*Listeria monocytogenes* などの病原微生物を対象に、また諸外国の汚染率等から少なくとも 1 検体からは病原菌が検出できる検体数のモニタリング検査を実施することが望ましい。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyofuku, H. Prevalence of Foodborne Diseases in Western Pacific Area. Encyclopedia of Food Safety. Elsevier. Volume 1, 2014, Pages 312-322
- 2) A. Depaola and H. Toyofuku. Safety of Food and Beverages: Seafood. Encyclopedia of Food Safety, Volume 3, 2014, Pages 260-267
- 3) Y. Sasaki, M. Haruna, T.Mori,M. Kusukawa, M.Murakami, Y.Tsujiyama, K. Ito, H.Toyofuku,

Y.Yamada. Quantitative estimation of *Campylobacter* cross-contamination in carcasses and chicken products at an abattoir. Food Control. 43.10-17. 2014

- 4) 豊福肇:コーデックスの食品中の微生物規準の設定と適用に関する原則の攻訂. Milk Science. (2014). 63(3), 157-8
- 5) 豊福肇:義務化を見据えて動き出した日本の HACCP 普及動向~柔軟性を持たせた HACCP 導入とは~月刊 HACCP2015 年 1 月号
- 6) 豊福肇「HACCP を中心とする国際規格の海外の状況と国内における HACCP 導入の課題」獣医公衆衛生研究(全国公衆衛生獣医師協議会) 2015 . vol.17-2 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) H.Toyofuku. International approach toward risk management of pathogenic microorganisms related to food. IS3 Global Food Supply and Safety Ensure. 第 88 回日本細菌学会総会. 2015 年 3 月. 岐阜
- 2) 豊福肇、蒔田浩平、大橋毅夫、柿沼美智留、長田郁子、黄色大悲. プロイラーのフルオロキノロン耐性 *Campylobacter* 定量的リスク評価の試み. 第 7 回 日本カンピロバクター研究会, 2014.12 月
- 3) 豊福肇. iRISK による輸入食品の微生物リスク評価. 第 108 回日本食品衛生学会学術講演会, 2014. 12 月, 金沢
- 4) H.Toyofuku. Overview of Microbial Criteria in Foods, with reference to

Codex and Japan. The 6th ILSI
BeSeTo Meeting & Satellite
Symposium on “Microbial Criteria in
Foods”, 2014.Nov., Tokyo

- 5) 豊福肇 . シンポジウム 「グローバル
化を迎えた食品微生物学の課題」グロ
ーバル化と食品微生物規格の考え方 .
第 35 回日本食品微生物学会学術総会 ,
2014 年 9 月 , 堺
- 6) 豊福 肇 , 小林光士 , 下出敏樹 , 牛丸
藤彦 , 小野寺仁 , 小池史晃 , 住奥寿久 ,

石橋俊之 , 小嶋高則 , 鷲見隆治 , 村瀬
繁樹 , 大田哲也 , 坂下幸久 , 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 2 . 第 107 回日本食品衛生学会学
術講演会 , 2014. 5 月 , 沖縄

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 26 年度分担研究報告書

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・生化学部
研究協力者 坂田こずえ 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者 菅野陽平 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者 野口秋雄 国立医薬品食品衛生研究所・生化学部
研究協力者 福田のぞみ 国立医薬品食品衛生研究所・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、および中毒事例数が常に多い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。系統樹解析結果をもとに、迅速簡便法として開発した PCR-RFLP 法は、改良を加えて、加熱調理サンプルからの分析も可能し、クサウラベニタケおよびツキヨタケ迅速食毒判定法として確立した。今回さらに、確定検査のための感度および精度に優れたリアルタイム PCR 法をクサウラベニタケおよびツキヨタケに対して新たに開発した。検査の検証及び普及を今後行うにあたり必要な陽性プラスミドの構築を行った。本法により、喫食前検査で中毒発生を防止し、超毒発生時の検査で、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。

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、野生のきのこが発生時期に重なり、多くの人がきのこ採取を行い、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り、摂取し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。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、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、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 法を昨年度までに作成した。本年度は、クサウラベニタケについては確定法としてリアルタイム PCR 法を、ツキヨタケについては加熱調理や吐瀉物を想定し人口胃液処理したサンプルでも適用可能な PCR-RFLP 法および確定法として用いるリアルタイム PCR 法を確立した。

B. 研究方法

クサウラベニタケとその近縁種に関する

実験

クサウラベニタケ・ウラベニホテイシメジの定性リアルタイム PCR 法

(1) 試料

昨年度までに収集した、3つに分類されたクサウラベニタケおよびウラベニホテイシメジの4種類を用いて検討した。また、特異性確認のため市販の食用きのこ6種(シイタケ、マイタケ、ブナシメジ、エノキタケ、マッシュルーム、なめこ)も用いた。

(2) DNA 抽出(DNeasy Plant mini kit)

試料を蒸留水でよく洗浄した後、1.5mL 容チューブに約0.5g採取して、65℃の AP1 buffer 600 μ L と RNaseA 4 μ L を加えマイクロホモジナイザーを用いて粉碎混合した。次に、AP2 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 culum 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 容チューブに移した。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 culum 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 culum 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 culum は新しい1.5mL 容チューブに移し、65℃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 DNA 抽出液を得た。DNA 抽出液は濃度調整しないで PCR に供する。

(3) リアルタイム PCR 条件

リアルタイム PCR 装置として 4 色同時分析可能な Roche 製 LightCycler96 を用いた。食用のウラベニシメジおよび 3 つの毒きのこであるクサウラベニタケ近縁種のマルチプレックスリアルタイム PCR は、プライマー対を共通として、プローブを各きのこに特異性の高い領域に設計した。使用したプライマー対およびプローブは以下の通りである。

リアルタイム PCR 検知用プライマーとして

Forward primer-1:

5'-TTCCAAGTGTTCGATTCAACC-3'

Forward primer-2:

5'-CTTCAAGTGTTCGATTTCAACC-3'

Reverse primer:

5'-YTCGCTTCGTCAACCTGAA-3'

グループ特異的検知プローブとしてそれぞれ

E. rhodopolium clade I probe:

5'-Cy3-CACCAGCCTAGGCACAGACAT
TAACTTG- BHQ2a-3'

E. rhodopolium clade II probe:

5'-FAM-TTCAACACCATCAGACGAGCT
AACTCATC-BHQ1a-3'

