

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と 管理措置に関する研究

平成28年度 総括・分担研究報告書
(H27-食品一般-007)

研究代表者 近藤一成

平成29(2017)年 5月

目次

I. 総括研究報告書

我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究

近藤 一成 3

II. 分担研究報告書

1. サルモネラ、赤痢菌等の細菌学的分析

泉谷 秀昌 11

2. 食品媒介リステリア症のリスク制御

(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・ウイルスの食品安全情報の収集解析

豊福 肇 27

4. きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

近藤 一成 59

5. 植物毒分析法開発と毒性評価

(植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発)

紺野 勝弘 67

6. LAMP 法開発 (LAMP 法を用いた有毒きのこ検出法の開発)

菅野 陽平 71

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 83

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」

平成 28 年度
総括研究報告書

研究代表者	近藤一成	国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
研究分担者	紺野勝弘	富山大学和漢医薬学総合研究所
研究分担者	豊福 肇	山口大学共同獣医学部
研究分担者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究分担者	菅野陽平	北海道立衛生研究所

研究要旨

本研究は、輸入食品の増加に伴う検査品目数の急激な増加に対応して、食品や輸出国リスクの程度に応じた検査体制の構築を行うための研究である。微生物の調査研究から食品と諸外国のリスク管理体制のランク付け、食中毒アウトブレイクに対応するための菌株情報収集と解析を、また、植物性自然毒の国民への情報発信のためのデータベース更新、遺伝子鑑定法の開発改良を行った。

微生物関連では、Hazard の特性、米国及び EU での輸入時の違反データ、国の NFCS の performance、喫食、曝露データ等を網羅した半定量モデルを再検討し、入力項目を修正、再構築した。作成したモデルに *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* に絞り、また違反が多い食品カテゴリーに絞ってモデルにデータを実装しリスクランキングを行った。データや情報から管理が不十分と評価された国から輸入される食品の検査を強化することにより限られたリソースを有効に活用し、より効果的効率的な輸入時の微生物モニタリングが実施できると考えられた。赤痢菌 *Shigella sonnei* の分子疫学解析を重点的に進めた。本菌は *mutiocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) による解析が有用であることが本研究で示された。輸入例および国内例関連株のデータ収集および蓄積を行った。これまでに延べ約 1,300 株のデータを収集した。10 か所の遺伝子座を用いた *S. sonnei* の MLVA 法から 3 つの大まかなグループに大別することができ、これはゲノム解析から報告されている系統と相関することが示された。リステリアについて、研究室保有食品株データの蓄積と、国内発生散発事例由来株の解析を行った。また、また、研究協力者によるデータの統合を行い、データベースの充実を図った。

自然毒関連では、有毒植物による食中毒が、本年度発生したイヌサフランで 2 名、スイセンで一名死亡例があった。そこで、有毒植物の遺伝子鑑別法を実際の中毒原因植物試料（イヌサフラン）に適用し、本鑑別法が有効であることを確認した。有毒植物の確定検査用にリアルタイム PCR 法の確立を目指して検討を行った。きのこに関して、中毒事例が多いクサウラベニタケの分類学的再検討と毒性との関係、確定検査法の改良等を行った。その結果、従来クサウラベニタケとしていたものは、2 つの遺伝子座と複数の分子系統解析のより 3 つに分類され、2 つが中毒を示すこと、また、これら 3 つはリアルタイム PCR 法で確定検査が可能ながわかった。さらに、LAMP 法を利用したツキヨタケおよびクサウラベニタケの迅速かつ簡便な検査法の構築について検討した。ツキヨタケの検出を目的とした LAMP 法については、ツキヨタケと誤認されやすいシイタケやヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのここと交差せず、ツキヨタケのみを高精度に検出する LAMP 法を開発した。

A. 研究目的

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

諸外国の食品安全管理体制調査結果から、それが十分でない国からの輸出食品の検査を強化することで、効率的な監視体制を構築し、我が国に侵入する生物学的ハザードのリスクを低減させる。そのために、諸外国での食中毒発生状況、食品の汚染実態、検査監視体制、管理措置等について調査解析し、検査のリソースをよりハイリスクな国、食品及び生物学的ハザードの組合せに配置できるように、評価する仕組みを構築することを目的とした。

赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

国内外の生物学的ハザードに関して情報収集および原因物質の解析を行い、ハザードの特定に有用な情報もしくは解析法の検討を行う。さらに、ハザード発生時に必要な管理措置につながる対応への一助とすることを目的とする。食品衛生法における細菌性食中毒の原因物質として現在15種類ほどの菌種が挙げられている。本年度は海外からの侵入リスクが高いと考えられる赤痢菌をモデル対象として研究した。赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、汚染された食品や水を介して感染する。国内の患者発生数は年間100名前後であり、大半は海外渡航者による輸入例である。しかしながら、近年発生した集団事例の中には海外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。一方で、国内例はそのほとんどが散発もしくは家族内事例などの小規模なものであり、感染源の究明にいたることはほとんどないのが現状である。

細菌性赤痢は主として途上国で発生している。当該国ではサーベイランス体制が不十分なため細菌性赤痢の発生状況を知ることが極めて困難である。従って、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは本感染症への対策を検討するに当たり重要な工程と考えられる。本研究では、国内外の細菌性赤痢の発生状況に関する情報収集、ならびに国内外の分離菌株に関する分子疫学的解析手法の検討及びデータベースの構築を行うことを主たる目的とする。

リステリアのリスクに関する研究

脳脊髄膜炎及び敗血症を主な症状とするリステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes* (以下リステリア) は、芽胞非形成のグラム陽性桿菌である。人リステリア症は、発症時の致命率が20 - 30%にも及ぶ。また、妊産婦の感染時には流産を引き起こすことが知られている食品媒介感染症である。過去の事例における原因食品としてはナチュラルチーズ等の乳製品、スモークサーモン等の水産物及びその加工品、ローストビーフ等の食肉及びその加工品、サラダ等様々な食品が報告されている。国内においては、リステリア症は報告義務のない疾患であり、2008 - 2011年の患者数は感染症研究所による院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた調査で、307例で、人口100万人当たりの推定罹患率は約1.6人であった。一方、日本国内では集団事例はほとんど報告されておらず、2001年の国内産ナチュラルチーズを原因食品とする1例が確認されているのみである。一方で、過去の調査により、

国内で流通する食品がある程度本菌に汚染されていることが明らかとなっている。本研究では、発生状況を正確に把握するための情報を収集するとともに、様々な由来のリステリア菌株の分子型別データを収集、蓄積することにより、国内発生事例の原因食品同定に役立てることを目的として、研究室保有の輸入食品、国内産食品及び患者由来株計 373 株を用いた *L. monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的解析を実施する。

