

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24～26年度総合 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. 研究成果の刊行一覧

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. 分担研究報告書

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 19

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 27

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 51

6. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

登田 美桜 59

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 69

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 24～26 年度総合総括研究報告書

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

研究要旨

細菌類に関しては、海外より食品あるいは海外渡航者を通じて侵入し、国内で突発的な食中毒の発生を予防する、あるいは適切な対応をとるための施策について研究するために研究を行った。公衆衛生上重要な感染症であるサルモネラ症、赤痢、コレラや海外での集団発生事例も多く致死率が高いものの潜伏期間の長さから原因食品を特定しにくくいリステリア症について、国内侵入に対する対応のために海外での流行情報収集と分離菌株の解析手法（PFGE、MLVA など）、解析データの収集とデータベース化を行った。また、食中毒アラート情報等を INFOSAN Emergency や RASFF より収集解析した。リスク評価モデルとして RiskRanger や iRisk の統計的手法を用いて、国内に侵入可能性のあるハザードと食品の組み合わせを相対リスクとして推定した。

自然毒に関しては、毎年発生する食中毒被害の低減のための検査法開発を行うとともに中毒事例を解析した。きのこ毒に関しては、中毒事例が特に多い 2 つのきのこ（クサウラベニタケとツキヨタケ）の分子系統樹解析を行い、迅速検査法 PCR-RFLP 法および確定検査補定性リアルタイム PCR 法を開発した。高等植物に対しても同様に、中毒が多い植物（チョウセンワガオ、バイケイソウ、トリカブト、スイセン）に対して迅速検査法 PCR-RFLP 法およびバーコード法による判別法を開発した。

研究分担者

泉谷 秀昌 （国立感染症研究所 細菌第一部）
岡田由美子 （国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）
豊 福 肇 （山口大学共同獣医学部 教授）
紺野 勝弘 （富山大学和漢医薬学総合研究所 客員教授）
登田 美桜 （国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部）

A. 研究目的

細菌関係では、グローバル化に伴う人および食品の移動は、感染症アウトブレイクの発生時に大きな影響を与える。途上国ではインフラ整備が不十分なことから、飲料水・食品を介して主として渡航者経由でわ

が国にも侵入している。今後、このほかに輸入食品による国内発生も十分考慮すべき問題である。こうした海外での事例の情報収集を行い、国内侵入時の対応に備えることを目的し、特に、国内外の流行菌型の情報収集に力点を置き、それらの特徴を比

較・照合するなど、菌側の情報を活用することで、国内侵入を阻止する、または侵入時に速やかに検査等で対応できるようにすることは重要である。

自然毒関係では、自然毒においては、誤食の原因となる誤った鑑別や食中毒発生後の検査での原因食品の品種確定ができないことをなくすため、遺伝子の特異的な塩基配列に基づいた鑑別法を開発し整備することで、国内で発生する食中毒リスクを低減することができる。これらの研究を行うことができる。そのために必要を行う。

B. 研究方法

細菌・ウイルスによる食中毒リスクに関する海外情報収集や統計的手法によるリスク評価解析を豊福班員が担当した。細菌について、主にサルモネラ、赤痢菌、ナグビブリオなどを中心に情報収集並びに収集した分離菌株の解析を泉谷班員が、リステリアについて、情報収集と食品および患者分離株の解析と結果のデータベース化を岡田班員が担当した。

自然毒について、海外でリスクが懸念されている食品中の自然毒に関する情報収集と解析、および、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ことからアンケート調査を登田班員が担当した。きのこおよび高等植物の鑑定のための新たな遺伝子判別法の開発およ

び中毒事例の解析を近藤班員、紺野班員が担当した。研究代表者は、全体のとりまとめを行った。

C. 研究結果と考察

1. 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

INFOSAN Emergency、INFOSAN 報告書から事例研究を行った。2012年から2015年2月に病原微生物によるアラート情報が提供された事例はサルモネラ5件、ノロウイルス1件、A型肝炎(HAV)ウイルス1件、*Listeria monocytogenes* (以下リステリアという)1件であった。輸入されていた場合、事前情報無しでは、これらの食品と微生物の組み合わせに関する微生物規格やモニタリング計画はないため、国内侵入を阻むことはいずれの事例でも困難と考えられた。また、RASFFによる通報事例を調査研究したところ、ハザード別ではノロウイルスが18と最も多く、次いでサルモネラ、ヒスタミンが各10、HAV7、STEC O157:H7 とボツリヌスが各2件であった。

統計的手法を用いたリスク評価を行った。web-based のシステムである iRISK では、食品中のハザードのデータから集団レベルの健康 Burden を推定することができることを示した。

2. サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

過去 2-3 年の間に海外で発生した食中毒もしくは集団事例の中から、輸入食品もしくは複数国が関連した事例をまとめた。20 事例のうち 18 事例がサルモネラによるものであった。鶏肉、七面鳥など比較的良好とみられる原因食品よりも、果物、魚介類、ナッツ類などの食品が原因となることの方が多かった。赤痢菌分離株の解析について、わが国での細菌性赤痢の多くは海外渡航による輸入例であるが、国内例も少なからず発生している。解析には、*S. sonnei* については PFGE よりも MLVA の方が解像度が高いことが示された。ナグビブリオ食中毒事例株の解析について、2013 年 9 月から 10 月にかけてナグビブリオ O144 による食中毒事例について調査解析した。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。

3. 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

食品や患者に由来する *Listeria monocytogenes* 合計 130 菌株について PFGE 解析を行った。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。2009～2015 年に諸外国で発生した主なリステリア症集団事例は 22 例であった。原因食品は乳製品が 11 例、食肉製品が 4 例、野菜が 2 例、果物類が 2 例、その他の食品が 3 例、不明が 2 例であった。

4. 自然毒関連の食品安全情報の収集解析

海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について、欧州各国及び豪州・ニュージーランドにおいて、食品及びフードサプリメントに使用又は混入する可能性があり、健康への有害影響が懸念されている高等植物及びきのこのリスト、我が国で自生又は栽培されている可能性がある有毒な高等植物のリストを解析することで、食品への混入を懸念すべき高等植物が特定できただけでなく、優先順位をつけることもできた。中でも、幻覚性キノコは注意が必要である。RASFF データベースの調査解析から、1982～2014 年 12 月 25 日の通知として 157 件が確認できた。

消費者の「食品に関する問題の不安」についての情報として、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 段階で調査した結果、自然毒については 56%のみで、行政的に管理され推定されるリスクも低い輸入食品や残留農薬よりも、毎年食中毒が発

生し死者も出ている自然毒の方が不安に感じる人の割合が低く、問題であると考えられた。「行政による情報提供の仕方」について、消費者の視点から、行政機関がどのような方法で消費者に向けて情報提供すれば効果的であるのかを調査した。小中学校での教育が効果的であるとの回答が多かった。

5. 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

毒のクサウラベニタケ(*E. rhodopolium*)は、形態的には多様性が報告されているものの、これまで遺伝子配列に基づいた分類解析は行われていなかった。今回、全国から集めた試料の ITS 領域解析結果から、日本におけるクサウラベニタケは3系統に分けられいずれも食用のウラベニホテイシメジとも異なることが判明した。系統樹解析の結果をもとに、迅速で簡便な判別法として、電気泳動の泳動パターンで判別する PCR-RFLP 法を、中毒事例の多いクサウラベニタケおよびツキヨタケについて開発した。DNA が断片化されている調理加工食品残渣にも適応できるように改良した。さらに、確定検査のためにリアルタイム PCR 法を開発し、食毒判別と系統分類が可能な方法を構築した。

6. 植物毒の毒性評価と毒成分分析

植物毒による食中毒を未然に防ぐ事を目的に、「自然毒のリスクプロファイル」の改

定を行った。中毒事例の現地調査を行った。トリカブトとニリンソウとの誤った判定で、機器分析からアルカロイドを定量し、アコチニンなどのアルカロイドを検出した。また、青森県でのチョウセンアサガオによる食中毒事例を調査した。簡便な遺伝子判別法として、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、ニラを判別するための PCR-RFLP 法を構築した。本方法は、青森県の中毒事例でも活用され、判別に用いることができた。

D. 結論

細菌類について、事例研究から、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が必要である。赤痢菌の解析のほか、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 PFGE および MLVA の有効性を検討し、一定の成果は得られた。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。食品由来株は血清型によりクラスターが形成される傾向が見られたが、患者由来株は

必ずしも同様の結果を示さなかったため、さらなるデータの蓄積が必要と思われた。

自然毒について、欧州及び FSANZ の公表資料・規制の情報をもとに、食品への混入・使用を懸念すべき高等植物・きのこをリスト化して特に注意を向けるべきものを特定した。消費者意識のアンケートから、食中毒の原因となる自然毒に関して消費者が正しく認識していないことが示唆された。きのこについて、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。ツキヨタケとともに、これら毒性を持つ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。また、定性リアルタイム PCR 法を開発した。高等植物についても、PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑別法により、迅速・簡便な有毒植物鑑定法を確立した。実際の中毒事例にも適応できることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

個別の報告書に記載

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 24～26 年度総合分担研究報告書

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。毎年、欧米を中心に輸入食品もしくは多国間にまたがる食中毒事例が報告されており、その多くはサルモネラを原因物質としていた。わが国で海外からの侵入が危惧される食水系細菌の一つである赤痢菌は毎年 100 例前後の患者を発生させている。これら分離菌株について MLVA などの分子疫学解析手法を検討し、*Shigella sonnei* についてはこれまでに 900 株近い MLVA データベースを構築できた。また、海外からの輸入食材によって食中毒が発生したナグビプリオについても、分子疫学的解析手法について検討を行った。

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、2001 年カキ、2008 年イカを原因食品とする食中毒事例など、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