E. rhodopolium clade III probe:

5'-TexasRed-CACCAGCTTAGGCACAG
ACATTAATTTG-BHQ2a-3'

E. sarcopum probe:

5'-Cy5-ACCAGCTTAGGCACAGATGTG
AACTCATT-BHQ3a-3'

を用いた。

PCR 反応液は 25 μ L/well として調製する。その組成は以下の通りである。

プライマー溶液 (各フォワードプライマー: 12.5 μ mol/L、リバースプライマー: 25 μ mol/L) 1.0 μ L、プローブ溶液 (10 nmol/L) 0.5 μ L、蒸留水 9.0 μ L を混合調製し、DNA 試料液 2.0 μ L を添加した。

また、反応条件は、95 °C 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 °C 15 秒、58 °C 60 秒を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。

(4) 標準プラスミド作成

PCR-RFLP 法およびリアルタイム PCR 法検査に用いることが可能な、クサウラベニタケ 3 種及びウラベニホテイシメジ 1 種の ITS 全領域を含むプラスミドを作成した。すなわち、pTAKN-2 vector に 4 種きのこの全 ITS 領域を挿入した標準プラスミドを構築した (Fig.1)。

pTAKN-2-KUB10 [*E. rhodopolium* clade III]

pTAKN-2-KUB108 [*E. rhodopolium* clade I]

pTAKN-2-KUB124 [*E. rhodopolium* clade II]

pTAKN-2-KUB136 [*E. sarcopum*]

(5) 検出感度および特異性の検討

作成した標準プラスミドを $2 \times 10^0 \sim 2 \times 10^6$ コピー/ μ L に調整してリアルタイム PCR を行い、得られた増幅曲線から増幅効率を求めた。また、あらかじめ検討した検出限界付近の 3 濃度 (5, 10, 20 コピー/rxn) について、21 回繰り返し試行により検出

限界を求めた。また、標準プラスミドとクサウラベニタケ3種及びウラベニホテイシメジそして市販の食用きのこ6種の抽出DNAを用いて、プライマーと4つのプローブの特異性を検討した。

ツキヨタケと食用きのこに関する実験

ツキヨタケのPCR-RFLP法

(1) 試料

国内で収集したツキヨタケおよび国内で収集もしくは購入したシイタケ、ヒラタケ、ムキタケを用いて検討した。また、市販食用きのことしてシイタケ、ヒラタケ、ムキタケに加え、ブナシメジ、マイタケ、エリンギ、マッシュルーム、ナメコ、エノキ、タモギタケを用いた。

(2) DNA抽出(DNeasy Plant mini kit)

試料を蒸留水でよく洗浄した後、液体窒素で凍結し乳棒と乳鉢で粉碎した。粉碎した試料200~400mgに65℃のAP1 buffer 800 µLとRNaseA 4 µLを加え、混合した。次に、P3 buffer 260 µL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 × g 10分間遠心し、その上清をQIAshredder Mini spin culumに負荷し、室温で14,000 × g 1分間遠心し得られた溶出液を5 mL tubeに移した。溶出液は1.5倍量のAW1 buffer(旧名称 AP3/E buffer)を加え混合し、650 µLずつ数回に分けてDNeasy Mini spin culumに負荷した。その際、10,000 × g 1分間遠心し、溶出液は廃棄した。次に、AW2 buffer(旧名称 AW buffer) 500 µLをDNeasy Mini spin culumに負荷後、10,000 × 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 × g 15分間遠心し、余分なアルコールを除去した。DNeasy Mini spin culumは新しい1.5mL tubeに移し、65℃に加温しておいたTE 40 µLをシリカメンブレンに負荷し、5分静置後、10,000 × 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 µL DNA抽出液を得た。

(3) 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。

(4) PCR-RFLP法

きのこ試料からのDNA抽出は、各試料100 mg(乾燥試料20 mg)にPrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 400 µLを加え、バイオマッシャーIIで破碎した。100℃で10分間加温した後、室温13,000 × gで2分間遠心し上清を簡易DNA抽出液とした。ITS領域を増幅にはITS1FとITS4Bのプライマー対を用い、PCR反応液は50 µL/wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。2 × AmpDirect Plus 25 µL、対象プライマー対溶液(各プライマー、5 µmol/L)各5 µL、5 U/µL BIOTAQ HS DNA Polymerase 0.25 µL、蒸留水 13.75 µLを混合調製し、簡易DNA抽出液 1 µLを添加した。また、反応条件は、95℃で10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℃ 1分、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 7分伸長反応、4 保存を行った。PCR 産物は必要に応じて精製した。制限酵素処理は、FastDigest *Sau96I*、FastDigest *Bpu10I*、FastDigest *SfcI*、そして FastDigest *DrdI* と FastDigest *HincII* のペアの 4 組の制限酵素それぞれで実施した。反応液の組成は PCR 産物 3 µL もしくは精製した PCR 産物 70 ng、10×FastDigest Green Buffer 0.67 µL、制限酵素 0.33 µL を混合し、蒸留水を加え全量を 10 µL とした。37 で 5 分以上 (*Bpu10I* のみ 30 分以上) インキュベートし、反応液を 3%アガロースゲルによる電気泳動で分離した。DNA マーカーは、100 bp DNA Ladder を用いた。

(5) 市販食用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、市販食用きのこにツキヨタケが混在した場合でも、ツキヨタケが検出可能かどうかを検討した。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。

(6) ツキヨタケの Short-PCR-RFLP 法

ツキヨタケによる中毒が疑われた場合の原因きのこの特定に利用可能な検査法として、加熱調理などにより DNA 断片化が一部進んでいる試料に適用可能な Short-PCR-RFLP 法を検討した。試料 100 mg に蒸留水 500 µL を加え 100 で 30 分加熱し、室温 で 6,000 × g 1 分間遠心した後、上清を取り除いた。崩壊試験第 1 液 (pH 1.2) を 500 µL 加え、37 1 時間インキ

ュベートした後、室温で 6,000 × g 1 分間遠心し、上清を取り除いた。蒸留水を加え、遠心後に上清を取り除く洗浄操作を 2 回繰り返し、残りの沈殿物を試料として PCR-RFLP 法を行った。

DNA 断片化が進んだ試料から増幅するため約 200 bp を標的とする Short-PCR-RFLP 法用のプライマーとして

tukiyo-shortPCR-F1: 5'-

TGTAACAAAGGCATGTGCACG -3'

tukiyo-shortPCR-R1: 5'-

CAAGAGATCCGTTGCTGAAAGT -3'