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

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

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

きのこによる食中毒被害低減と原因きのこ特定のための施策として重要なことは次のように考えられる。原因きのこの分類を明確にして、それぞれに対する検査法を確立整備することである。同時に、きのこ採取者に対する一層の情報提供と注意喚起が必要である。日本国内で食中毒被害が多く発生する、クサウラベニタケとツキヨタケのうち、クサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium* と考えられている) は、一般には複合種と言われ複数の種を含むのではないかと考えられてきた種

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

LAMP 法による迅速検査法の検討

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

B. 研究方法

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

昨年度評価モデル構築の基礎として、文献レビューを行い国別にランキング付

けを行った。本研究の目的に活用できるか調査するため、公表されているリスクランキングツールをレビューした。昨年度作成したモデルを再度詳細に解析し、その欠点、問題点を明らかにし、追加項目及びそのデータの出どころを明らかにした。

赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

国内事例については感染症発生動向調査、食中毒発生状況などを、海外事例については論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考に情報収集を行った。分離菌株の解析については、パルスフィールドゲル電気泳動法 PFGE もしくは複数遺伝子座を用いた反復配列多型解析 MLVA を使用した。得られたデータを BioNumerics ソフトウェアに取り込み、データベースの構築、並びにクラスター解析を行った。系統を大別する SNP 検索には SNaPshot による方法を開発、使用した。薬剤感受性試験はディスク法を用いて実施した。

リステリアのリスクに関する研究

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 患者由来株 108 株、リステリア症感染牛由来株 2 株、牛腸内容物由来株 1 株、食品由来株 260 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株を用いて、PFGE 解析を実施した。得られた画像は BioNumerics ソフトウェアを用いて解析した。系統樹作成には、非加重結合法 UPGMA 法を用いた。また、諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集は、2016 年に発生した海外におけるリステリア症の集団事例について、国立医薬

品食品衛生研究所 安全情報部が発表している食品安全情報、米国 CDC、ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases、Eurosurveillance 等を基に情報を収集した。

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

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

中毒きのこ再分類のための分子系統樹解析と検査法確立

中毒が多いクサウラベニタケの分類を精査、再検討するために、ITS 領域と RPB 2 領域について、CLCgenomic workbench および MEGA ソフトウェアを用いて、最尤法にて分子系統樹解析をした。各 DNA 配列間でギャップが有る場合の処理について、全ての配列を用いる場合と完全に除去する場合のそれぞれについて行った。欧州 *Entoloma rhodopolium* との比較解析を行った。

LAMP 法によるツキヨタケ迅速検査法の検討

ツキヨタケは、山形県、島根県で採取した。食中毒検体試料は、秋田県、山形県

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

C. 研究結果および考察

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

次の3要素（ハザード、輸出国の管理体制、食品の種類）を掛け合わせたモデルでリスクランキングを試みてきた。



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

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

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

赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

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

2016年に当部に送付され、解析された *Shigella sonnei* は55株であった。うち、輸入例は38株で、主な渡航先は東南アジア19株、南アジア6株、東アジア、アフリカが各4株であった。これらについて、MLVAによる解析を行った。上記輸入例はそれぞれ、これまでに収集したデータベース上にて各地域に相応するグループに振り分けられた。*S. sonnei* 輸入例株についてのMLVA解析から10遺伝子座を用いて3遺伝子違いを基準にコンプレックを形成させると、MLVAの結果が地域性以外に、系統も反映していることが示唆された。2011-2015年の *S. sonnei* について薬剤耐性の傾向を整理した。*S. sonnei* は全体に薬剤耐性率が高く、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、ST合剤 (STX) の耐性率はいずれも7割を超え、同3剤耐性菌の割合は6割以上であった。耐性を注視すべき薬剤として、キノロン、セフェム系抗菌薬があるが、ナリジクス酸 (NA)

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

リステリアのリスクに関する研究

1. PFGEによる分子型別

食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株 PFGE 解析の結果、75%以上の相同性を示す菌株を同一クラスターとした結果、全菌株は27クラスターに分類された。各クラスターは血清型との強い相関を示した。

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

2. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

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

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

1. 中毒情報の収集

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

2. 中毒原因植物のDNA分析による同定

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

する PCR-RFLP 法) を適用した。その結果、入手した植物由来の PCR 増幅産物は制限酵素により消化され、バイケイソウ由来の PCR 増副産物と同様の泳動パターンを示すことが確認できた。本鑑別法は、保健所や医療機関などの現場において、食中毒患者への初期対応と平行して行え、原因種の推定・特定に有用なものと考えられた。

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

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

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

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

LAMP 法によるツキヨタケ迅速検査法の検討

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

同様の方法を、クサウラベニタケに対しても適応可能か検討を行った。

D. 結論

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

ハザードと輸出国のランキングに関する研究では、昨年度作成したモデルの改良を行い、若干の改善は認められたが、データや情報から管理が不十分と評価された国から輸入される食品の検査を強化することにより、輸入時モニタリング等に活用して、より効果的な輸入食品に起因するリスクの低減化が図れると考えられた。

赤痢菌等に関する研究では、近年の食および人のグローバル化により、海外から様々な食品および人が国内に入りやすくなっている。今後も継続的に海外の発生状況の情報収集が必要である。国内監視体制整備のため、分離菌株の解析手法の検討ならびにデータベースの拡充を図る必要がある。

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

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

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

各分担報告書に記載した。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 28 年度分担研究報告書

サルモネラ、赤痢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

病原体に汚染された食品等を介して発生する細菌感染症にはサルモネラ症、赤痢、コレラなどがある。これらは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している。昨年度に引き続き、赤痢菌、とくに *Shigella sonnei* の分子疫学解析を重点的に進めた。本菌は multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析が有用であることが本研究で示された。輸入例および国内例関連株のデータ収集および蓄積を行った。これまでに延べ約 1,300 株のデータを収集した。輸入例関連株に関し、10 か所の遺伝子座を用いた *S. sonnei* の MLVA 法から 3 つの大まかなグループに大別することができ、これはゲノム解析から報告されている系統と関連することが示された。*S. sonnei* は SM、TC、STX への耐性率が高かった。国内例株の CTX、CPFX、GM に対する耐性は、その年の流行に左右された。輸入例の薬剤耐性は渡航先によっても偏りがあることが示唆された。本研究は、病原体の継続的な分子疫学解析並びにデータの蓄積が海外から侵入してくるハザードへの対応に欠かせないことを示唆している。