する。また、2013年に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

・海外食中毒情報

過去 2-3 年の間に海外で発生した食中毒もしくは集団事例の中から、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。表 1 に上げた 20 事例のうち 18 事例がサルモネラによるものであった。鶏肉、七面鳥など比較的良好とみられる原因食品よりも、果物、魚介類、ナッツ類などの食品が原因となることの方が多かった。また、中米、中東などの比較的天上国に由来する原因食材によるものも見られた。例えば、事例#3 は、インドから輸入されたマグロを原因食品とした事例であり、血清型も *S. Bareilly* および *Nchanga* と複数の型の菌によって汚染されていた。こうしたわが国ではあまり見かけない食材、血清型による食中毒については、今後も注視していく必要がある。

・赤痢菌分離株の解析

表 1 事例#20 にもあるように、輸入食品によ

る細菌性赤痢食中毒が海外でも発生している。2007 年にもタイ産ベビーコーンを原因食とした赤痢菌食中毒が発生したことがあり、オーストラリア、欧州などが影響を受けた。わが国でも 2001 年に輸入カキ、2008 年に輸入イカを原因食品とする赤痢菌食中毒が発生した。わが国での細菌性赤痢の多くは海外渡航による輸入例であるが、国内例も少なからず発生している。輸入例と国内例との関連性を調べることは、原因不明の国内例に関して原因究明を行う際の一助となりうる。

赤痢菌には *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* の 4 菌種があり、わが国で発生する患者は *S. sonnei* もしくは *S. flexneri* がほとんどである。*S. sonnei* については PFGE よりも MLVA の方が解像度が高く、本研究でもその有用性を示唆するデータが得られている。一部の菌株については、輸入例の渡航地域と MLVA (および PFGE) クラスターとの相関性が示唆されているが、データベース上のデータを増やすことでその精度を上げる試みを行っている。2012-2014 年の間に約 200 株の *S. sonnei* 株を解析し、データベースに追加した。これまでのデータベースへの登録数は約 900 である。*S. sonnei* 解析で比較的良好とされる 8 遺伝子座 (SS1,3,6,9,10,11,13,23) を用いた全体の minimum spanning tree (MST) は図 1 上のようになった。ここでは 2 遺伝子座違いのバリエーション (double locus variant) を 1 つにまとめており、比較的大きな DLV クラスターが 3 つあった。A は南アジア由来株が多く占め、B は 2012 年レストランチェーン店による国内集団事例が含まれていた。C は南アジア以外の多くの地域からの株を含んでおり、遺伝子座を追加することでより詳細に分析することが必要である。現在 20 余りの遺伝子座を試験的に使用し

ているが、例えば、Ss5 遺伝子座を追加してクラスターCを再解析すると、2010年広域国内流行株、2012年トルコツア-事例関連株、2004年ハワイ機内食事例関連株などが別クラスターになる(図1下)。このように、各遺伝子座の分解能についての評価も今後の課題であろう。

・ナグビブリオ食中毒事例株の解析

2013年9月から10月にかけてナグビブリオO144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2)。これらの株を対象にMLVAを適用した。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、患者株の大半を占め、起因菌と考えられた血清群O144株は全て同じタイプであった(図3)。また、PFGEが患者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。

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PFGEおよび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。赤痢菌については、地域によっては供試菌株数が少ない点もあるが、南アジア、東南アジア輸入例を中心に900株程度のデータベースが構築された。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

原著論文

- 1: 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.
- 2: Chiou CS, Izumiya H, Thong KL, Larsson JT, Liang SY, Kim J, Koh XP. A simple approach to obtain comparable *Shigella sonnei* MLVA results across laboratories. *Int J Med Microbiol.* 2013 Dec;303(8):678-84.
- 3: Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group, Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results. *Euro Surveill.* 2013 Aug 29;18(35):20566.
- 4: Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P; MLVA Harmonization

- Working Group. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. Euro Surveill. 2013 Aug 29;18(35):20565. Review.
- 5: 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.
- 6: 緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志、荒川英二、泉谷秀昌、大西真：ナグビブリオによる食中毒事例について - 大分県。IASR、第 35 巻、134-135、2014 年 5 月
- 7: 泉谷秀昌、荒川英二、森田昌知、大西真：2013 年 9～10 月に発生した食中毒事例において分離されたナグビブリオ株について。IASR、第 35 巻、136、2014 年 5 月

学会発表

- 1: 泉谷秀昌、多田有希、伊藤健一郎、齊藤剛仁、大西真：Shigella sonnei における分子疫学解析について。第 86 回日本感染症学会総会、2012 年 4 月、長崎県長崎市。
- 2: 佐々木麻里、成松浩志、緒方喜久代、荒川英二、森田昌知、泉谷秀昌、大西真：ニシ貝を原因食品とするナグビブリオによる食中毒の事例解析。第 48 回腸炎ビブリオシンポジウム、2014 年 11 月、北海道函館市。

F. 知的所有権取得状況

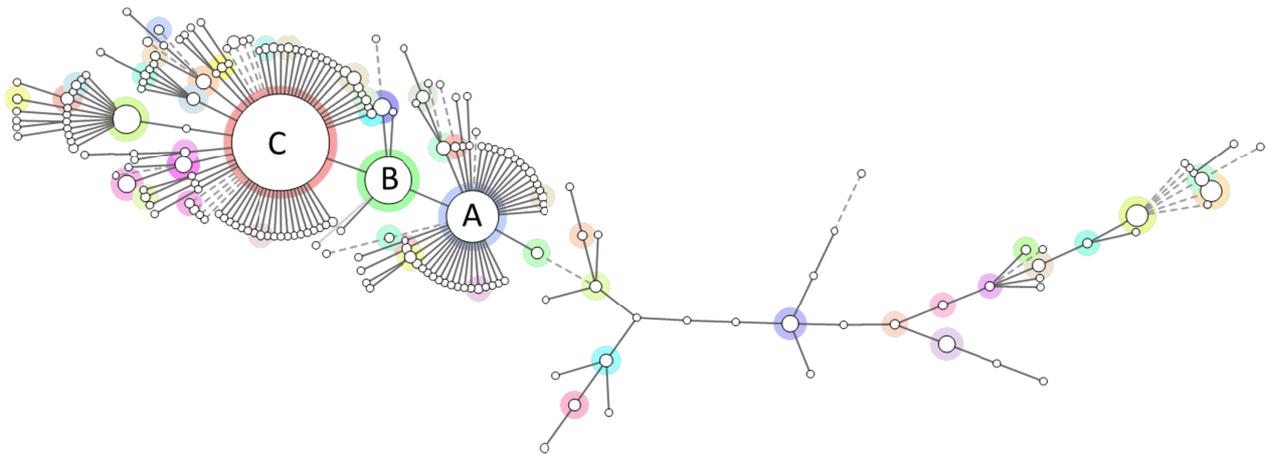
- 1 特許取得
なし
- 2 実用新案
なし
- 3 その他
なし

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
#1	2012年10月	<i>Salmonella</i> Thompson	スモークサー モン	オランダ	~1000	3	オランダおよび 米国でリコール
#2	2012年7月-9 月	<i>Salmonella</i> Braenderup	マンゴー	米国	127		メキシコでパッ ク
#3	2012年1月-7 月	<i>Salmonella</i> Bareilly, Nchanga	マグロ	米国	425		インドから輸入
#4	2011年8月-12 年9月	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥	オーストリ ア、ハンガ リー他7か 国	421		
#5	2011年12月	<i>Salmonella</i> Newport	スイカ	英国、ドイ ツ他6か国	54	1	
#6	2011年8月-12 月	<i>Salmonella</i> Bovismorbifica ns	タヒーニ(ゴマ ペースト)	米国	23		レバノンの製造 業者、カナダで も患者発生
#7	2011年7月-10 月	<i>Salmonella</i> Enteritidis	パインナッツ	米国	43		トルコ産
#8	2011年1月-8 月	<i>Salmonella</i> Agona	パパイア	米国	106		メキシコから輸 入
#9	2008年2月-10 月	<i>Salmonella</i> Agona	ファストフー ド	イギリス、 アイルラン ド他7か国	163	2	アイルランド A 社
#10	2013年5月	<i>Salmonella</i> Montevideo, Mbandaka	Tahini(ごま ペースト)	米国	8		トルコから輸入
#11	2013年4月	<i>Salmonella</i> Saintpaul	キュウリ	米国	81		メキシコから輸 入
#12	2013年4月	サルモネラ	ペットフード	米国			米国から輸出
#13	2013年3月	<i>Salmonella</i> Typhimurium	ペットフード	米国			米国から輸出
#14	2013年5月	<i>Salmonella</i> Saintpaul 他	カメ	米国	391		米国から輸出
#15	2013年8月	腸炎ビブリオ	ウニ	日本			中国から輸入
#16	2013年10月	<i>Salmonella</i> Heidelberg	鶏肉	米国、プエ ルトリコ	430		米国から輸出

#	時期	起因菌	推定原因食品	発生国	患者	死者	その他情報
#17	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
#18	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
#19	2011-2013年	<i>Salmonella</i> Stanley	七面鳥肉	欧州	234		PFGE一致例
#20	2011年10月	<i>Shigella 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.(上)8か所の遺伝子座を用いた MLVA 全体像。DLV を1つにまとめて表示してある。
(下) クラスターCを Ss5 遺伝子座を加えて再解析した結果。