を用いた。

(7) 標準プラスミド作成

ツキヨタケがなくても PCR-RFLP やリアルタイム PCR によるツキヨタケの判別を可能とするために陽性コントロールプラスミドを作製した。BIOTAQ HS DNA Polymerase で増幅したツキヨタケの ITS 領域を pCR2.1-TOPO に組み込み、*E. coli* TOP10 株でクローニングを行った。

(8) リアルタイム PCR 法の検討

PCR-RFLP 法で得られた結果の確認試験法として、リアルタイム PCR 法について検討した。ツキヨタケの検出用プローブおよびプライマーとして

OM_V-15_Taq:5'

FAM-AGTTGCAGCTATCCC-MGB 3'

OM_V-02f:5'-

TGAAATGAAAGCAGACAGAGCAA -3'

OM_V-66r:5'-

TGGTTTGACAAGGCTCTTTGGT -3'

を用いた。

Real time PCR 用反応液は 25 μ L /well として調製した。その組成は以下のとおりである。2x FastStart TaqMan Probe Master (Rox) 12.5 μ L、10 μ mol/L プロンプ溶液 0.5 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、25 μ mol/L) 各 0.3 μ L、蒸留水 6.7 μ L を混合調製し、DNA 試料液 5 μ L (0.5 ng/ μ L) を添加した。また、反応条件は、50 で 2 分間保持し、95 で 10 分間加温する。その後、95 15 秒、60 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。

C. 研究結果

1. PCR-RFLP 法

ツキヨタケと形態類似食用きのこ

これまでに、毒きのこであるクサウラベニタケとその近縁種、食用きのこであるウラベニホテイシメジを判別するための迅速な検査法として、電気泳動後のバンドの泳動パターンで判別する PCR-RFLP 法を開発した。本方法は生きのこおよび調理加工きのこでも適用可能な方法として確立した。

本年度は同様の手法を用いて毒きのこであるツキヨタケと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 法を検討した。PCR-RFLP 法では、*Bpu10I* および *SfcI* による制限酵素処理でツキヨタケのみ切断されることを、*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を、また、*DrdI* および *HincII* では、ツキヨタケ以外の食用のきのこを制限酵素で切断し、ツキヨタケと明確に区別できた。これ

ら 4 組の制限酵素の複数をを用いることでツキヨタケを判別同定可能であることを確認した (Fig.2)。

そこで次に、ツキヨタケにおいても加熱調理などにより DNA の一部断片化が進んでいる試料にも適応可能な約 200 bp の範囲を標的とする Short-PCR-RFLP 法を検討した。その結果、60 分の加熱処理および人工胃液処理においても 200 bp のバンドは増幅でき、*SfcI* もしくは *DrdI/HincII* 処理することで、毒のツキヨタケのみ切断、または、食用のシイタケ、ヒラタケ、ムキタケのみ切断されることから食毒を明確に区別できることを明らかにした (Fig.3)。

さらに、市販食用きのこ (複数種類) の混合試料にツキヨタケが混在した場合にツキヨタケの判別が可能かどうか確認するため、2.5% ~ 100% の割合でツキヨタケが混在する試料を調製した。60 分の加熱および人工胃液処理後に制限酵素 (*DrdI/HincII*) 処理を行い、200 bp の短い標的配列を用いた Short-PCR-RFLP を実施した。その結果、2.5% まで全てのツキヨタケを含む試料で切断されないバンドが残っており、ツキヨタケの存在が確認できた (Fig.4)。

2. リアルタイム PCR 法

(1) クサウラベニタケとその近縁種

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、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 を用いた方法を整備すれば、上記検査法で判定ができなかった場合にも最終確認が可能となり結果の信頼性が向上することから検討した。

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系統および食用ウラベニホテイシメジ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。昨年度に、予備検討を行い、3系統（毒2系統および食用）の検討を行い特異的に検出可能であることを確認した。そこで、本年度はすべての系統で、必要な感度で特異的に検出可能かどうか、および PCR 効率や検出限界を求めた。その結果、2~200,000 コピーの陽性プラスミドを用いたところ、良い直線性を示し ($R^2=0.99\sim 1.00$)、PCR 効率 (E) は 96~102%と良好であった。また、検出限界は 10 コピー (*E. rhodopolium*- clade II; 蛍光色素 FAM および *E. rhodopolium*- clade III; 蛍光色素 Texas-Red) から 20 コピー (*E. rhodopolium*- clade I; 蛍光色素 VIC および *E. sarcopum*; 蛍光色素 Cy5) であった (Figs.5 and 6)。しかしながら、4色 (FAM, VIC, Texas-Red, Cy5) を用いたマルチプレックスでは感度に差が見られたほかに、Ct 値 40 付近から弱いながら非特異的増幅が見られた。この非特異的増幅は、各プローブを用いたシンプレックスでは見られなかった。以上の結果から、プローブをうまく設計することで、4系統それぞれを特異的に検出できることが明らかになった。

(2) ツキヨタケとその近縁種

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、シイタケ、ムキタケ、ヒラタケを含む市販食用きのこには交差反応しない、ツキヨタケ特異的な検出が可能であることが明らかになった

(Fig.7)。また、ツキヨタケがなくても確認試験が実施できるように、ツキヨタケの ITS 領域を組み込んだ陽性コントロールプラスミドを作製した (Fig.8)。作製したツキヨタケ陽性コントロールプラスミドを用いてリアルタイム PCR を実施した結果、 $10^3\sim 10^9$ copy/well の範囲で良好な直線性を示した。検出限界は 500 コピー、PCR 効率も 85%程度であった。

また、複数種類の市販食用きのこにツキヨタケが 2.5%~100%の割合で混在する試料から抽出した DNA を用いてリアルタイム PCR を実施した結果、ツキヨタケの混在している試料では明確な増幅が確認された。また複数種類の市販食用きのこの混合試料を用いた Short-PCR-RFLP で PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent によって抽出した簡易抽出 DNA 溶液を用いてリアルタイム PCR を行った場合も、抽出 DNA と同様の結果が得られた。このことから、簡易抽出法でより短時間で確定検査が可能であると考えられた。

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多くはない。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、あるいは分解のため分析時に試料中に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、同一きのこでも、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、化学的成分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。