A. 研究目的

食品および食材、ならびに人の流れがグローバル化してきている中で、食品の生物学的ハザードについても多様化、複雑化が見られる。食品における生物学的ハザードについては主に食中毒という形で我々の前に出現するが、その発生原因及び態様はさまざまである。細菌などの微生物によるハザードは、食品流通・加工ならびに原因物質などの多様性・複雑性から多岐にわたり、その要因の特定を困難なものにしている。本研究では、国内外の生物学的ハザードに関して情報収集および原因物質の解析を行い、ハザードの特定に有用な情報もしくは解析法の検討を行う。さらに、ハザード発生時に必要な管理措置につながる対応への一助とすることを目的とする。

食品衛生法における細菌性食中毒の原因物質

として現在 15 種類ほどの菌種が挙げられている。本年度は海外からの侵入リスクが高いと考えられる赤痢菌をモデル対象として研究した。

赤痢菌は細菌性赤痢の起因菌であり、汚染された食品や水を介して感染する。国内の患者発生数は年間 100 名前後であり、大半は海外渡航者による輸入例である。しかしながら、近年発生した集団事例の中には海外からの輸入食品との関連が示唆されたものもあった。一方で、国内例はそのほとんどが散発もしくは家族内事例などの小規模なものであり、感染源の究明にいたることはほとんどないのが現状である。細菌性赤痢は主として途上国で発生している。当該国ではサーベイランス体制が不十分なため細菌性赤痢の発生状況を知ることは極めて困難である。従って、菌株解析を通じて輸入例と国内例の対比を行うことは

本感染症への対策を検討するに当たり重要な工程と考えられる。本研究では、国内外の細菌性赤痢の発生状況に関する情報収集、ならびに国内外の分離菌株に関する分子疫学的解析手法の検討及びデータベースの構築を行うことを主たる目的とする。

B. 研究方法

国内事例については感染症発生動向調査、食中毒発生状況などを、海外事例については論文雑誌・米国 CDC、欧州 CDC からの資料などを参考に情報収集を行った。

分離菌株の解析については、パルスフィールドゲル電気泳動法 (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。系統を大別する SNP 検索には SNaPshot による方法を開発、使用した。薬剤感受性試験はディスク法を用いて実施した。

C. 研究結果および考察

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

赤痢菌には *S. dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii*、*S. sonnei* の 4 菌種があるが、検出頻度は *S. flexneri* が 22%、*S. sonnei* が 75% と大勢を占めていた。

米国において、2014 年の赤痢菌による食中毒患者数はサルモネラ、カンピロバクターに次いで 2,774 名であり、死亡率も 0.1% と決して低くない (表 1)。

2016 年に当部に送付され、解析された *Shigella*

sonnei は 55 株であった。うち、輸入例は 38 株で、主な渡航先は東南アジア 19 株、南アジア 6 株、東アジア、アフリカが各 4 株であった。これらについて、MLVA による解析を行った。上記輸入例はそれぞれ、これまでに収集したデータベース上にて各地域に相応するグループに振り分けられた。

これまでに構築したデータベース内の *S. sonnei* 輸入例株について、MLVA 解析によるグルーピングとゲノム情報からの系統との関連性について検討した。系統の大別には SNaPshot を用いた。その結果、10 遺伝子座を用いて 3 遺伝子違いを基準にコンプレックを形成させて得られる (MLVA10) と、大きく 3 つのグループについて、南アジア関連株が大勢を占める中央のグループ (a) は系統 IIIb、東南アジア由来が大勢を占める小さなグループ (b) は系統 II、残りのグループ (c) は系統 IIIc がほとんどであり、MLVA の結果が地域性以外に、系統も反映していることが示唆された (図 3)。

2011-2015 年の *S. sonnei* について薬剤耐性の傾向を整理した。*S. sonnei* は全体に薬剤耐性率が高く、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、ST 合剤 (STX) の耐性率はいずれも 7 割を超え、同 3 剤耐性菌の割合は 6 割以上であった (図 4)。

耐性を注視すべき薬剤として、キノロン、セフェム系抗菌薬があるが、ナリジクス酸 (NA) 耐性が 5 割、シプロフロキサシン (CPFEX) 耐性が 2 割、セフトキシム (CTX) 耐性が 2 割弱であった。CPFEX+CTX 耐性は 1% 以下であった。また、ゲンタマイシン耐性が 2 割弱検出された (図 5)。

NA、CPFEX、CTX、ゲンタマイシン (GM) 耐性について、1) 輸入例の地域別 (表 2)、2) 及び国内例の年別 (表 3) について整理した。NA 耐性は南アジア、東アジアで高く、CPFEX 耐性は南アジアで高かった。1) CTX 耐性は西アジアで高かったが、これは 2012 年に発生したトルコツアールによる事例に関する株であった。GM 耐性は

東アジア、西アジアで高かった。2) CPMX は 2015 年に、効率に検出された。CTX および GM 耐性は 2011 年に多く検出された。前者は広域散発例の発生によって、後者は飲食医チェーン店の食中毒事例の発生によって検出率が高くなったものであった。

S. sonnei のサーベイランスにおいて、MLVA の活用によって輸入例をグループ化できることが明らかとなってきた。また、当該グループが地域性および遺伝学的な系統を反映していることが示唆された。薬剤耐性の傾向は輸入例の地域により異なり、国内例ではその年の流行株によって変化することが示された。MLVA などの遺伝学的解析および薬剤耐性の傾向から国内例と輸入例との関連性がより詳細にわかることが示唆された。

今後も引き続きサーベイランスを継続することでデータベースの厚みを増し、データの信頼性を高め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。今後も海外の発生状況の情報収集が必要である。また、国内の監視体制の整備のため、分離菌株の解析手法の検討ならびにデータベースの拡充を図る必要がある。

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

Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus

variable-number tandem repeat analysis. J Med Microbiol. 2016 Sep;65(9):1007-12.