2010広域散発

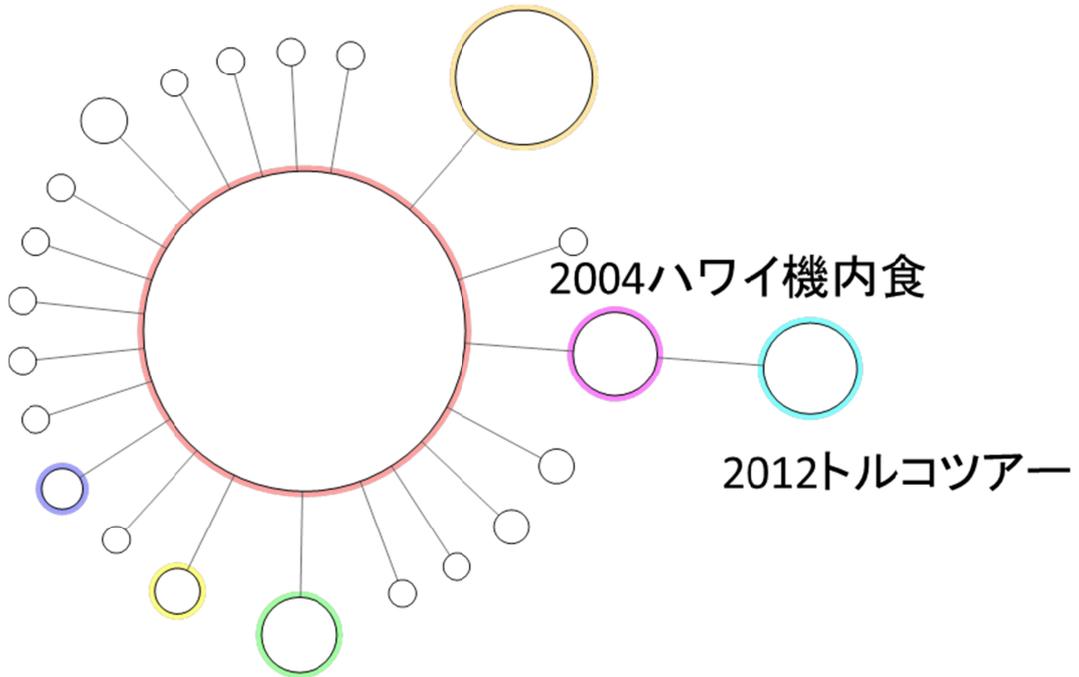


図 2 . ナグビブリオによる食中毒事例関連株の PFGE 解析。患者株には下にバーを付けてある。それ以外は食品由来株。使用制限酵素は *NotI*。

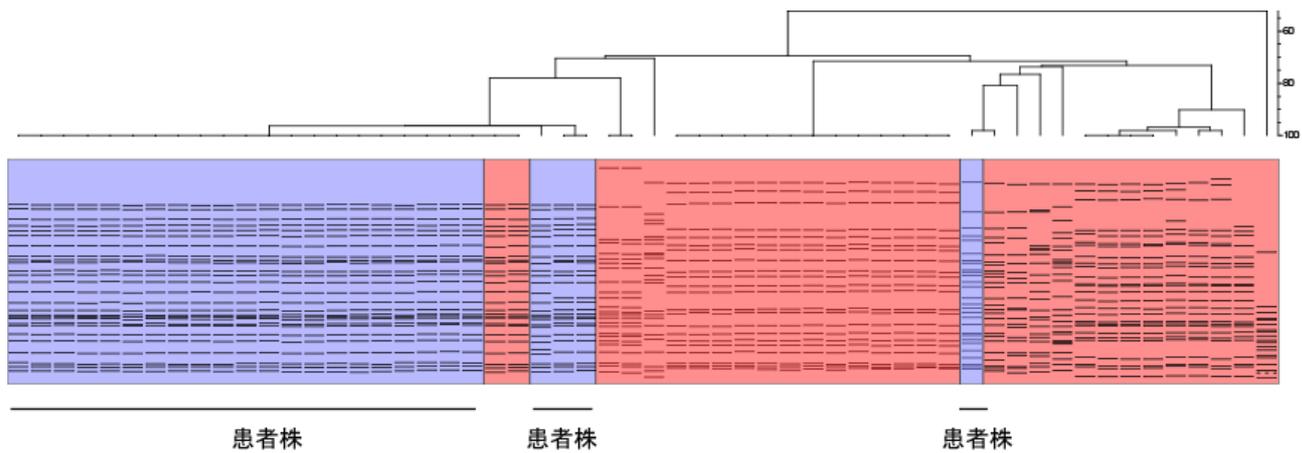
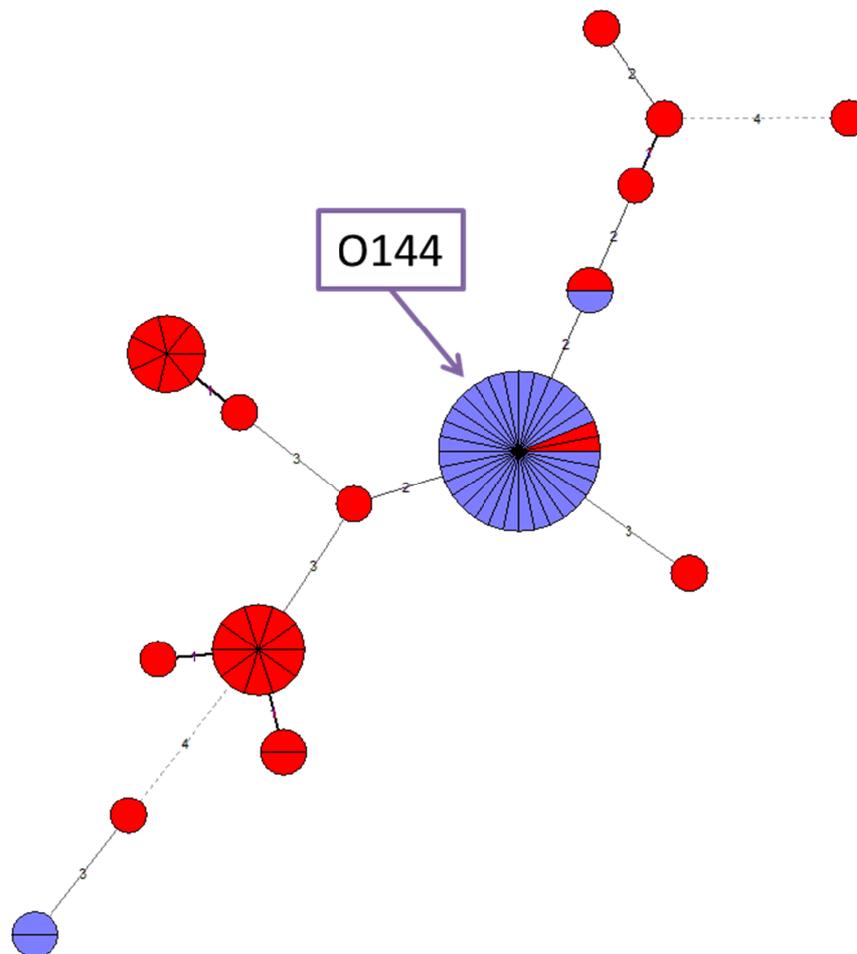


図 3 . ナグビブリオによる食中毒事例関連株の MLVA の結果。



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 24～26 年度総合分担研究報告書

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

研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
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
	門田 修子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	鈴木 穂高	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨

汚染食品の摂取により人に媒介されるリステリア症は、グラム陽性の短桿菌である *Listeria monocytogenes*(リステリア)を原因とする。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、食品製造環境における汚染の排除が難しい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。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、欧州では数年に一度、北米では年に数回の頻度で発生しており、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、リンゴ菓子等が知られている。現在日本国内で発生しているリステリア症はその大半が散发例であり、潜伏期間が1か月から最長3か月と長期にわたるため、原因食品の同定は大変困難である。

現在国内では、腸管出血性大腸菌症や赤痢等について、集団事例の同定や原因食品特定のための分子疫学的解析が実施されており、国際的にも同様の手法が米国 Center for Disease Control and Prevention(CDC) を中心に行われている。本研究では、平成 24 年度より海外から食品を通じ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、国内散发例の原因食品究明に役立て得るデータベースの作成を目的として、CDC で用いられている手法に基づくプロトコールを作成して食品及び患者由来菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析を実施した。その結果、得られたクラスターが血清型との相関が高いことが示された一方で、同一検体由来の複数の菌株においても識別が可能であり、株の同一性を高感度に示せることが明らかとなった。

A. 研究目的

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 *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、その患者数は明らかでない。2004年に国立医薬品食品衛生研究所により実施されたアクティ

ブサーベイランスでは、年間約80例と推定された。また、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は、2008 - 2011年の患者数は307例で、人口100万人当たりの推定罹患率は約1.6人であった。一方集団事例については、日本国内ではこれまで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。健康成人では非侵襲性リステリア症にとどまることが多いが、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では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发事例で原因食品が特定されることはほとんどない。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過去の研究で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

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。また、海外における集団事例について、原因食品、患者数等の情報収集を行った。

B. 研究方法

1. 検体

初年度には、日本国内で分離された *L. monocytogenes* 64 菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株 3 株、国内産食品由来株 42 株及び輸入食品由来株 17 株、調理環境由来株 1 株及び標準菌株(ATCC19115 株)1 株であった(平成 24 年度報告書 表 1)。次年度には、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(平成 25 年度報告書 表

1)。最終年度には、平成 25 年の CDC プロトコルの改正に伴い実施方法の改変と、総括的な結果解析のために過去 2 年に実施した株も含めて再検討を行うこととし、*L. monocytogenes* 合計 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(平成 26 年度報告書 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

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作成し、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(平成 25 年度報告書 別添 1)。この方法により、研究室保有株よりプラグを作成し、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

平成 24 年 4 月から平成 27 年 2 月までの期間での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* 合計 130 菌株について PFGE 解析を行った。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(平成 26 年度報告書 表 2)。二種類の制限酵素のどちらを用いた場合でも、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(平成 24 年度報告書 図 1、平成 25 年度報告書 図 1、平成 26 年度報告書 図 1 及び 2)。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(平成 26 年度報告書 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

2009 ~ 2015 年に諸外国で発生した主なリステリア症集団事例は 22 例であった。原因食品は乳製品が 11 例、食肉製品が 4 例、野菜が 2 例、果物類が 2 例、その他の食品が 3 例、不明が 2 例であった(表 1)。発生国は米国、カナダ、デンマーク、オーストリア、ドイツ、チェコ、スイス、イギリス、フィンランド、オーストラリアであった。

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る。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、散発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。そのためには、海外で標準的に実施されている解析方法を国内でも用いる必要があり、解析手法の改定について常時情報を収集する必要があると思われた。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。作成した系統樹から、食品由来株は血清型によりクラスターが形成される傾向が見られたが、患者由来株は必ずしも同様の結果を示さなかったため、さらなるデータの蓄積が必要と思われた。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

原著論文

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.