今年度までに開発したクサウラベニタケとその近縁種、およびツキヨタケと形態類似きのこに対する迅速簡便な同定法である PCR-RFLP 法、および、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。本方法は調理加熱後の試料でも適用できることから、利用される場面は多いと

考えられる。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。

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4系統同時分析のための4色マルチプレックス定性リアルタイム 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
投稿準備中(クサウラベニタケ分類および PCR-RFLP 法)
2. 学会発表
 1. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子: Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定 .第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12)
 2. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西

卷) 知子: RFLP および Real-time PCR
法を用いたクサウラベニタケ複合種の
分析法 . 第 51 回全国衛生化学技術協議
会年会 (2014.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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 2 0 1 4 - 1 0 3 5 5 5

出願日 : 平成 2 6 年 5 月 1 9 日

発明の名称 : きのこの同定方法および同定
キット

出願人 : 公益財団法人ヒューマンサイエ
ンス振興財団 様

発明者 : 近藤 一成 様 (国立医薬食品衛
生研究所)

弊所整理番号 : 2 6 H 1 0 5

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 26 年度分担研究報告書

植物毒の毒性評価と毒成分分析

研究分担者 紺野勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所
研究協力者 佐竹元吉 お茶の水女子大学生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

今までに報告されていなかった植物種（スノーフレーク、ヒメザゼンソウ）による食中毒が発生したので、「自然毒のリスクプロファイル」に追加掲載し、注意喚起を図った。また、「自然毒のリスクプロファイル」は作成・掲載から約 5 年が経過したので、全面的に改訂した。

昨年度開発した有毒植物の遺伝子鑑別法を実際の中毒原因植物試料（チョウセンアサガオ）に適用し、本鑑別法が有効であることを確認した。

A. 研究目的

I. 有毒植物による食中毒情報収集および現地調査

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

II. 「自然毒のリスクプロファイル」の改訂

平成 21 年度（2009 年）に作成した「自然毒のリスクプロファイル」は、作成・掲載から約 5 年が経過したので、全面的に改訂した。

B. 研究方法

中毒情報収集は、まず新聞などのメディ

ア報道から現地の担当保健所を探し出し、連絡をとり、聞き取り調査を行う。必要に応じて、現地調査を行い、より詳細な聞き取り調査、発生現場の視察、原因植物の試料入手を検討する。試料が得られた場合は、毒成分分析や遺伝子鑑別によって植物種を同定する。

C. 研究結果

I. 有毒植物による食中毒情報収集および現地調査

1. 中毒情報の収集

平成 26 年度に報告された有毒植物による中毒事例は、以下のようになる。

バイケイソウ（4 件、患者数 8）

コバイケイソウ（1 件、患者数 2）

スイセン（5 件、患者数 15）

スノーフレーク (2 件, 患者数 5)
ヒメザゼンソウ (1 件, 患者数 1)
チョウセンアサガオ (1 件, 患者数 2)
マムシグサ (1 件, 患者数 1)
ヒョウタン (1 件, 患者数 1)

この中で, スノーフレークとヒメザゼンソウは, これまでに報告がなく, 本年度初めて中毒事例が発生したものである。そこで, 厚労省では注意喚起の通知を出したが, その際, 植物情報を提供し, パンフレット作成を支援した。また, 「自然毒のリスクプロファイル」に追加掲載した (後述)。

2. 青森県で発生したチョウセンアサガオによる食中毒の現地調査

1) 事故発生の経緯

患者は平成 26 年 5 月 12 日の夕方, 自宅の庭でごぼうを植えていた畑を耕していた際に, ごぼうと思われる根を採集。女性が味見をしながら調理していたところ, めまい等の症状を呈したため医療機関を受診。女性の息子が, 医師より女性が普段飲んでいる薬を家から持ってくるように頼まれて自宅に戻った際, 女性の夫が同様の中毒症所を呈していることを確認し, 119 番通報。夫が救急搬送された。患者受診医療機関より, 平成 26 年 5 月 13 日午前 1 時 15 分頃八戸保健所へ食中毒通報。八戸保健所は, 青森県産業技術センター野菜研究所によるチョウセンアサガオとの推定と, 患者の臨床症状がチョウセンアサガオ中毒と酷似, 医療機関より食中毒の届け出があったことより, チョウセンアサガオ食中毒と断定。

2) 現地調査

青森県健康福祉部保健衛生課を訪ね, 担

当者に聞き取り調査。現場見取り図 (八戸市市街地), 現場の写真の提供を受けた。さらに, 現場 (家庭の庭) に残っていた原因植物と思われる植物サンプルを入手した。

3) 原因植物の DNA 分析による同定

昨年度開発した DNA 鑑別による植物種の同定法を適用し, 本原因植物の種同定を試みた。

食中毒原因植物のゲノム DNA を鋳型として, *rbcL* (部分断片), *matK* (部分断片) および *trnH-psbA* intergenic spacer 領域を PCR にて増幅後, DNA シークエンサーを用いて塩基配列を決定した。得られた塩基配列をクエリーとし, DNA データベース (BOLD Systems, GenBank/ DDBJ/ EMBL) の検索機能を用いてクエリーに最も近い配列を同定した。

塩基配列を決定した *rbcL* (670 bp) を BOLD System の BOLD Identification Systems にて植物種を推定したところ, 食中毒原因植物はナス科植物 (ヨウシュチョウセンアサガオ) であると推定された。また, *matK* (848 bp), *trnH-psbA* intergenic spacer 領域 (550 bp) の配列を GenBank の BLAST 検索を行ったところ, 同様の結果が得られた。この結果により, 本遺伝子鑑別法が, 実際の中毒原因植物にも有効に適用できることが確認できた。

II. 「自然毒のリスクプロファイル」の改訂

「自然毒のリスクプロファイル」は, 植物毒による食中毒に対する注意喚起を目的に, 平成 21 年度 (2009 年) に作成し, 厚労省ホームページに掲載した。過去数年間に中毒事故が発生した 20 種を選び, 植物の

特徴，間違えやすい類似種，毒成分の分析法などを，種毎にまとめたものである。以来，アクセス数は多いものでは数万回を数え，また各自治体からのリンクも貼られ，かなり活用されている。しかし，この5年間に一部データは古くなり，また新規に発生した中毒事例も出てきたので，ここで全面的に改訂することにした。主な改訂点，以下の通り。