泉谷秀昌、森田昌知、大西真：*Shigella sonnei* における分子疫学解析および薬剤耐性について。第 90 回日本感染症学会総会、2016 年 4 月、宮城県仙台市。

泉谷秀昌：分子疫学解析を用いた赤痢菌のサーベイランスについて。第 37 回日本食品微生物学会学術総会、2016 年 9 月、東京都。

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 . 米国食品由来感染症発生状況 (2014 年)

起因菌	患者数	対10万人	入院数	入院率	死亡数	死亡率
カンピロバクター	6465	13.29	1088	15	9	0.1
リステリア	116	0.24	106	91	17	15
サルモネラ	7439	15.29	2144	29	32	0.4
赤痢菌	2774	5.70	575	21	4	0.1
STEC O157	444	0.91	155	35	3	0.7
STEC non-O157	697	1.43	106	15	2	0.3
ビルリオ属菌	221	0.45	44	20	3	1
エルシニア	136	0.28	30	22	1	1

表 2 . *S. sonnei* 輸入例株に関する薬剤耐性と推定感染地域 (2011-2015 年)

地域	東南亜	南亜	東亜	西亜	アフリカ	その他
NA (%)	49.4	100.0	94.1	0.0	0.0	55.0
CPFX (%)	14.8	95.8	0.0	0.0	0.0	25.0
CTX (%)	8.6	4.2	11.8	100.0	0.0	15.0
GM (%)	0.0	0.0	88.2	100.0	0.0	0.0
<i>n</i>	81	72	17	12	11	20

表 3 . *S. sonnei* 国内例株に関する薬剤耐性の推移

年	<i>n</i>	NA (%)	CPFX (%)	CTX (%)	GM (%)
2011	122	54.1	1.6	36.9	41.8
2012	43	14.0	4.7	4.7	2.3
2013	16	12.5	6.3	6.3	0.0
2014	26	11.5	7.7	0.0	0.0
2015	40	62.5	42.5	0.0	0.0

図1．細菌性赤痢：発生動向（NESID、2008-2015年）

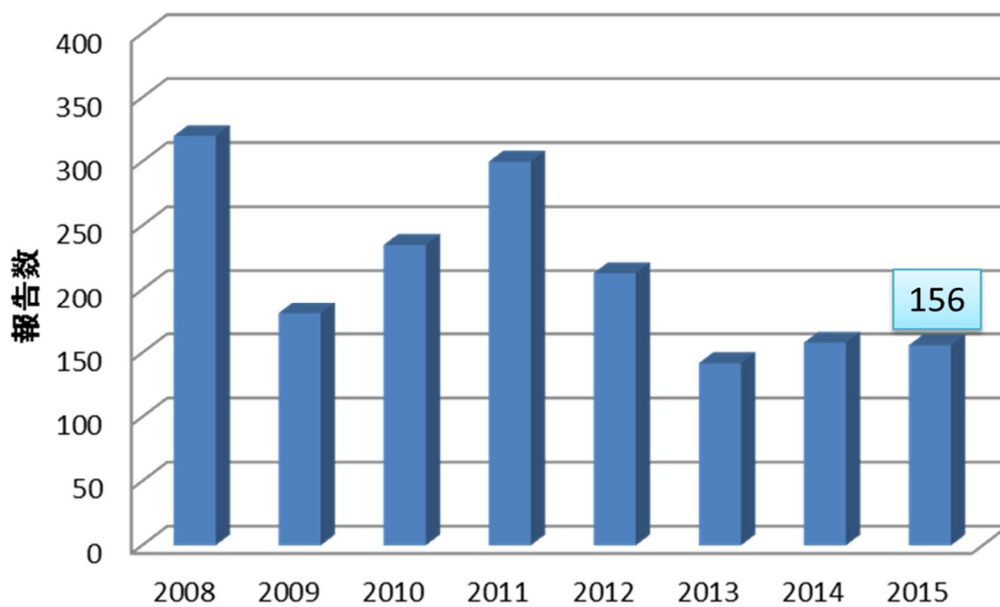


図2．細菌性赤痢：推定感染地域別分布（NESID、2012-2015年）

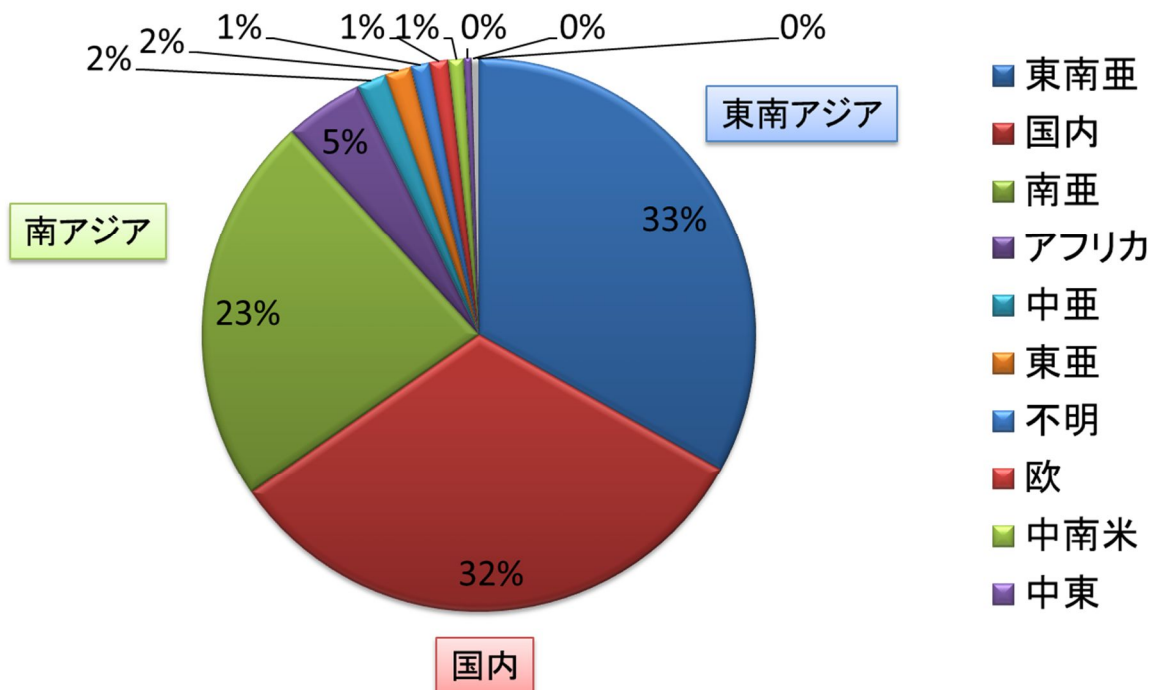


図 3 . *S. sonnei* MLVA10 解析。3 遺伝子違い (3 locus-variant) によるグループ化 (a, b, c) と系統解析 (II, IIIb, IIIc) 解析した株について色分けしてある。白い部分は未解析の株を示す。