ISOLATED FROM IMPORTED
AND DOMESTIC FOODS IN
JAPAN FAVA2013 (2013.1)

学会発表

1. Okada Y, Monden S, Suzuki H,
Nakama A, Ida M, Yamamoto S,
Igimi S. ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITIES OF
LISTERIA MONOCYTOGENES

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 2009 年から 2015 年 2 月までに海外で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	流産
USA	2009	米国産チーズ	18	不明	
USA	2009	米国産チーズ	8	不明	
オーストリア・ドイツ・チェコ	2009～2010	サワーミルクチーズ (quargel)	34	8	
デンマーク	2009	宅配の牛肉料理	8	2	
USA	2010	豚のヘッドチーズ	8	2	
USA	2010	セロリ	10	5	
USA	2010	未定 (病院食)	4	不明	
USA	2010	米国産チーズ	6	不明	
スイス	2011	イタリア産加熱ハム	6 (+3 疑い例)	不明	
イギリス	2011	病院食のサンドイッチとサラダ	3	不明	
USA	2011	カンタロープメロン	147	33	
USA	2011	ブルーチーズ	15	不明	
フィンランド	2012	調査中	12	0	
USA	2012	イタリア産チーズ	22	2	1
オーストラリア	2013	チーズ	18	2	1
USA	2013	米国産チーズ	6	1	1
USA	2014	米国産チーズ	8	1	
デンマーク	2013～2014	デリミート	41	17	
USA	2014	もやし	5	2	
USA	2013～2014	チーズ	3	1	
USA・カナダ	2014	キャラメルアップル	34	6	
USA	2015	チーズ及びサワークリーム	3	1	

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。

また、既存のリスク評価モデルである「Risk Ranger」を用い、国内に侵入する可能性のあるハザードと食品の組み合わせについて、相対リスクを推定することによるリスクランキングを行い、水際対策の優先順位決定に役立てることができると考えられた。

さらに、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

国内に侵入する恐れのある致死性の高い細菌・ウイルスの検査。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及び分析法開発を行うことを目的とした。

特に、世界保健機関（WHO）と世界農業機構（FAO）が行っている INFOSAN：国際食品安全当局ネットワーク（The International Food Safety Authorities Network）において、国際的な緊急(alert)情報が関係国に送信された事例を基に、我が国における国内侵入の可能性、侵入後の対応の課題等について検討した。

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。

また、既存のリスク評価ツールを用いて、食品とハザードの組合せについて、リスク推定ができるか検討した。

B. 研究方法

2012 年から 2015 年 2 月に INFOSAN Emergency から緊急情報が提供された事例（表 1）について、疫学、微生物学的情報を調べるとともに、我が国への侵入を水際で阻止できるか、国内でこれらの食品による食中毒を検出できるか、また国内侵入後

の対策の課題等について、事例研究を行った。

また、既存のリスク評価モデルである「Risk Ranger」を用い、国内に侵入する可能性のあるハザードと食品の組み合わせについて、相対リスクを推定することによるリスクランキングを行った。

さらに web 上で使用できる確率論的リスク評価ツールである irisk 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。

2012年から2015年2月に病原微生物によるアラート情報が提供された事例はサルモネラ5件、ノロウイルス1件、A型肝炎(HAV)ウイルス1件、*Listeria monocytogenes* (以下LMという)1件であった(表1)。これらの食品は我が国には輸入されていなかった。

仮に我が国に輸入されていた場合、事前情報無しでは、これらの食品と微生物の組み合わせに関する微生物規格やモニタリング計画はないため、輸入時の検査を実施していないこと等から、輸入時に国内侵入を阻むことはいずれの事例でも困難と考えられた。

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2 地域別イベント数

地域別	INFOSAN Emergency イベント		
	2011年 : 46	2012年 : 42	2013年 : 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

地域調整事務所別では、アフリカ、ヨーロッパ及び西太平洋の事務所でのアラート発生が多かった。(表2)

緊急アラート情報が多い食品は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 3)

通報原因となったハザードとしては過去

3 年間 *Salmonella* 属菌が最も多く、次いで LM、HAV 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。(表 4)

表 3 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
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

表 4 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
A 型肝炎 Virus	1	0	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	2	5
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

2. 欧州の RASFF の解析

2012、13 年の食中毒関連の通報事例を表 5 に示した。

ハザード別では Norovirus が 18 と最も多く、次いで *Salmonella*、Histamine が各 10、HAV7、STEC O157:H7 とボツリヌスが各 2 件であった。

表 5 RASFF で微生物による食中毒でアラートが発せされた事例(2012 及び 13 年)

年	ハザード	食品	患者	原産国
13	不明	卵	13	スペイン
13	不明	卵	13	スペイン
12	<i>Clostridium botulinum</i>	オリーブ	1	イタリア
13	不明	卵	13	スペイン
12	<i>Clostridium botulinum</i>	オリーブ	1	イタリア
13	<i>Clostridium botulinum</i>	アーモンドピュレ	1	仏
13	<i>Clostridium perfringens</i>	豚骨付き肉	2	イタリア
13	HAV	イガイ	?	スロベニア
13	HAV	チルドカキ	1	仏及び蘭
13	HAV	冷凍ベリー	4	イタリア、原材料はブルガリア、カナダ、ポーランド、セルビア

年	ハザード	食品	患者	原産国
13	HAV	冷凍いちご	90	モロッコ、エジプト(ベルギーで包装)
13	HAV	?	16	アイルランド
13	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)
13	HAV	冷凍ミックスベリー	1	ブルガリア、ポーランド
13	LM	未殺菌羊乳チーズ	3	仏
12	Norovirus	カキ	4	アイルランド(蘭)経由
12	Norovirus	冷凍いちご	11200	中国
12	Norovirus	カキ	15	仏
13	Norovirus	活はまぐり	5	ポルトガル
13	Norovirus	チルド活カキ	9	フランス
13	Norovirus	チルドカキ	9	仏
13	Norovirus	カキ	1	仏
13	Norovirus	はまぐり	12	ポルトガル
13	Norovirus	冷凍ラズベリー	29	ポーランド
13	Norovirus	カキ	8	スペイン
13	Norovirus (G II)	カキ	9	仏
12	Norovirus (G I& II)	カキ	18	アイルランド(仏)経由
12	Norovirus (G I& II)	カキ	20	アイルランド(仏)経由
13	Norovirus (GI)	冷凍ラズベリー	13	ポーランド(原材料はセルビア)
13	Norovirus (G I&G II)	チルドカキ	5	仏
13	Norovirus (G I&G II)	チルドカキ	10	蘭
13	Norovirus (G I&G II)	カキ	37	スペイン(蘭経由)
13	Norovirus (G I&II)	チルド活カキ	3	フランス
12	<i>Salmonella</i>	食肉製品	3	ルーマニア
12	<i>Salmonella Bredeney</i>	ピーナッツバター	41	米国
12	<i>Salmonella</i> Dublin	未殺菌乳を使ったチーズ	多数	仏
13	<i>Salmonella</i> Enteritidis	卵	49	スペイン
12	<i>Salmonella</i> Group D	液卵	1	仏、UK経由

年	ハザード	食品	患者	原産国
12	<i>Salmonella</i> Newport	スイカ	2	ブラジル
13	<i>Salmonella</i> Rissen	乾燥有機クロレラ	1	中国（英国経由）
13	<i>Salmonella</i> spp.	冷凍塩漬鶏肉	1	タイ（蘭経由）
13	<i>Salmonella</i> typhimurium	加熱ハム	49	英国（原材料はDK）
12	<i>Salmonella</i> Oranienburg	乾燥調製粉乳	16	ベルギー
12	STEC O157:H7	スパイシーミンチ肉	1	ベルギー
13	STEC O157:H7	冷凍ハンバーガー	2	蘭、ポーランド
13	ヒスタミン	マグロロイン	3	スペイン
13	ヒスタミン	マグロロイン	4	スペイン
13	ヒスタミン	冷凍マグロ	4	ベトナム
13	ヒスタミン	チルドマグロロイン	11	スペイン
13	ヒスタミン	生鮮マグロ	4	スペイン
13	ヒスタミン	チルドマグロステーキ	2	スペイン
13	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
13	ヒスタミン	オリーブ油アンチョビ	5	スペイン
13	ヒスタミン	チルドイワシ	2	イタリア
13	ヒスタミン	アンチョビフィレ	2	モロッコ

引用文献：The Rapid Alert System for Food and Feed(RASFF), 2012&2013. Annual Report

3. Risk Ranger

結果については表6のとおりであった。

【考察】

今回、評価対象にした9つの食品—ハザードの組み合わせ中、相対リスクが一番高かったのは輸入二枚貝のNorovirusであり、逆に一番低かったのは輸入ナチュラルチーズのリステリアであった。同じRTEで喫食

直前に加熱工程が無いにもかかわらず、この差が生じたのは、食品中で少ないウイルスコピーでも感染する可能性があるノロウイルス感染症の特徴によるものと考えられた。リステリアは対象にした4つのRTE食品とも相対リスクは22から28と低かった。これは問10で、発症に要する菌数を 10^{10} と想定していることが原因と考えられ、この数値を 10^{10} から 10^9 、 10^8 と変化させることに

より、相対リスクは24から30、35とそれぞれ増加した。一方、質問6の汚染率を元の4.1%から、10%、20%と上昇させてもリスクは元の24から26、28に変化したに留まった。

輸入鶏肉のサルモネラとカンピロバクターは加工工程で加熱し、さらに喫食直前の加熱を想定した場合にはともに相対リスクは52であったが、これを喫食直前に加熱しないと想定した場合には相対リスクはサルモネラとカンピロバクター、それぞれ63、69と増加し、輸入二枚貝のNorovirusの相対リスクを上回った。同じサルモネラでもエビと鶏肉で相対リスクにわずかな差（それぞれ49、52）であったが、これは原材料の汚染率の差によるものと考えられた。