- ・ 新項目として，「スノーフレーク」，「ヒメザゼンソウ」，「シャクナゲ」の3種を加える。
- ・ 「バイケイソウ」，「コバイケイソウ」は，一項目にまとめて「バイケイソウ類」とする。
- ・ 「チョウセンアサガオ」は「チョウセンアサガオ類 1」に，「キダチチョウセンアサガオ」は，「チョウセンアサガオ類 2」に，それぞれ名称変更する。
- ・ 「患者数」の項には，最新のデータ（過去5～10年間 2004～2014年）を掲載する。

D. 研究発表

特になし

E. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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 26 年度分担研究報告書

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（植物性）を含む食品、あるいは食品への有毒な植物及びキノコの混入に関連した、事例、規制、消費者への注意喚起等に関する海外の情報を調査することを目的とした。

有毒な植物・キノコが実際に食品へ混入した事例、及び自然毒を含む食品が問題になった事例等については、EU の食品及び飼料に関する緊急警告システム（RASFF）のデータ（2014 年 12 月 25 日までの通知）を対象に調査し、規制・消費者への注意喚起等については各国政府の食品安全担当機関の公表資料を中心に調査した。

食品への混入が実際に報告され、各国で注意喚起が公表された内容を考慮した結果、食品安全上の対策として特に注意を向けていくべきと考えられた自然毒関連の問題は、ビターアプリコットカーネルのアミグダリン、穀類や豆類へのトロパンアルカロイド含有植物の混入、ハーブティー等へのピロリジジナルカロイド含有植物の使用であった。また、症例報告等で中毒が報告されている蜂蜜中のグラヤノトキシンについても健康被害を生じる懸念があり注意が必要であると考えられた。他に、red kidney beans 等のレクチン、ジャガイモ中のグリコアルカロイド、青酸配糖体については、複数国が自然毒関連の専用ウェブサイトにて注意喚起や情報提供を行っていた。さらに、フードサプリメントに有毒植物が混入する可能性が特に懸念されることから、販売前に十分な調査もされずに有毒植物が利用されることのないよう何らかの対策が必要である。

以上のように、食品に含まれる可能性のある自然毒に関する海外での対応状況を調査したことにより、今後注意を向けていくべき自然毒を特定した。これらの情報は、ヒトの健康に有害な食品が海外から入って来ないようにするための予防に役立つことが期待できる。

A. 研究目的

自然毒（本研究では植物性自然毒を対象とする）を含む食品、あるいは食品への有

毒な植物・キノコの混入に関連した、事例、規制、消費者への注意喚起等に関して海外の情報を調査した上で、食品、特に輸入品

に含まれる恐れのある自然毒を特定し、今後我が国において注意を向けるべき食品及び自然毒について検討することを目的とした。

B. 研究方法

EU の食品及び飼料に関する緊急警告システム (RASFF : the Rapid Alert System for Food and Feed) のデータ (2014 年 12 月 25 日までの通知) を対象に、食品中の自然毒が問題になった事例、並びに有毒な植物・キノコが実際に食品へ混入した事例を調査した。また、食品中に含まれる又は混入する可能性がある自然毒に関する規制、消費者への注意喚起等について、各国政府の食品安全担当機関などの公的機関による公表資料を中心に調査した。ただし、かび毒及び菌類が産生する有毒物質 (例 : 麦角アルカロイド) は対象外とした。

C. 研究結果及び考察

1. 混入事例について

EU RASFF は、規則 EC/178/2002 のもとで設置され、EC (European Commission) が運営しているシステムである。EU 加盟国の食品安全担当機関、EC、EFSA、ノルウェー、リヒテンシュタイン、アイスランド及びスイスがシステムメンバーであり、メンバー国が健康リスクのある食品や飼料を確認した場合には RASFF を利用して EC へただちに通知しなければならない。もし当該製品が第三国へ輸出されていた場合には、その国にも通知される。緊急通知には「Alert」、「Information」、「Boder rejection」の 3 種類があり、「Alert」は重大なリスクのある食品や飼料が市場に出まわってお

り、回収などの措置を速やかにとる必要があるもの、「Information」はリスクが確認された食品や飼料が市場に出まわったが、他の EU 加盟国はすぐに何らかの措置をとる必要はないもの (製品が他の加盟国には出まわっていない場合、すぐに何らかの対応をとる必要のないようリスクの場合など)、「Boder rejection」は EU (及び欧州経済領域 EEA) の外部国境で、食品及び飼料の貨物に健康へのリスクが見つかり入荷拒否された場合に出され、この通知はすべての EEA ボーダーポストに伝えられ、入荷拒否された製品が別のボーダーポストを通過して EU 域内に再び入ることがないように管理強化するためのものを示す。

本研究では、海外において食品中の自然毒が問題になった事例、有毒な植物・キノコが食品へ混入した事例として EU RASFF データベースの情報をもとに調査し、どのような自然毒や食品が問題になりやすいのかを特定した。その結果のうち自然毒を含む植物が問題になった事例を Table 1、キノコが問題になった事例を Table 2 に示した。

自然毒を含む植物が問題になった事例は、1982 ~ 2014 年 12 月 25 日の通知として 157 件が確認できた (Table 1)。通知された主なものは、シキミ (有毒成分 : アニサチン)、トロパンアルカロイド含有植物、青酸配糖体含有植物、イヌサフラン (コルヒチン)、ピロリジジナルカロイド含有植物、イヌホウズキ (グリコアルカロイド)、高濃度のクマリン、松の実による味覚異常 (通称パインマウス)、トウゴマ (リシン) などであり、件数ではトロパンアルカロイド含有植

物、青酸配糖体含有植物、高濃度のクマリン、松の実による味覚異常に関する通知が他に比べて特に多かった。

トロパンアルカロイド関連では、ソバ・ソバ粉（主に、チェコ、ハンガリー、ウクライナ、スロベニア、オーストリア産）やゴボウ茶（ドイツ産）でのアトロピン及びスコポラミンの検出、豆類（缶詰、冷凍品等）及び雑穀（millet）へのシロバナチョウセンアサガオ種子の混入（主にハンガリー、オーストリア産；冷凍野菜・豆・種子ミックスの原料はスペイン産）、ハーブティーやゴボウ茶へのベラドンナの混入（古い事例；英国、ブルガリア、セルビア・モンテネグロ、ルーマニア産）、ケシの実へのヒヨス種子の混入（原料はチェコ産）などが報告されていた。特にソバ及びソバ粉へのトロパンアルカロイドの混入については過去にEU内で食中毒が発生して問題になっており、フランス食品衛生安全庁（AFSSA：現フランス食品・環境・労働衛生安全庁）はソバ粉についてアトロピン及びスコポラミンの基準値が必要であると提案¹⁾している。また、ソバ及びその加工品へのトロパンアルカロイドの混入状況については過去に食中毒（2003年、患者数73名）が発生したことがあるスロベニアの調査報告²⁾があり、その報告によると、スロベニアに輸入・流通しているソバ及びその加工品75検体中18検体からアトロピン及び/又はスコポラミンが検出され、原産国は多い順にハンガリー、チェコ、中国、スロベニア、製品の種類はソバ粉からの検出が多かったとされている（最大濃度：アトロピン26,000 µg/kg、スコポラミン12,000 µg/kg）。さらに2014年にはアトロピン及びスコポラミンがオー