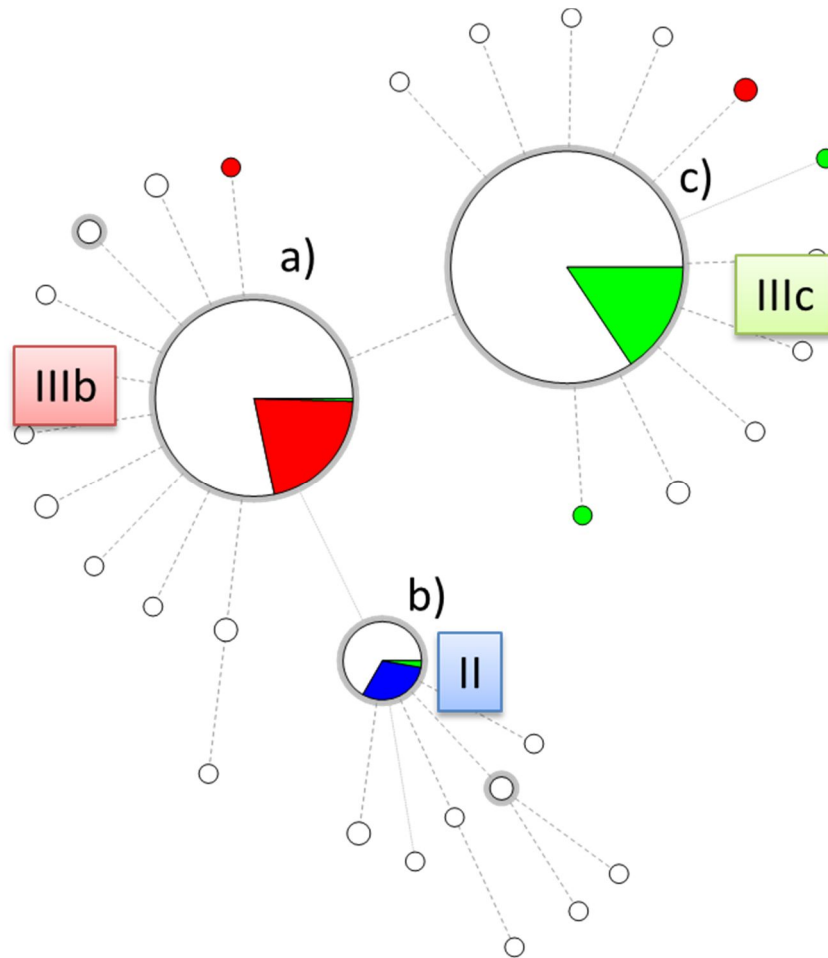


图 4 . *S. sonnei* 藥劑耐性分布 1 (2011-2015 年)

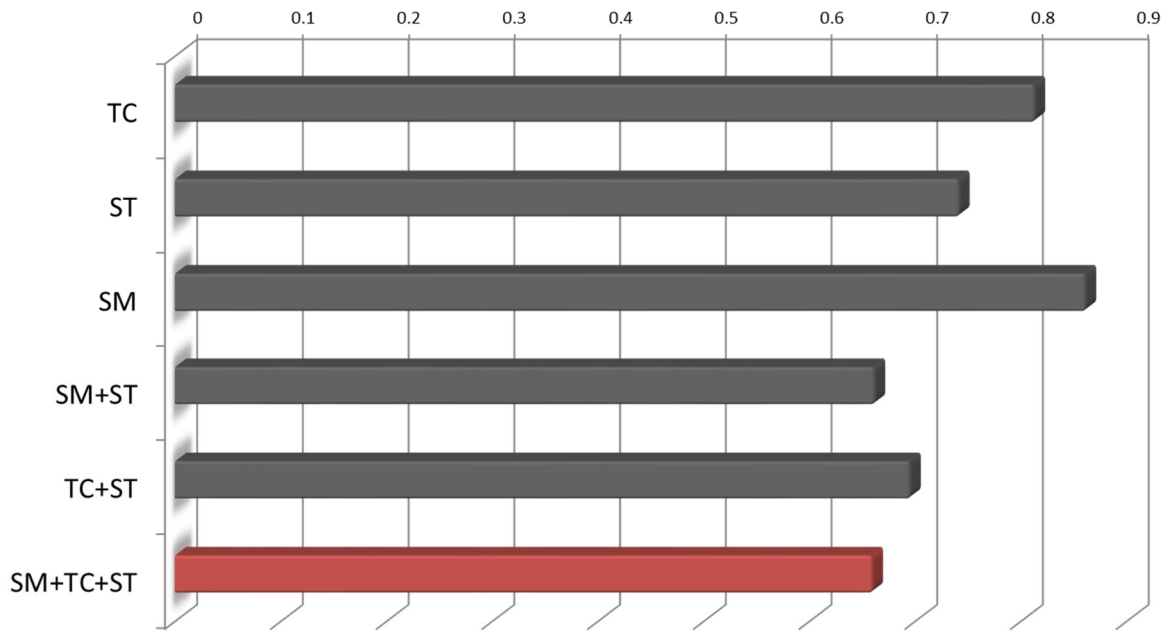
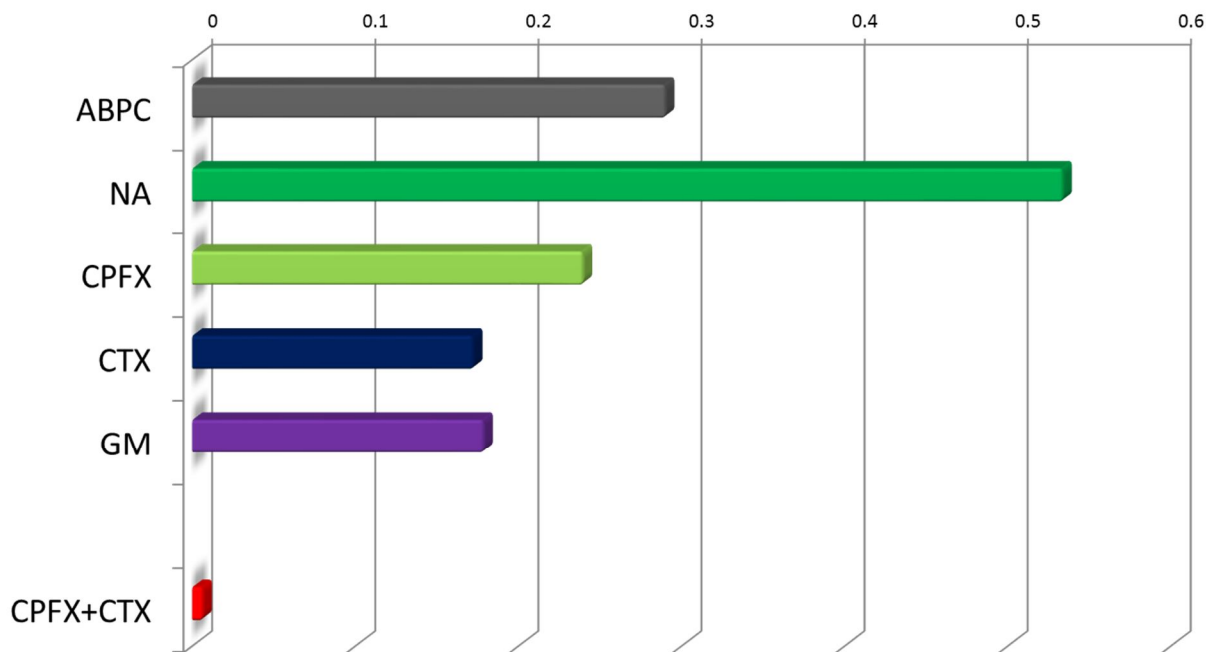