4 . i-risk を用いたリスク評価

米国 FDA 等が開発した iRISK は web-based のシステムで、食品中のハザードのデータから集団レベルの健康 Burden 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 LM 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ィ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 $1 \log_{10} \text{CFU/g}$ の均一分布を適用した。（その結果、初期平均濃度は $0.592 \log_{10} \text{cfu/g}$ となった。）包装単位は製造時、市販時とも 200 g 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 $4 \log_{10} \text{cfu/g}$ 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 $3.34 \log_{10} \text{cfu/g}$ （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、 8.39×10^{-12} 、 4.5×10^{-11} 、 5.34×10^{-14} とした。平均の発症確率はそれぞれの集団で、順に 4.08×10^{-8} 、 1.09×10^{-7} 、 3.08×10^{-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ィ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 $2 \log_{10} \text{CFU/g}$ の均一分布を適用した。（その結果、初期平均濃度は $1.33 \log_{10} \text{cfu/g}$ となった。）包装単位は製造時、市販時とも 500 g 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 10cfu/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 10cfu/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 log10 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 10cfu/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 log10 cfu/g となった。)包装単位は製造時、市販時とも 2.5 Kg とした。チ

ラーでの減少（均一分布で最小 1、最大 2 log₁₀ 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 log₁₀ cfu/g）の減少とし、その結果、最終濃度の平均は -1.000 log₁₀ 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。

国内でのこれら食品によるリスクの上昇を検出するためには、WHO や関係国からの早期情報の入手、*Salmonella* 分離菌の血清型別、PFGE 解析情報の集約・解析、食品及びヒトから分離された Norovirus のシーケンス解析の実施とその情報集約・解析が重要と考えられた。

RASFF では HAV について、従前多かった二枚貝に加え、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。

ノロウイルスについては従来二枚貝を原因食品とするものが多かったが、2013 年には果実等による事例が増えた。果実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。

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、*L. 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。

既存の risk 評価ツールである Risk Ranger から算出される相対リスク値により、輸入食品と病原体の組み合わせにより、リスクランキングを行うことができた。二

枚貝中の Norovirus が最もハイリスクとなった一方、RTE 食品で、喫食直前に加熱工程が無いにもかかわらず、リステリアと各種 RTE 食品の組み合わせが低い相対リスクを示した。この手法により、国内に侵入するおそれのある食品—微生物の組み合わせについて、リスクランキングを行い、水際対策の優先順位決定に役立てることができると考えられた。

また、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：第 44 回コーデックス食品衛生部会参加報告、食品衛生研究 2013 年 3 月号
- 2) 登田美桜, 畝山智香子, 豊福肇, 森川馨：わが国における自然毒による食中毒事例の傾向（平成元年～22 年）食品衛生学雑誌. 2012 . 53(2) p. 105-20.
- 3) 高橋 正弘, 池田 恵, 中村 丁次, 日佐和夫, 豊福肇：*Campylobacter* 食中毒における原因施設および原因食品のリスクランキング設定への疫学的アプローチ. 獣医疫学雑誌. 2012. 16(1). p52-60
- 4) I. Shimada, H. Toyofuku, K. Hisa , S. Numata, M. Kawamura : Analysis of

- Risk Management Reports in Food Service Practical Training Course. Proceeding of the 1st International Conference on Asian Food Safety and Food Security. Osaka, Japan. September 2012
- 5) 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.
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) Hajime TOYOFUKU : *Vibrio parahaemolyticus* Risk Management in Japan. , Molluscan Shellfish Safety, Springer, 2013,p129-136.
 - 9) 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
 - 10) 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、 p 52 - 58
 - 11) 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、 p 24 - 29.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Toyofuku, H: Prevalence of Foodborne Diseases in Western Pacific Area. Encyclopedia of Food Safety. Elsevier. Volume 1, 2014, Pages 312-322
 - 15) A. Depaola and H. Toyofuku: Safety of Food and Beverages: Seafood. Encyclopedia of Food Safety, Volume 3, 2014, Pages 260-267
 - 16) 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
 - 17) 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改訂. Milk Science. (2014). 63(3), 157-8
 - 18) 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
 - 19) 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) Toyofuku, H.: Microbiological risk management of seafood products in the supply chain of Japan. The FFTC-KU Joint International Seminar on “An appropriate System for High Quality and Safe Seafood Production in Asia and Pacific Region”, Bangkok, Thailand 2012. Abstract book. P19-24.
- 2) I. Shimada, H. Toyofuku, K. Hisa , S. Numata, M. Kawamura: Analysis of Risk Management Reports in Food Service Practical Training Course. Abstract book of the 1st International Conference on Asian Food Safety and Food Security. Osaka, Japan. September 2012
- 3) 豊福肇、新武司、田中 千可子、川瀬健太郎、清水俊一、高橋 正弘、日佐 和夫. 食中毒等予防の観点からみた工場監査手法の問題点. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集. p123
- 4) 田中 千可子、豊福 肇、赤堀 正光、高橋 正弘、濱田 奈保子、日佐 和夫. 微生物に起因する食中毒の発生要因(リスク因子)並びに発症時間及び症状に関する研究 平成 18~20 年度食中毒事件調査結果詳報. 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 2012. 09. Page110.
- 5) 豊福肇: 食品中のリステリア規格策定 ~ Codex 等海外動向と国内進捗状況 ~. ifia JAPAN 2012・食の安全・科学フォーラム 第 11 回セミナー. 抄録集 p12
- 6) 豊福肇: コーデックスの数的指標の考え方を採用した、初めての生食用食肉の微生物規格基準 食品安全委員会におけるリスク評価. 第 103 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集. 2012. p28
- 7) 豊福 肇, 柿沼 美智留, 長谷川 専: 改良版 Risk Ranger による食品衛生監視指導の効果の半定量的分析. 第 103 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集. 2012. P79
- 8) 豊福 肇, 柿沼 美智留, 長谷川 専: 食品衛生監視員による監視の高度化に関する研究—Risk Ranger による我が国における食品衛生監視の効果の半定量的分析. 平成 24 年日本獣医公衆衛生学会. 2012. P79
- 9) 池田恵、高橋正弘、中村丁次、豊福肇: ノロウイルス食中毒にける発生頻度の時間的検討. 第 39 回防菌防黴学会; 2012 年 9 月; 東京 . 第 39 回防菌防黴学会学術講演会要旨集 . p.118
- 10) 高橋正弘、池田恵、中村丁次、豊福肇: 食中毒原因食品と病因物質の組み合わせ別のリスクランキング設定への疫学的アプローチ. 第 39 回防菌防黴学会; 2012 年 9 月; 東京 . 第 39 回防菌防黴学会学術講演会要旨集 . p.128
- 11) H. Toyofuku: Data collection for establishing a risk mitigation strategy for *Campylobacter* and *Salmonella* in a broiler slaughterhouse in Okinawa

- Prefecture, Japan. FoodMicro 2012. Istanbul, Turkey. Abstract book. p233.
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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”. 2014.11 月.東京
- 16) 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
- 17) 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

E. 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 24～26 年度総合分担研究報告書

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

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、毒きのこを食用きのこ間違えて摂取することが主な原因である。毒きのこの判別は、形態学的な判別で行われていたが、確実な判別は容易ではなかった。そのため、遺伝子の特定領域を標的とした判定法が望まれている。迅速に判別可能な遺伝子検査法を開発するために研究を行った。まず、標的配列の多様性を明らかにするために、日本国内で中毒被害が多いクサウラベニタケ、ツキヨタケ、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、国内より広くサンプリングし、誤食対象の食用きのことともにリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域の塩基配列を解析した。この結果をもとに分子系統所解析を行ったところ、クサウラベニタケについて、日本国内では3つの系統に分類されることを明らかにした。ツキヨタケは、地域による差異は見られなかった。

本分子系統樹解析結果をもとに、クサウラベニタケとその近縁種、および、ツキヨタケについて、数時間で判別・同定可能な PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を開発し、食毒の判別やクサウラベニタケ近縁種の判別が容易に行うことができた。本法は、特別な機器を必要としないことから広く検査を行うことが可能となる。また、より特異性が高い確定検査法として、リアルタイム PCR 法を同時に開発した。これらの方法は、広く用いられることで自然毒による食中毒被害を低減させることができると期待される。

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、多くの人々がきのこ採取を行い、多くの場合、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、摂取し中毒に至る事例が多い。国内で中毒事例が多いきのこについて

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、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信頼性の高い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ーかどうかを含めて、現在まで詳しく検討されたことはなかった。そこで、本研究班においてクサウラベニタケとその近縁種、および、ツキヨ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行い、系統樹解析を行った。その結果を用いて、生のきのこの判別に有効な PCR-RFLP 法を、また、本方法を改良して加熱調理食品残渣からでも検査可能にした。さらに、特異性、感度に優れた確定法としてリアルタイム PCR 法を確立した。

B. 研究方法

ITS 領域の解析

(1) 試料

日本各地(東京,北海道,山形,島根,鳥取,富山,新潟)で採取したクサウラベニタケおよび福島、茨城、鳥取で採取したウラベニホテイシメジを試料として用いた。

ツキヨタケは、島根県、長野県、新潟県で採取した。ムキタケ、ヒラタケは新潟県、北海道などで採取したものをを用いた

(2) DNA 抽出

試料をよく洗浄し、そのまま、または液体窒素で凍結粉碎後、DNeasy plant mini kit または CTAB 法で抽出を行った。

(3) 分子系統樹解析

ユニバーサルプライマー (ITS-1F, ITS-4B) を用いて ITS 全領域を PCR 増幅し、精製後アガロース電気泳動で得られたバンドを切り出して精製したものをシーケンス解析した。シーケンス解析で得た塩基配列は GENETYX ver12 および CLC Genomic workbench ver6.5 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。

(4) PCR-RFLP 法

クサウラベニタケとその近縁種、ウラベニホテイシメジの検査法

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ケ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、Web ソフト (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。