ガニック製品のベビーフード（おかゆ）から検出され、30カ国以上に出荷されていたために各国で回収・注意喚起が行われ、我が国でも輸入業者による回収が行われた。食品及び飼料中のトロパンアルカロイドに関するEFSAの科学的意見³⁾によると、2010～2012年にオランダ及びドイツで集められた食品124検体のうち21検体からトロパンアルカロイドが検出された。その大部分はEFSAの食品分類で「Simple cereals that are or have to be reconstituted with milk or other appropriate nutritious liquids」に該当する食品であり、原料に小麦、トウモロコシ、ライ麦、オート麦等の穀類を使用した製品であった。それらの製品からは56検体中19検体から定量限界を超えるトロパンアルカロイドが検出されており、EFSAは幼児における食事由来のトロパンアルカロイド暴露に懸念を示している。このように、ソバなどの穀類や豆類、ハーブティーへのトロパンアルカロイド含有植物の混入は珍しいことではなく（特にオーガニック製品）、それらを輸入する際は気に留めておく必要がある。

一方、青酸配糖体関連の大部分はビターアプリコットカーネルのアミグダリンに関する通知であり、混入というよりも製品そのものが問題の事例だが、中毒も発生しているため自然毒関連の問題としては注意が必要である。さらにビターアプリコットは健康志向（がん予防）を目的とした製品として販売されていることも気に留めておく必要がある。

クマリンはスパイスのシナモンに含まれる成分であるが、肝障害の可能性が懸念されている。ただし、シナモンにはセイロン

とカシアがあり、セイロンはクマリン含量が少ないが、カシアはクマリン含量が多い。スパイスとして本来はセイロンシナモンが利用されるが、代わりに安価なカシアが使用されていることがあるために欧州等ではカシアを多量に摂取しないよう注意を喚起している。食品中のクマリン量について、EU では香料に関する規制 (Regulation (EC) No 1334/2008) の中で最大基準値を設定しており、EU RASFF へはシナモンを使用した菓子やシリアル等から高濃度のクマリンが検出されたとの通知がなされていた。EU ではクマリンの他に、食品用の香料や着香目的で使用される食品成分として beta-asarone、estragol、hydrocyanic acid、menthofuran、methyleugenol、pulegone、quassin、safrole、teucrin A、thujone (alpha and beta) についても最大基準値を設定している。また、FSANZ (Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 1.4.1) でも香料として添加された場合の食品中クマリンの最大基準値が設定され、他に agaric acid、aloin、berberine、hydrocyanic acid(total)、hypericine、pulegone、quassine、quinine、safrole、santonin、sparteine、thujones (alpha and beta) についても最大基準値設定の対象になっていた。

松の実による味覚異常は、松の実 (多くは中国産) を食べた後に苦み又は金属様の後味が数日から 2 週間継続するというものである。原因は不明だが、中国の陝西及び山西省産の *Pinus armandii* が関連する可能性があるとする報告がある^{4), 5)}。

他に、件数は少ないが、スターアニス (主に中国、ベトナム産) へのシキミの混入、

green beans (ベルギー、オランダ産) へのイヌホオズキの混入などが、食中毒の発生や消費者からの苦情に基づき通知されていた。オールスパイスにトウゴマが混入した事例については、トウゴマに含まれるリシンの毒性が非常に強いことから健康への被害が重篤になる可能性が考えられた。

自然毒を含むキノコが問題になった事例は植物よりも少なく 13 件のみであった (Table 2)。その中で影響地域が広がったのはルーマニア産の冷凍セイヨウタマゴタケ (*Amanita caesarea*) にタマゴテングタケが混入した事例で、通知したスペイン以外にポルトガルや米国に対しても通知されていた。他に、中国産の乾燥キノコへのテングダケの混入などが通知されていた。キノコの冷凍品や乾物は輸入されることもあると考えられるため、まれではあるものの毒キノコが混入する可能性があることに留意する必要がある。

2. 各国政府の対応状況について

海外政府機関の食品安全担当機関等の公表資料を対象に、食品に含まれる可能性のある自然毒に関する規制や注意喚起があるかを調査した。基準値が設定されていた、あるいは植物性自然毒に関する専用ウェブサイトが公開されていた各国機関は次の通りであり、内容の概要を Table 3 にまとめた。ただし、各 URL は Table 3 に記載した。

- 米国食品医薬品局 (FDA): 食品中の病原微生物と天然毒素についてのハンドブック (Bad Bug Book) (食品由来疾患の原因となる要因に関する情報を包括的にまとめたハンドブック)

- FDA : Compliance Policy Guide Sec. 550.050 Canned Ackee, Frozen Ackee, and Other Ackee Products- Hypoglycin A Toxin
- 英国食品基準庁 (FSA) : Fact sheet Natural toxins (食品中の自然毒に関するファクトシートを PDF で公開。ただし、現在は公開されていない)
- カナダ食品検査庁 (CFIA) : Natural toxins in fresh fruit and vegetables (果実・野菜中の自然毒に関する専用ウェブサイトを開設)
- CFIA : Imported and Manufactured Food Program Inspection Manual (輸入及び加工食品の検査マニュアルにおいて、化学ハザードの一つとして自然毒を記載)
- ヘルスカナダ : Canadian Standards (Maximum Levels) for Various Chemical Contaminants in Foods
- ヘルスカナダ : Natural Toxins (食品中の自然毒に関する専用ウェブサイトを開設)
- 香港政府 : Natural Toxins in Food Plants (食品中の植物性自然毒の情報を PDF で公開)
- 香港政府 : Food Safety Topics (食品安全に関して簡単にまとめた資料に自然毒の記載あり)
- ニュージーランド一次産業庁 (MPI) : Specific foods & natural toxins (食品中の自然毒に関する専用ウェブサイトを開設)
- オーストラリア・ニュージーランド食品基準局 (FSANZ) : Australia New Zealand Food Standards Code -