图 5 . *S. sonnei* 藥劑耐性分布 2 (2011-2015 年)



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 28 年度分担研究報告書

食品媒介リステリア症のリスク制御
（各国におけるリステリア症発生状況及び
Listeria monocytogenes 菌株の分子疫学的解析に関する研究）

分担研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第三室長
研究協力者 下島優香子 東京都健康安全研究センター 微生物部
井田美樹 東京都健康安全研究センター 微生物部
西野由香里 東京都健康安全研究センター 微生物部
吉田麻利江 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
渡邊真弘 一般財団法人 日本冷凍食品検査協会
泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

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)は、主に本菌に汚染された食品を媒介して感染することが知られている。本菌は動物の腸管内、河川水、土壌等の自然界に広く分布しており、食品原料の一次汚染が起こりやすい。また、低温や高食塩濃度等への環境抵抗性が強く、冷蔵庫内でも増殖すること、食品製造環境で長期間生残するため、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。欧米諸国では例年、様々な食品を原因とするリステリア症の集団感染が起こっている。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、散発事例は年間約 200 例と推定されている。髄膜炎、敗血症等侵襲型リステリア症の潜伏期間は長いことが多く、数週間から最長 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となっている。

本研究では、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。本年度は、研究室保有の食品株のデータを蓄積するとともに、国内で発生した散発事例由来株の解析を行った。また、研究協力者によるデータの統合を行い、データベースの充実を図った。

A.研究目的

食品媒介感染症の中で最も致命率が高いことが知られているリステリア症は、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。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。米国での近年の主な集団事例には、2011年のカンタロープメロンを原因食品とした事例(患者数147、死者33名)、2010年から2015年にかけて発生したチーズを原因とする事例(患者数30名、死者3名)、2010年から2015年にかけて発生したアイスクリームを原因とする事例(患者数10名、死者3名)、2014年から2015年にかけてカナダも含め発生したキャラメル掛けりんご(患者数36、死者7名)、2015年から2016年にかけて発生したパック詰めサラダを原因とする事例(患者数19、死者数1名)及び2013

年から2016年にかけて発生した冷凍野菜を原因とする事例(患者数9、死者数3名)等がある。欧州では、デンマークで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、イタリアでは2015年から2016年にかけて、原因食品が同定されていない同一株による集団事例が発生している。また、2015年のリステリア症確定患者数はドイツが580例、フランスが410例、イギリスが186例、スペインが206例、イタリアが153例等となっている。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。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 373 株を用いた *L. monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的解析を実施した。

A. 研究方法

1. 検体

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 患者由来株 108 株、リステリア症感染牛由来株 2 株、牛腸内容物由来株 1 株、食品由来株 260 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株を用いた。血清型の内訳は、1/2a が 149 株、1/2b が 60 株、1/2c が 35 株、4b グループ (4ab、4b、4d 及び 4e) が 113 株、その他の血清型が 17 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、optimization は 0%、tolerance は 1.5 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

2016 年に発生した海外におけるリステリア症の集団事例について、国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部が発表している食品安全情報、米国 CDC、ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases、Eurosurveillance 等を基に、情報を収集した。

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 PFGE 解析の結果を図 1 に示した。75% 以上の相同性を示す菌株を同一クラスターとした結果、全菌株は 27 クラスターに分類された。各クラスターは血清型との強い相関を示した。血清型 1/2b グループ (1/2b 及び 3b) に属する菌株は食品由来株 49 株、環境由来株 1 株及び患者由来株 14 株が含まれており、3 クラスターに属していた。本グループの患者由来株の内 12 株は、同一クラスターに分類された。また、牛肉由来株 21 株の中で、本グループに属する株は 1 株のみであった。血清型 4b グループ (4ab、

4b、4d 及び 4e) に属する菌株は食品由来株 45 株、患者由来株 63 株及び感染牛由来株 2 株及び牛腸内容物由来株 1 株が含まれており、5 クラスタに分類された。5 クラスタ中 2 クラスタはそれぞれ 1 株が属しており、複数の菌株からなるその他の 3 クラスタ (第 23、24 及び 25 クラスタ) には、患者由来株が偏りなく分布していた。また、全患者株の 62% (67 株) がこれら 3 クラスタに属していた。本グループに属する牛肉由来株は 7 株のみであったが、その内 5 株が第 24 クラスタに属していた。血清型 1/2a グループ (1/2a、1/2c 及び 3a) に属する菌株は食品由来株 166 株及び患者由来株 25 株が含まれ、19 クラスタに広く分布しており、分子疫学的に多様性が高いことが示された。一方、同グループ内の血清型 1/2c に属する 35 菌株は単一クラスタに分類された。また、本グループの患者由来株 25 株中 13 株は単一クラスタ (第 16 クラスタ) に属していた。本クラスタは、鶏肉及び水産食品との相関は高かった。

食品由来株で患者由来株と 100% の相関性を示したものは、明太子由来株、豚肉・鶏肉及びマグロ由来株、牛肉由来株 (3 株)、豚肉由来株、エシャロット由来株、ソーセージ由来株、松前漬由来株であった (表 2)。

患者株間で同一血清型に属し、PFGE 解析で 100% の相関性を示したものは 5 組存在した (表 3)。

2. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

2016 年に諸外国で発生した患者数が 3

名以上のリステリア症集団事例は 5 例の報告が見られた。原因食品は、3 例が野菜、2 例が不明であった (表 4)。発生国は米国、カナダ、ドイツ、イタリアであった。