DNA 抽出は、簡便にするために PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を用いて行った。前述したユニバーサルプライマーで約 1 kb を PCR 増幅後、この PCR 産物をアガロース電気泳動で泳動して、そのパターンから、毒きのこであるクサウラベニタケの 3 系統と食用のウラベニホテイシメジの計 4 系統を判別同定した。DNA 分解がみられる食品残渣試料にも適用するために、約 200 bp の短い領域を標的とした PCR 反応を行い、同様に泳動パターンで食毒判別を行った。疑似食品残渣試料は、加熱後人工消化液処理したものをを用いた。

定性リアルタイム PCR 法は、クサウラベニタケ 3 系統とウラベニホテイシメジの合計 4 系統を同時に判別するために、マルチプレックス PCR とした。4 チャンネル検出のために、検出にはロツシュの LightCycler96 を用いた。毒のクサウラベニタケ 3 系統を区別しないのであれば、食用ウラベニホテイシメジと合わせて 2 チャンネル検出で、汎用されているアプライドバイオシステムの 7900 で測定可能である。

ツキヨタケの検査法

国内から集めた毒きのこであるツキヨタケおよび食用であるシイタケ（栽培、野生）、ヒラタケ、ムキタケのシークセンス解析の結果をもとに、系統判別および食毒判別が可能な制限酵素部位と種類を、遺伝子解析ソフト Genetyx を用いて行った。

DNA 抽出は、簡便にするために PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent を用いて同様にを行った。

PCR-RFLP 法は、クサウラベニタケと同様に手法により行った。食品残渣試料からも可能な方法として開発を行った。

定性リアルタイム PCR 法は、ツキヨタケを特異的に検出するプライマー・プローブを用いてアプライドバイオシステムの 7900 で行った。

また、クサウラベニタケとツキヨタケの検査法が、他の市販きのこに交差反応しないかどうか、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）も用いて検討した。また、陽性コントロールとして、陽性対照プラスミドを構築した。

C. 研究結果と考察

1 . 分子系統樹解析

毒のクサウラベニタケ (*E. rhodopolium*) は、形態的には多様性が報告されているものの、これまで遺伝子配列に基づいた分類解析は行われていなかった。今回、全国から集めた試料の ITS 領域解析結果から、日本におけるクサウラベニタケは 3 系統に分けられ、いずれも食用のウラベニホテイシメジとも異なることが判明した。

2 . PCR-RFLP 法

系統樹解析の結果をもとに、迅速で簡便な判別法として、電気泳動の泳動パターンで判別する PCR-RFLP 法を開発するために、それぞれの系統に特異的な制限酵素を決定して解析した。クサウラベニタケ近縁種とウラベニホテイ

シメジの判別は、食用と毒を判別する目的のほか、3種の制限酵素を用いることで食毒判別に加えて、毒のクサウラベニタケ3系統をも区別することが可能であった。同様の手法をツキヨタケ判別にも応用した。制限酵素を3種類用いることで、食毒判別のほかに、間違えやすい食用のシイタケ、ムキタケ、ヒラタケも判別可能であった。本法は、主に生のきのこなどDNA分解があまりない試料に適用でき、食毒判別と系統分類が数時間(3-4時間程度)で可能である。

また、DNAがある程度分解されていると考えられる、調理加工された食品残渣や吐瀉物からも検査可能にする目的で、短い標的配列(200bp程度)を用いたshort-PCR-RFLP法も構築した。毒のクサウラベニタケ近縁種やツキヨタケを、他の食用きのこを判別することができた。本法は、系統分類まではできないが、市販のきのこ(エリンギ、マイタケなど)には交差反応することなく食毒判定を短時間(2-3時間程度)で可能であった。

3. 定性リアルタイムPCR法

(1)クサウラベニタケとその近縁種3系統およびウラベニホテイシメジ1系統を同時に同定するために、マルチプレックスリアルタイムPCR法を検討した結果、検出限界20コピー付近まで検出可能であり、条件によっては一部非常に弱い交差反応がみられることがあるものの、4系統を特異的に高感度で検出することができた。本方法は、迅速法であるPCR-RFLP法で判別不能で、確定検査が必要とされるときの確認検査に用いることができると考えられる。

(2)ツキヨタケは、国内では地域による遺伝的な多様性はほとんどないものの、諸外国では類似のきのこがいくつか報告されている。ツキヨタケを広く、かつ特異的に検出するために特異的な配列を選定し検討した結果、これまでに採取したツキヨタケを特異的に検出でき、他のきのこには交差反応せず、特異性の高い検出方法である。

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。また、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

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。

本研究において、形態判別が難しい毒きのこクサウラベニタケと食用ウラベニホテイシメジ、および、毒きのこツキヨタケと食用シイタケ、ムキタケ、ヒラタケなど、を迅速に判別可能な検査法を開発した。本法で確実な結果が得られない場合には、今回同時に検討した定性リアルタイムPCR法を用いることで確定可能である。

今後は全国の検査可能なところに普及して現場で使っ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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Obitsu S, Sakata K, Teshima R, Kondo K, Eleostearic acid induces RIP1-mediated atypical apoptosis in a kinase independent manner via ERK phosphorylation, ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Cell Death and Disease*, doi: 10.1038/cddis. 2013.188.

2. 学会発表

1. 近藤一成, 小林友子, 中村公亮, 小櫃冨未, 野口秋雄, 長澤栄史, 手島玲子 「クサウラベニタケおよび近縁種の rDNA ITS 領域の解析」第 104 回日本食品衛生学会学術講演会 (2012. 9, 岡山)
2. 小櫃冨未, 近藤一成, 中村公亮, 小林友子, 野口秋雄, 坂田こずえ, 手島玲子 「クサウラベニタケおよび近縁種の PCR-RFLP 法を用いた迅速同定法の検討」第 104 回日本食品衛生学会学術講演会 (2012. 9, 岡山)
3. 近藤一成, 小櫃冨未, 小林友子, 中村公亮, 坂田こずえ, 野口秋雄, 手島玲子 「PCR-RFLP 法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法」日本薬学会第 133 回年会 (2013. 3 横浜)
4. 近藤一成, 小櫃冨未, 手島玲子 「エレオステアリン酸刺激による細胞死における RIP1 の役割」第 35 回日本分子生物学会年会 (2012.12 福岡)
5. 坂田こずえ, 小櫃冨未, 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)
6. 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)

7. 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)

8. 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)

9. 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「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)

H.知的財産権の出願・登録状況

(1)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 法の結果を、特許出願した。

出願番号：特願 2013-005113

「キノコの同定方法、及び、同定キット」

出願日：平成 25 年 1 月 16 日

発明者：近藤 一成 様、小櫃 冴未 様

(2)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 様

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 様、小櫃 冴未 様、坂田 こずえ 様

弊所整理番号：26H006

(3)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

出願日：平成 26 年 5 月 19 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：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」
平成 24～26 年度総合分担研究報告書

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

I. 我々は、植物毒による食中毒を未然に防ぐ事を目的に、「自然毒のリスクプロファイル」を作成し、厚労省ホームページに掲載して、啓蒙活動を進めている。今回、これ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。

II. 中毒が発生した場合、現地に赴き関係者と接触することで、現地でしか得られない情報を得、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ため、現地調査を行っている。その一環として、2012 年 4 月北海道函館市において発生したトリカブトによる食中毒について現地調査を行い、事故の詳細の調査、原因植物の入手、有毒成分の定量分析等を行った。

III. 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の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。

I. 「自然毒のリスクプロファイル」の改訂

A. 研究目的

「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、間違いやすい類似種、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。

B. 研究方法・結果

国内の薬用植物・植物毒の専門家 23 名に呼びかけ「植物毒研究会」を組織し、改正点を検討した。その結果、以下の点を改正することになった。

- ・ 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。

C. 考察と結論

「自然毒のリスクプロファイル」は、全国の自治体からのリンクも貼られ、かなり活用されている。特に、中毒が発生した場合には、「自然毒のリスクプロファイル」の情報が参考にされ、新聞・テレビのニュースに転用されることもある。したがって、内容をより充実し、改正していくことは、重要である。実際、毎年中毒は発生し、その中には、これまでに報告されていなかった植物種もある。今後も、数年毎に見直し、改訂版を掲載して最新の情報を提供し、継続的に有毒植物への注意喚起を図って行く必要がある。

D. 健康危険情報

特になし

E. 研究発表

特になし

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

II. トリカブト食中毒の現地調査

A. 研究目的

中毒事故の発生した現地に赴き、関係者と接触することで現地でしか得られない情報を得、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。

B. 研究方法・結果

1) 事故の経過

函館保健所の個別聞き取り調査資料及び新聞報道資料より事故の詳細な経過が明らかになった。2012年4月初旬、家族3名（A: 71歳、男性、B: 42歳、男性、C: 41歳、男性）が、Bがニリンソウとして採取してきた野草をおひたしにして、夕食のおかずとして食べた。食後、1.5～2時間後から、全員食中毒症状（吐き気、倦怠感、胸のもやもやなど）を呈した。3時間後、救急車で病院へ搬送。Bは、到着時に心肺停止状態、食後約5時間後に死亡を確認。Aは、5時間後に心肺停止、翌日死亡が確認された。Cは、応急処置の後入院、数日後回復して退院した。

2) 採取植物の同定

患者の死亡に際し、病院は道警（北海道警察）へ検視依頼している。道警は、検視のため遺体を引き取ると同時に、患者自宅への立ち入りと、残されていた野草の全量、

採取者Bが使っていた山菜図鑑,携帯電話などを収集した。採取された野草は,北海道衛生研究所によりトリカブトと鑑定された。救急隊員は,当初からトリカブト中毒を疑っていたという。道警が収集しトリカブトと鑑定された野草は,後に函館保健所に譲渡され同保健所内の冷蔵庫で保管されていた。我々はこの野草を譲り受け観察したところ,すべてトリカブトで,採集したとされるニリンソウやその他の植物種は全く入っていなかった。