Standard 1.4.1 - Contaminants and Natural Toxicants

Table 3 に示したもののうち、3ヶ国以上の専用ウェブサイト等に記載されていたのは、red kidney beans 等のレクチン、ジャガイモ中のグリコアルカロイド、青酸配糖体であった。

これらの他に、FSANZ では Standard 1.4.1 に加えて、食品へ意図的に添加、あるいは食品として販売してはならない高等植物・キノコ類及びその成分を定めた

「Standard 1.4.4 –Prohibited and restricted plants and fungi」がある。そのリストに掲載された高等植物・キノコ類は、すでに本研究の平成 24 年度分担報告書に示した。これと同様に、ベルギーの「Royal decree of 29/08/1997」の List 1 には食品(フードサプリメント含む)に使用することはできない植物リストが掲載されており、他に食用キノコリストの List 2、フードサプリメントに使用可能な植物リスト及び最大基準を記した List 3 がある。ここでは、List 1 に記載された植物リストを Table 4 に転載した。List 1 にはトリカブトやチョウセンアサガオなどをはじめとする約 390 種の植物が含まれており、平成 24 年度分担報告書にまとめた EFSA の「Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplement; EFSA Journal 2012;10(5):2663 [60 pp.] : 欧州機関、欧州 21ヶ国及び世界保健機構 (WHO) 等でまとめられた資料や規制、並びに欧州食品安

全機関（EFSA）が収集した文献資料をもとに、食品及びフードサプリメントへ使用した場合にヒトの健康影響への懸念がある成分を含む高等植物・キノコ等をまとめた報告書」の元資料にもなっているので、合わせて参考にするとよい。

欧州では特にフードサプリメントに植物を利用することに伴う危険性について懸念しており、2014年11月にはデンマーク工科大学国立食品研究所、フランス食品・環境・労働衛生安全庁（ANSES）、ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）などの企画によりフードサプリメントへ植物を利用することの安全性や規制上の課題について議論する会議⁶⁾を開催するなど、情報の共有や今後の対応を検討するなどの取り組みを行っている。

また、食品の国際基準・規格を設定しているコーデックス委員会では、次の個別食品規格において、当該食品に混入すべきでない植物種子として、*Crotalaria*

（*Crotalaria* spp.：マメ科タヌキマメ属）、*Corn cockle*（*Agrostemma githago* L.：ナデシコ科ムギセンノウ属）、*Castor bean*（*Ricinus communis* L.：トウダイグサ科トウゴマ属）、*Jimson weed*（*Datura* spp.：ナス科チョウセンアサガオ属）及び一般的に健康に有害と認められる他の種子、が記載されている。

- ・ sorghum grains (CODEX STAN 172-1989)
- ・ maize (corn)(CODEX STAN 153-1985)
- ・ wheat and durum wheat (CODEX STAN 199-1995)
- ・ oats (CODEX STAN 201-1995)

米国疾病予防管理センター（CDC）は、「Emergency Preparedness and Response」の対象ハザードのうち biotoxins として、次の植物性自然毒等について専用ウェブサイトを発表している（他にサキシトキシン等の動物性自然毒もある）。これは米国におけるテロ対策の一環である。

<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlistchem-category.asp>

- ・ Abrin
- ・ Colchicine
- ・ Digitalis
- ・ Nicotine
- ・ Ricin
- ・ Strychnine

EFSA は、食品及び飼料中の化学汚染物質に関する実態データ収集に関する報告書

「Overview of 2011 European Data Collection of Chemical Occurrence in Food and Feed」において、汚染物質として植物毒についてもデータを集めたことを報告している。対象となった植物毒を Table 5 に転載した。これは、EFSA が食品及び飼料中に含まれる可能性がある汚染物質であると判断し、今後のリスク評価等のために汚染実態データが必要だと考えた植物毒のリストと言えるだろう。

<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/384e.htm>

また、EC では常任委員会において、トロパンアルカロイド、ステリグマトシシン、麦角アルカロイド、ホモブシン、シトリニン、ピロリジジンアルカロイド及び *Alternaria* toxins のモニタリングの勧告が

合意されていることから、現在、これらの汚染実態についてモニタリングが実施されていると推定される。

さらに各国機関は、Table 3 に示したような食品中自然毒に関する専用ウェブサイトの公開だけでなく、何かが問題になった場合には個別に注意喚起等を公表している。直近 10 年間に各国で公表された植物性自然毒に関する代表的な評価書や注意喚起等を Table 6 にまとめた。

複数の国で注意喚起等の対応が取られたものとしては、野生キノコ（主に中国産）中のニコチン、蜂蜜中のグラヤノトキシン、ビターアプリコットカーネル中のアミグダリン、穀類や豆類へのトロパンアルカロイド含有植物の混入、ハーブティーへのピロリジジンアルカロイド含有植物の使用、松の実による味覚異常の問題があった。この中で、松の実による味覚異常の問題については 2011 年以降とりあげられることはほぼなくなっているが、グラヤノトキシン、アミグダリン、トロパンアルカロイド、ピロリジジンアルカロイドについては継続的に注意喚起等が公表されていた。これらに対する各国機関による対応としては、英国ではビターアプリコットカーネルの摂取について 1 日に摂取しても安全な個数を注意喚起とともに助言、豪州では生のアプリコットカーネルの販売禁止、フランスではソバ粉中のアトロピン/スコポラミンの基準値設定などが提案されていた。ピロリジジンアルカロイドを含むコンフリーやバターバーについては、販売や摂取を中止するよう複数国で対応が取られていた。韓国では、ネパール産野生ハチミツはグラヤノトキ

シンが含まれるため国内での輸入・販売を禁止するだけでなく、インターネットを介した個人輸入などで購入することの危険性について消費者向けに注意を喚起していた。

また、ここには記さなかったが、キノコシーズンには各国で誤って毒キノコを採取しないようにとの注意喚起が例年公表されていた。

参考資料

- 1) AFSSA : AVIS, de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la présence d'alcaloïdes (atropine* et scopolamine) en tant que substances indésirables dans la farine de sarrasin destinée à la consommation humaine et à la pertinence du seuil de gestion provisoire proposé par la DGCCRF <http://www.afssa.fr/Documents/RCCP2008sa0221.pdf>
- 2) L. Perharič, G. Koželj, B. Družina and L. Stanovnik, Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: a case study from Slovenia, *Food Addit Contam: Part A* 2013;**30**(2):321-30
- 3) EFSA : Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2013;11(10):3386 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3386.htm>
- 4) オーストラリア・ニューサウスウェールズ州食品局 (The NSW Food Authority) : Pine nuts & pine mouth

<http://www.foodauthority.nsw.gov.au/science/risk-framework-and-studies/food-risk-studies/pine-nuts-and-pine-mouth/>

5) Kwegyir-Afful EE et.al., An investigational report into the causes of pine mouth events in US consumers.