D. 考察

本研究において、研究協力者の東京都健康安全研究センターとデータの統合を行い、患者由来株 108 株、リステリア症感染牛由来株 2 株、牛腸内容物由来株 1 株、食品由来株 260 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株について PFGE による解析を実施した結果、いくつかの食品由来株は特定のクラスタに高い相関をもって分類されることが示された。患者由来株と 100% の相関性を持つ食品由来株が 14 株検出されたが、分離年又は血清型の違いから、直ちにそれらの事例の原因食品とすることはできなかった。これらのデータの有効な活用には、更に菌株数を蓄積する必要があると思われた。一方、患者株間で 100% の相関性を示す株は 5 組見られ、同一或いは比較的近い分離年の株が含まれていたことから、未知の小規模な集団事例の可能性も考えられた。その同定には、さらに詳細な菌株間の解析が必要となり、今後の検討課題となった。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、国内のより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。海外事例からは、近年のリストeria症の集団事例の原因食品が従来多かった動物性食品から、野菜、果物等多様な食品に拡がりを見せており、国内への侵入経路として様々な食品を考慮に入れる必要性が高まっていると同時に、国内汚染実態についても、様々な食品について調査を行う必要があると思われた。

E. 結論

本研究の結果、リストeriaの PFGE 解析において、現時点で直接的な散発事例の原因食品同定には至らなかったものの、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トeria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。また、過去の散発事例の中で同一菌株による可能性が高いものが見られたため、今後の解析により未発見の小規模な集団事例の解明に繋がり得ると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 . PFGE 解析結果

	血清型	合計 菌株数	牛肉	豚肉	鶏肉	食肉製 品	水産 加工品	乳 製品	野菜類	複合食品	牛 関連	患者	その他
Cluster 1	1/2a	30	2	5	2	15		1		4		1	
Cluster 2	1/2a, 1/2c, 3c	43	7	7	3	13	7	1		1		4	
Cluster 3	1/2a	13				7	2		1			3	
Cluster 4	1/2a	1							1				
Cluster 5	1/2a	7				7							
Cluster 6	1/2a, 3a	3				2	1						
Cluster 7	1/2a	3			1	2							
Cluster 8	1/2a	1							1				
Cluster 9	1/2a	18	2	4	3	5	3					1	
Cluster 10	1/2a	3					2		1				
Cluster 11	1/2a, 3a	7			2	2		3					
Cluster 12	1/2a, 3a	7					1	1	2			3	
Cluster 13	1/2a	3				2			1				
Cluster 14	1/2a	1					1						
Cluster 15	1/2a	1								1			
Cluster 16	1/2a, 3a	47	2	1	14	4	13					13	
Cluster 17	1/2a	1				1							
Cluster 18	1/2a	1						1					
Cluster 19	1/2a	1					1						
Cluster 20	1/2b, 3b, UT	50		5	5	8	8	4	3	3		12	2
Cluster 21	1/2b, 3b	4					3			1			
Cluster 22	1/2b	11	1	2		4	1					3	
Cluster 23	4b, 4d	18	1		2		1	2	1	3		8	
Cluster 24	4ab, 4b, 4d, 4e, UT	58	5	3		7			3	1	3	36	
Cluster 25	4ab, 4b, 4d, UT	39	1	4	1	8	1					23	1
Cluster 26	4b	1					1						
Cluster 27	4b	1										1	
		合計	21	31	33	87	46	13	14	14	3	108	3

表 2 . 患者株と 100%の相同性を示した食品由来株

	由来食品	血清型	分離年	相同パターンの患者由来株の分離年	
1	明太子	1/2a	2009	2006	
2	豚肉	1/2a	2012	2002	
3	鶏肉 1	1/2a	2012	同上	
4	鶏肉 2	1/2a	2012	同上	
5	鶏肉 3	1/2a	2012	同上	
6	マグロすきみ 1	1/2a	2009	同上	
7	マグロすきみ 2	1/2a	2009	同上	
8	マグロ刺身	1/2a	2009	同上	
9	ソーセージ	1/2a	2013	2011	
10	松前漬け	4b	2002	1987	
11	牛肉	4d	1991	1988	1991(血清型は 4 b)
12	エシャロット	4b	2004	2002	
13	牛肉	4b	1991	不明	
14	豚肉	4b	1991	1988(2 株)	

表 3 . 患者株間で 100%の相同性を示したもの

	血清型	分離年
1	1/2b	1998 及び 1992
2	4b	1988 及び 1991
3	4b	1989、1992 及び 1995
4	4b	1988
5	4b	1988

表 4 . 2016 年に発生した主なリステリア症集団事例

	発生国	時期	原因食品	患者数	死者数	備考
1	米国	2015.7 ~ 2016.1	包装済みサラダ	19	1	周産期 1 名
2	カナダ	2015.5 ~ 2016.2	包装済みサラダ	14	3(リステリア症によるかは不明)	1 と同一食品
3	米国	2013.9 ~ 2016.7	冷凍野菜	9	1	
4	ドイツ	2012.11 ~ 2016	不明	66	3	周産期 4 名
5	イタリア	2015.1 ~ 2016	不明	11	1	

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
 「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
 平成 28 年度分担研究報告書

微生物・ウイルスの食品安全情報の収集解析

分担研究者 豊福 肇 山口大学共同獣医学部

研究要旨

昨年度作成した Hazard の特性、国の National Food Control System (NFCS) の performance、喫食、曝露データ等の食品に specific なデータを網羅した半定量モデルを再検討し、入力項目を修正、再構築した。

今年度は改良したモデルに *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* に絞り、また違反が多い食品カテゴリーに絞ってモデルにデータを実装しリスクランキングを行った。データや情報から管理が不十分と評価された国から輸入される食品の検査を強化することにより、限られたリソースを有効に活用し、より効果的効率的な輸入時の微生物モニタリングが実施できると考えられた。

A. 研究目的

諸外国の食品安全管理体制などを考慮して、それが十分でない国からの輸出食品については検査を強化することで、監視を効率的に行い、我が国に侵入する生物学的ハザードのリスクを低減させるために、諸外国での食中毒発生状況、食品の汚染実態、検査監視体制、管理措置等について調査解析し、検査のリソースをよりハイリスクな国、食品及び生物学的ハザードの組合せに配置できるように、評価する仕組みを構築することを目的とした。

System (以下「NFCS」という。)及び食品ごとにスコアをつけ、それらを乗じてリスクランキングを試みた。



図1：リスクランキングの構造図

また、3部分、それぞれのデータとデータの出所を表1～3に示した。

B. 研究方法

昨年度作成したモデルを再度詳細に解析し、その欠点、問題点を明らかにし、追加項目及びそのデータの出どころを明らかにした。

表1 ハザードに関するデータ、データの出所及びスコア

データ	データの出所
WHO の FERG の疾病数	Kirk, et.al. 2015 . PLOS Medicine 12(12)e1001921
Severity(% of death) FERG のレポート	患者数にしめる死者数 データ ソースは同上
Severity (DALYs)	同上
Source attribution	Interagency food

C.研究結果

次の3要素を掛け合わせたモデルで、ハザード、輸出国の National Food Control

	safety analytical project report (2015)
食品中での汚染率	EU Zoonosis report (EUのみ)
FDA Reject	米国 FDA
RASFF Alart	EU EASFF