3) 有毒アルカロイドの定量および患者のアルカロイド摂取量

トリカブトには,全草に猛毒のアルカロイド(アコニチン,ヒパコニチン,メサコニチン,ジェサコニチン)が含まれ,アコニチンアルカロイドまたはジエステルアルカロイドと総称される。これら4種のアルカロイドを,LC-MSを用いて定量分析した。

分析はESI-FT-MSを検出に用いたLC/MSシステム(ThermoFisher LTQ-Orbitrap XL)を用いて行った。HPLCは,逆相C18カラムを用いたグラジエント条件,観測質量範囲m/z 600-700,サンプルは各10 mLを注入した。アルカロイド標品は和光純薬市販品を用い,添付文書に基づき標準溶液を調整し検量線を作成した。

譲り受けたトリカブトについて乾燥重量1 g当りのジエステルアルカロイド類の含有量を定量したところ,アコニチン 0.43 mg,メサコニチンは 0.55 mg,ヒパコニチンは 0.04 mg,ジェサコニチン 0.89 mgで,これらの和(ブシジエステルアルカロイド量)は,1.9 mgであった。

この結果から推計すると,患者の摂取した総アルカロイド量は 14.4 mgと考えられ

る。すなわち,一人当たり5 mg程度摂取したことになる。アコニチンの致死量については,およそ3-6 mgという値が知られているので,この摂取量は,致死量を十分含んでいたことになる。なお,後日道警は,死亡した2名の血中からトリカブトに特徴的なアコニチンなどの3成分が検出されたと発表した(表 敏弘ら:重症トリカブト中毒の3名同時搬入例,中毒研究 25: 332, 2012)。

4) 採取地の植物相観察

誤認するに至った現場の植物相を検証するため,聞き取り調査で得られた情報をもとに,採取地と考えられる函館市郊外の山林の植物相を調査した。

トリカブトは林道基点近くの沢筋に小群落を1つ見つけたのみで,その近辺及び上流部には全く見つける事はできなかった。トリカブトのすぐ近くにはニリンソウがまばらに生えていた。ニリンソウは,林道の基点から終点まで林道沿いの林床に群生していたが,尾根筋となる林道終点以北には観察されなかった。その他,川沿いの植林された針葉樹の林床には,アキタブキ,マイヅルソウ,バイケイソウ,モミジガサ,チゴユリ,ミツバ,エゾニュウ,オニシモツケ,ドクニンジン,ウマノミツバ,広葉樹林の林床には,バイケイソウ,エンレイソウ,オニシモツケ,モミジガサ,オオウバユリ,タンポポなどが観察された。

C. 考察

今回の事故では,採取者が「ニリンソウを取ってきた」と家族に話していることから,ニリンソウとトリカブトの誤認と考えられる。残存していた植物の観察,および

その成分の化学分析からも、トリカブトであることが裏付けられた。最近20年余の日本国内における高等植物による食中毒事例の統計調査によれば、トリカブトによる食中毒に関して、誤認した植物としてはニリンソウが最多で、ついでモミジガサが多いと報告されている(登田ら, 食衛誌, 2012: 53, 105.)。野草を採取したとされる現地の植物相調査でも、トリカブトの周辺にニリンソウ, モミジガサが生育していた。以上のことから、トリカブト中毒を未然に防止するには、まず原植物の正確な鑑定、あるいは似た植物との適切な見分け方が如何に重要かがわかる。これに関して、北海道のアイヌの伝承に学ぶべきことが多々ある。かつてニリンソウは、アイヌにとって重要な食料のひとつであり、毎年春には大量のニリンソウを採取し、冬の保存食料としていた。採集に関するいくつかの資料には、若葉のうちトリカブトの葉によく似ているので、花が咲いてから採るのが良いとされている。ニリンソウの花が咲くころには、トリカブトは大きくなっており確実に区別できることが示されている。現在出版されている多くの山菜図鑑も、ニリンソウは花やつぼみのついているものを採るのが安全だと指摘している。

D. 結論

植物毒による食中毒は、細菌やきのこほど多くはないものの、毎年少なからず発生する。春の山菜の時期に特に多く、山菜とよく似た有毒植物を採取し、誤って食べて中毒する例が後を絶たない。ニリンソウなどと誤認してのトリカブト中毒は、死に至ることも多いので、特に注意が必要である。

今回のトリカブト中毒現地調査により、植物の誤認を防ぐことが如何に重要であるかが示された。個々の植物によって、特徴や見分け方が違うので、それぞれに応じたけきめ細かい注意喚起、啓蒙活動が必要と考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

原著論文

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

III. 遺伝子鑑別による迅速・簡便な有毒植物同定法の開発

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もの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 mL，8~90 mg/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 mL）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 mL を用い全量 50 mL として行った。37°C で 5 分反応後、反応液（10 mL）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 mL を加え，ペレットミキサーで組織を破碎し，Proteinase K 1 mL 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 μ L として調製した。上清 2.5 mL 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 mL）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。この様な傾向から，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。

4. 原因植物の DNA 分析による同定

2014 年 5 月，青森県八戸市で発生したチョウセンアサガオの誤食による食中毒の現地調査を行い，原因植物と思われる植物サンプルを入手した。そこで，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。

C. 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。

D. 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，治療のためにも有用と考えられる。また，調理済みサンプルにも適用可能なので，従来の形態学的鑑定や化学分析と比較して有用性が高いと思われる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

特になし

G. 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 24～26 年度総合分担研究報告書

自然毒関連の食品安全情報の収集解析

研究分担者 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

1．海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について（平成 24 年度、平成 26 年度）

海外から侵入する可能性がある自然毒ハザードに対する監視の必要性はあるが、従業者の労力やコストは限られており、効率よく効果的に監視を行うためには対象のハザード及び食品の優先順位付けを行わなければならない。本研究では、海外において、健康リスクの観点から食品への混入・使用が懸念されている、あるいは使用が禁止されている高等植物及びきのこを調査し、リスト化して特に注意を向けるべきものを特定し、優先順位をつけた。さらに、海外での有毒な高等植物・きのこの食品への混入事例、規制や注意喚起などの対応状況を調査した結果、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ンアルカロイド含有植物の使用、蜂蜜中のグラヤノトキシンについては複数国で対応がとられていた。他に、豆類中のレクチン、ジャガイモ中のグリコアルカロイド類についても複数国が注意喚起や情報提供を行っていた。

2．消費者アンケート調査（平成 25 年度）

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ことから、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、食中毒の原因となる自然毒に関して消費者が正しく認識しているとは言えず、現状の情報提供では予防効果が十分ではないと考えられた。情報提供の方法について消費者は、メディアを利用した情報提供、小中学校での教育が効果的だと考えていた。現在も国や地方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。

A. 研究目的

1．海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について（平成 24 年度、平成 26 年度）

海外から侵入する可能性がある自然毒ハザードに対し監視する必要がある。しかし

ながら、監視業務従事者の労力やコストは限られており、効率よく効果的に監視を行うためには、対象のハザード及び食品の優先順位付けが必要となる。本研究では、ハザードとして食中毒の原因となり得る植物性自然毒、それらを含む高等植物及びきの

こを選択した上で、監視対象の優先順位付けに有用な基礎資料とすることを目的に、海外において、健康リスクの観点から食品への混入や使用が懸念されている、あるいは食品への使用が禁止されている高等植物及びきのこについて調査・検討した。さらに、有毒成分を含む植物性の食品、あるいは有毒な高等植物・きのこの食品への混入に関する事例、規制や注意喚起等など各国の対応状況を調査した上で、我が国への輸入食品において注意を向けておくべき植物性自然毒関連の問題を特定した。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。

2. 消費者アンケート調査（平成 25 年度）

自然毒による食中毒の大部分は「家庭」で発生し、消費者の知識不足が原因であることが多いことから、予防対策として行政機関による消費者への注意喚起及び自然毒の危険性の周知が行われている。しかしながら、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という課題がある。地域によって問題となる自然毒の種類が異なるだけでなく、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向けに情報提供を行うための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らするためのアンケート調査の実施を目的とした。

B. 研究方法

1. 海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について（平成 24 年度、平成 26 年度）

海外で健康リスクの観点から食品への混入が懸念されている、あるいは使用が禁止されている高等植物及びきのこに関する情報の有無について、米国、カナダ、欧州各国、豪州、ニュージーランド等の公的機関の公表資料を中心に調査した結果、参考となる資料として、次に示す 及び を入手した。この 2 つの資料と日本で自生又は栽培されている可能性のある有毒な高等植物リスト（ ）を比較し、今後我が国でも注意を向けるべき高等植物及びきのこについて検討した。

Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and food supplements; *EFSA Journal* 2012;10(5):2663 [60 pp.] (31 May 2012) ; <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2663.htm>

欧州食品安全機関（EFSA）が、欧州機関（欧州理事会、欧州医薬品庁等）欧州各国（21ヶ国）及び世界保健機構（WHO）等の公表資料（規制を含む）と 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・きのこ等をまとめたリストである。特に、フードサプリメントの原材料の安全性評価におけるハザード特定を支援することに重点が置かれている。

Australia New Zealand Food Standards Code
1.4.4 -PROHIBITED AND RESTRICTED

PLANTS AND FUNGI-

豪州及びニュージーランドの食品基準 (Australia New Zealand Food Standards Code) の 1 つとして、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・きのこ類及びその成分のリストである。

佐竹元吉 監修；学研フィールドベスト図鑑 16 日本の有毒植物と食中毒

日本における有毒植物として、野生種及び栽培種の約 180 種について、標準和名、学名、分類上の科名、有毒部位、毒性、特徴、間違えやすい植物、毒性成分、中毒事例・死亡事例の有無などを紹介している。

さらに、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 (原料成分) 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の公表資料を中心に調査した。

2 . 消費者アンケート調査 (平成 25 年度)

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。講習会は主に食品関連の内容 (ただし自然毒との関連性はない) で開催されたものであった。

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 . 海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について (平成 24 年度、平成 26 年度)