Food Chem Toxicol 2013;**60**:181-7.

6) BfR : More knowledge needed to ensure safe use of botanicals in food

<http://www.bfr.bund.de/cm/349/more-knowledge-needed-to-ensure-safe-use-of-botanicals-in-food.pdf>

D. 結論

本研究では、自然毒（植物性）を含む食品、あるいは有毒な植物及びキノコの食品への混入に関連した、事例、規制、消費者への注意喚起等に関する海外の情報を調査した。

海外では、食品に使用してはいけない植物を規制しリスト化している国（例：FSANZ、ベルギー）があった。特に、フードサプリメントへの有毒植物の使用を強く懸念していた。

実際に食品への混入が報告され、各国で注意喚起が公表されている点をふまえると、食品安全上の対策として注意を向けるべきと考えられたのは、ビターアプリコットカーネルのアミグダリン、穀類や豆類へのトロパンアルカロイド含有植物の混入、ハーブティー等へのピロリジジナルカロイド含有植物の使用であった。特に、トロパンアルカロイド及びピロリジジナルカロイドについては、EU でモニタリング対象となっている。また、症例報告等で中毒が報告されている蜂蜜中のグラヤノトキシンに

についても健康被害を生じる懸念があり注意が必要であると考えられる。他に、red kidney beans 等のレクチン、ジャガイモ中のグリコアルカロイド、青酸配糖体については、複数国が自然毒関連の専用ウェブサイトで注意喚起や情報提供を行っていた。さらに、フードサプリメントに使用される可能性を考慮し、販売前に十分な調査もされずに有毒植物が利用されることのないよう何らかの対策が必要である。

以上のように、食品に含まれる可能性のある自然毒に関する海外での対応状況を調査したことにより、今後注意を向けていくべき自然毒を特定した。これらの情報は、ヒトの健康に有害な食品が海外から入って来ないようにするための予防に役立つことが期待できる。

E. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) 登田美桜：管理栄養士・栄養士のための食品安全・衛生学 ,3.7自然毒食中毒, 日佐和夫, 仲尾玲子編著, (株)学文社 (2014) pp.64-71
- 2) 登田美桜：食品危害要因 その実態と検出法, 第 編第1章第4節有毒な高等植物, 後藤哲久, 佐藤吉朗, 吉田充監修, テクノシステム(2014) pp. 171-177
- 3) 畝山智香子、登田美桜：10年間の食品安全情報で収集した「いわゆる健康食品」についての海外情報の傾向について, 日本食品安全協会会報(2014)9(3), 32-35

2. 学会発表

- 1) Toda M, Uneyama C, Kasuga F :
Trends of tetrodotoxin poisonings
caused by puffer fish in Japan. 2014
Eurotox, エジンバラ .
- 2) 登田美桜：日本の植物性自然毒による
食中毒発生状況について .平成 26 年度
地方衛生研究所地域専門家会議（九州
ブロック）, 2014 年 10 月, 鹿児島市 .

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

H26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
登田 美桜	3.7 自然毒食中毒	日佐和夫, 仲尾玲子編著	管理栄養士・栄養士のための食品安全・衛生学	(株)学文社	東京都	2014	64-71
登田 美桜	第 編第1章第4節 有毒な高等植物	後藤哲久, 佐藤吉朗, 吉田充監修	食品危害要因 その実態と検出法	(株)テクノシステム	東京都	2014	171-177

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
Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M.	Characterization of blaTEM-52 -carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing Salmonella enterica isolates from chicken meat with a common supplier in Japan.	Antimicrob. Agents Chemother	Dec;58(12)	7545-7547	2014
Yumiko Okada, Shuko Monden, Hodaka Suzuki, Akiko Nakama, Miki Ida, Shizunobu Igimi.	Antimicrobial susceptibilities of Listeria monocytogenes isolated from the imported and the domestic foods in Japan	Journal of Food and Nutrition Sciences	Vol. 3	70-73	2015
Sayaka Asahata, Yuji Hirai, Yusuke Ainoda, Takahiro Fujita, Yumiko Okada, Ken Kikuchi.	Fourmier's gangrene caused by Listeria monocytogenes as the primary organism.	Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology	In press.		2014
Toyofuku, H.	Prevalence of Foodborne Diseases in Western Pacific Area.	Encyclopedia of Food Safety. Elsevier	Volume 1	312-322	2014
A. Depaola and H. Toyofuku.	Safety of Food and Beverages: Seafood.	Encyclopedia of Food Safety	Volume 3	260-267	2014
Y. Sasaki, M. Haruna, T.Mori, M. Kusakawa, M.Murakami, Y.Tsujiyama, K. Ito, H.Toyofuku, Y.Yamada.	Quantitative estimation of Campylobacter cross-contamination in carcasses and chicken products at an abattoir.	Food Control	43	10-17	2014
豊福肇	コーデックスの食品中の微生物規準の設定と適用に関する原則の攻訂.	Milk Science	63(3)	157-158	2014
豊福肇	義務化を見据えて動き出した日本のHACCP普及動向～柔軟性を持たせたHACCP導入とは～	月刊HACCP	1月号		2015
豊福肇	「HACCPを中心とする国際規格の海外の状況と国内におけるHACCP導入の課題」	獣医公衆衛生研究 (全国公衆衛生獣医師協議会)	vol.17-2 (印刷中)		2015
畝山智香子、登田美桜	10年間の食品安全情報で収集した「いわゆる健康食品」についての海外情報の傾向について	日本食品安全協会会報	9(3)	32-35	2014
投稿準備中 (Kondo, K. クサウラベニタケ分類およびPCR-RFLP法)					