ハザードとして植物性自然毒に着目し、食品に混入する可能性がある有毒な高等植物及びきのこに関する海外の資料を調査した。

調査の結果、有用な資料として「B . 研究方法」の項で示した資料、 が確認できた。これらの資料は、欧州各国及び豪州・ニュージーランドにおいて、食品及びフードサプリメントに使用又は混入する可能性があり、健康への有害影響が懸念されている高等植物及びきのこのリストである。さらに、我が国で自生又は栽培されている可能性がある有毒な高等植物のリストとして資料 を使用した。これらの資料(~) を比較することにより、食品への混入を懸念すべき高等植物が特定できただけでなく、優先順位をつけることもできた。結果として、資料 ~ のうち 2 つ以上の資料に記載されていた高等植物は「特に注意すべき高等植物」であると考えられた。さらに、3 つの資料全てに記載されていた高等植物については、我が国で従前から有毒であると認識されていただけでなく、海外でも有害影響が懸念されているものであり、優先的

に注意を向けておくべきものであると判断した。資料 には記載がなく、資料 には記載されていたものについては、海外では監視対象になっているが、我が国ではあまり警戒されていない、或いは自生・栽培されていない高等植物と言える。きのこについては資料 及び を比較したところ、両資料に記載されているきのこは重複しているものが多く、海外において食品及びフードサプリメントへ混入する可能性があり健康への有害影響が懸念されているきのこ（特に属として）は類似していることが分かった。特に幻覚性きのこは一致していた。（詳細は、平成 24 年度分担報告書を参照）

EU RASFF は、規則 EC/178/2002 のもと設置され、EC(European Commission) が運営しているシステムである。RASFF 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。本研究では、海外において食品中の植物性自然毒（原料成分として含まれる）が問題になった事例、有毒な高等植物・きのこが食品へ混入した事例について 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。関連する事例は、1982～2014 年 12 月 25 日の通知として 157 件が確認できた。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、トウゴマ（リシン）、松の実による味覚異常（通称パインマウス）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。

次に、各国政府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主な各国機関は次の通りであった。各々の詳細は平成 26 年度分担報告書にまとめた。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。

- 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

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)、*Jismon 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、を指定している。

- ・ 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)

さらに各国機関は、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まとめた結果、複数の国で対応が取られたものとしては、野生きのこ(主に中国産)中のニコチン、蜂蜜中のグラヤノトキシン、ピ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ナ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。きのこシーズンには各国で誤って毒きのこ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。(詳細は、平成 26 年度分担報告書を参照)

2 . 消費者アンケート調査 (平成 25 年度)

消費者の「食品に関する問題の不安」についての情報として、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。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、行政的に管理され推定されるリスクも低い輸入食品や残留農薬よりも、毎年食中毒が発生し死者も出ている自然毒の方が不安に感じる人の割合が低いのは問題であると考えられた。

「自然毒による食中毒に関する知識」の情報として、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を調査した。得られた結果で特徴的だった主なことは、次の通りである。

- ・食用にできるフグ種が決められていること、フグの肝臓は毒性が高く食用にできないことについて、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できた。
- ・きのこのこの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きのこの種類を特定するのは難しい。しかし、回答者の5%はきのこのこの図鑑があれば見分けられると回答したことから、消費者にきのこのこの判別の難しさをより強く伝えていく必要がある。
- ・高等植物による食中毒の最近の発生状況の特徴の一つに、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。その多くは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。しかしながら、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、発生場所

を正しく学校と回答したのはたったの13%であった。このように、ジャガイモによる食中毒のことを正しく認識している人は少ないことが明らかとなり、今後は教育現場や子どもがいる家庭を対象に重点的に注意喚起を行う必要があることが示された。

「行政による情報提供の仕方」について、消費者の視点から、行政機関がどのような方法で消費者に向けて情報提供すれば効果的であるのかを調査した。質問の回答様式は複数項目からの選択型にして、他に自由記載用の欄を設けた。選択用の項目をアンケート調査票の作成者が思いつく範囲で示したことのバイアスはあるものの、得られた回答によると、メディアを利用した情報提供や注意喚起が最も有効のようであった。さらに、小中学校での教育が効果的であるとの回答も多く、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。(詳細は、平成25年度分担報告書を参照)

D. 結論

1. 海外でリスクが懸念されている食品中の植物性自然毒について

欧州及びFSANZの公表資料・規制の情報をもとに、食品への混入・使用を懸念すべき高等植物・きのこをリスト化して特に注意を向けるべきものを特定した。

さらに、海外での食品への有毒な高等植物・きのこの混入事例、規制、消費者への注意喚起等に関して調査したところ、海外の複数国で注意喚起がなされ、我が国でも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、ビターアブ

リコ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ンアルカロイド含有植物の使用であった。他に、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。

また、海外ではフードサプリメントへの有毒な高等植物の使用・混入について特に懸念していることに鑑み、販売前に十分な調査もされずに有毒な高等植物がフードサプリメントに利用されることのないよう我が国でも何らかの対策が必要であると考えられた。

2. 消費者アンケート調査

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、食中毒の原因となる自然毒に関して消費者が正しく認識しているとは言えず、現状の情報提供では食中毒発生の予防効果が十分ではないと考えられた。情報提供の方法としては、消費者は、メディアを利用した情報提供、小中学校での教育が効果的だと考えていた。現在も国や地方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。

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、今後我が国の食品安全対策（特に輸入食品監視）の一環として注意を向けていくべき植物性自然毒及びそれらを含む高等植物・きのこを特定した。また、消費者への注意喚起等における今後の課題を特定した。

E. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) 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(1)，55-63 (2014)
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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) 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について：日本薬学会第 133 年会，2013 年，横浜市．
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Toda M, Uneyama C, Kasuga F :
Trends of tetrodotoxin poisonings

caused by puffer fish in Japan. 2014
Eurotox, エジンバラ.

- 7) 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

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から感謝申し上げます。

研究成果の刊行に関する一覧表
(H24-26 総合)

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
長島 裕二	フグ毒の体内動態	長島 裕二 村田 修 渡部 終五	水産学シ リーズ174 フグ研究と トラフグ生 産技術の最 前線	恒星社厚 生閣	東京	2012	98-1 10
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
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	64-7 1
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	巻号	ページ	出版年
豊福肇	第44回コーデックス食品衛生部会参加報告	食品衛生研究	3月号		2013
高橋正弘, 池田恵, 中村丁次, 日佐和夫, 豊福肇	<i>Campylobacter</i> 食中毒における原因施設および原因食品のリスクランキング設定への疫学的アプローチ	獣疫学雑誌	16(1)	52-60	2012
Ikuko Shimada, Hajime Toyofuku, Kazuo Hisa, Satoshi Numata, Mieko Kawamura	Analysis of risk management reports in food service practical training course	AFSSA Proceeding of the 1st International Conference on Asian Food Safety and Food Security. Osaka, Japan.		130-133	September 2012
Y. Nagashima, T. Matsumoto, K. Kadoyama, S. Ishizaki, S. Taniyama, T. Takatani, O. Arakawa, M. Terayama	Tetrodotoxin poisoning due to smooth-backed blowfish <i>Lagocephalus inermis</i> and toxicity of <i>L. inermis</i> caught off the Kyushu coast	Japan. Food Hyg. Saf. Sci.	53	85-90	2012
H. Lin, Y. Nagashima, P. Jiang, X. Qin, Y. Lu, C. Zhang	Screening for toxicity and resistance to paralytic shellfish toxin of shore crabs inhabiting at Leizhou peninsula	China. Mar. Environm. Res.	78	48-52	2012
A. Murata, Y. Nagashima, S. Taguchi	N:P ratios controlling the growth of the marine dinoflagellate <i>Alexandrium tamarense</i> : Content and composition of paralytic shellfish poison.	Harm. Algae	20	11-18	2012
長島裕二	フグ類の体内におけるテトロドキシンの動態に関する研究	日本水産学会誌	78	380-383	2012
長島裕二	自然毒（動物性自然毒）フグ毒	小児科臨床	65	1419-1426	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
長島裕二	食品中の魚毒（フグ毒）による食中毒とその予防	食品衛生研究.	63巻2号	21-30	2013
R. Tatsuno, M. Shikina, K. Soyano, K. Ikeda, T. Takatani and O. Arakawa	Maturation-associated changes in the internal distribution of tetrodotoxin in the female goby <i>Yongeichthys criniger</i> .	Toxicon	63	64-69	2013
谷山茂人, 高谷智裕, 反町太樹, 相良剛史, 久保弘文, 大城直雅, 小野 要, 肖 寧, 橘 勝康, 荒川 修	沖縄県沿岸に分布する腐肉食性および肉食性巻貝の毒性と毒成分	食衛誌	54(1)	49-55	2013
R. Tatsuno, M. Shikina, Y. Shirai, J. Wang, K. Soyano, G.N. Nishihara, T. Takatani and O. Arakawa	Change in the transfer profile of orally administered tetrodotoxin to non-toxic cultured pufferfish <i>Takifugu rubripes</i> depending of its development stage	Toxicon	65	76-80	2013
Obitsu S., Sakata K., Teshima R., Kondo K.	Eleostearic acid induces RIP1-mediated atypical apoptosis in a kinase independent manner via ERK phosphorylation, ROS generation and mitochondrial dysfunction.	Cell Death and Disease	4	e674	2013
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 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium definitive phage type 104.	Emerg Infect Dis	19	823	2013
豊福肇、小林光土、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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M.	Characterization of blaTEM-52 -carrying plasmids of extended-spectrum- β -lactamase-producing <i>Salmonella enterica</i> 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 <i>Listeria monocytogenes</i> isolated from the imported and the domestic foods in Japan	Journal of Food and Nutrition Sciences	Vol. 3	70-73	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sayaka Asahata, Yuji Hirai, Yusuke Ainoda, Takahiro Fujita, Yumiko Okada, Ken Kikuchi.	Fournier's gangrene caused by <i>Listeria monocytogenes</i> as the primary organism.	Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology	26(1)	44-46	2015
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. Kusukawa, M.Murakami, Y.Tsujiyama, K. Ito, H.Toyofuku, Y.Yamada.	Quantitative estimation of <i>Campylobacter</i> 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)					