表2. 輸出国の NFCS に関するデータ、データの出所及びスコア

項目	データの出所
基本的食品衛生法規	厚労省事前調査資料
HACCP 義務化	同上
食品衛生担当部局の有無	同上
Canada Ranking	2014 World Ranking of National Food Safety Performance Inputs

表3. 食品に関するデータ、データの出所及びスコア

項目	データの出所
日本での喫食量	国民栄養調査、FSC のリスク評価
喫食頻度	FSC リスク評価書
意図される用途/喫食前にハザードが死滅する可能性	Expert Opinion
食品中でのハザードの増減加工の効果)	Expert Opinion
日本への輸入量	輸入食品統計
交差汚染の可能性	Expert Opinion

問題点 1: ハザードに関するデータの見直し

昨年度のモデルでは EU の患者届け出数を用いていたが、より世界的な観点から WHO の FERG 報告書 (Plos Med 12(12),e1001921) の疾病数に、重篤性は同じく FERG で推定された死亡者数を患者数で割った割合に、また DALYs も同報告書の数値に変更した。当初、アメリカ、日本の食中毒データのみならず、その他の国のデータも入力データにすべく検討したが、WHO の FERG のデータで世界中を包含していると考え、そのようなアプローチはとらなかった。また、各国の人口 10 万人当たりの例えばサルモネラ症の患者といったデータについても、検討したが、先進国しか入手できず、断念した。その結果、ハザードの入力項目の上のほうは、みな同じになってしまった。食中毒の source attribution については、FDA, CDC, FDA による Interagency food safety analytics collaboration project による *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, STEC O157 及び *Campylobacter* による source attribution report(2015 Feb)の数値を用いた。(*Listeria monocytogenes* については、豚肉、七面鳥はそれぞれ 2%、6%で Low, 乳製品は 31%は M, 果実は 50%で high とし、*Salmonella* については卵、果実、種子野菜が H, 牛肉、豚、鶏肉、七面鳥、Sprout が M, 乳製品、魚、生野菜は L とした。)

問題点 (要改良) 2: 国の NFCS の部分が弱い

基本的食品衛生法規及び食品衛生担当部局の有無については、調査したすべての国で調査結果からはあることになっていた。HACCP 義務化については、公開情報上、すでに義務化している食品は 1, 任意、または輸出のみについては 2 とした。

昨年度のモデルで大きな差が生じるのは 2014 World Ranking of National Food Safety Performance (by the Conference board of Canada)の結果があった。このデータを使用

したのは、国の食品安全パフォーマンスを評価した唯一の研究であったからである。しかし、このランキングにも、種々の問題が認められた。

まず、その項目である。Inputs は以下のとおりであった。

- 1 . Chemical risk assessment
 - 農地 1000 ha あたりの平均農薬資料量 (トン) (Data source: FAOSTST)
 - Total Diet Study の有無
- 2 . Microbiological risk assessment
 - 人口 10 万人当たりの *Campylobacter*, *Salmonella*, VTEC, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes* の患者数 (Underreporting)
 - 喫食量調査
3. Inspection and Audit:
 - 監視員数、監視数、監視での違反件数、(入手困難)
4. Risk Management
 - WHO の Food Safety and other emergency response 18 Q
 - 人口 100 万人当たりの Food recall
 - カナダ食品検査局, RASFF 及び FSANZ の food recall 統計
 - Food Traceability
 - アレルギー表示の有無
 - Public Trust

このうち、1 . Chemical risk assessment

- 農地 1000 ha あたりの平均農薬資料量 (トン) (Data source: FAOSTST)
 - Total Diet Study の有無
- 2 . Microbiological risk assessment
- 喫食量調査
- 4 . Risk Management の以下
- Food Traceability
 - アレルギー表示の有無
 - Public Trust

は、本研究とは直接関係ないこと、また、対象が OCED の上位 20 か国のみで、それ以外の東南アジア、南米の国々が対象となっていない等の問題点が浮き彫りになった。

そこで、国の食品コントロールシステムのデザインにおいて考慮すべき要素について、コーデックスの文書 (GL82-2013) を基に、以下の項目について、適切な indicator を設定し、データ化できないか検討した。

- Existing or necessary regulatory and legislative framework (laws, regulations, guidance);
- How the national food control system relates to international and national standards including food import and export system requirements;
- * The recognition of other food control systems, including equivalence⁸;
- * The level and method of oversight including control programs from primary production through manufacturing to transportation and distribution;
- * How issues and risks are managed;
- * Enforcement and compliance programs;
- * Coordination and communication between authorities with control responsibilities in different parts of the food chain and with the public health authorities;
- * Clearly defined roles and responsibilities;
- * Access to adequate laboratory capacity and capability;
- * Staff competence and training;
- * The resources needed to meet the objectives of the national food control system, their allocation and how the system is to be funded;

- * Surveillance, investigation, emergency preparedness and response to food borne and food related incidents;
- * Assessment and evaluation;
- * Stakeholder engagement;
- * International communication and harmonization; and
- * Periodic review and continuous improvement
- * The assessment of control programs should cover issues such as:
 - * Effectiveness of control procedures;
 - * Suitability in achieving objectives;
 - * Whether the program has covered relevant stages in the production chain, taking into account risk factors; and
- * Consideration of emerging trends.

残念ながら、監視安全課に保管されていた既存の各国の調査資料や web 情報ではこれらの情報は得られなかった。

また、FAO の Risk Based Food Inspection Workshop 2011 の報告書では、表 4 に示す項目が輸入食品のリスクに基づく項目として挙げられた。

表 4 リスクに基づく項目

1.1	喫食に適さない食品を市場に出させない権限が法にあるか？	
1.2	日付表示を義務つける法があるか？	
1.3	もし、Yes なら説明せよ	
2	食品輸出者、輸入者の責務	
2.1	規格はあるか？	
2.2	あるなら説明せよ	
3	重量ベースで輸入量が多い食品をあげよ	
4	輸入時、効果的に検査を実施して	

	いるのはだれか？	
5	どの食品を検査するか決めるクライテリアはあるか？	
5.1	あるならどんなものか？	
5.2	文書になっているか？監視員次第か？	
6	荷物・食品の検査	
6.1	およそ何%を検査しているか？	
6.2	どのくらいの頻度で検査をしているか？優先的に検査をする食品はあるか？	
7	どんな検査をしているか？（物理的に開封しての検査、日付け表示、原材料の確認、サンプル？）	
8	検査室	
8.1	検査するとしたら、どこで検査するのか？	
9	記録と文書化	
9.1	どんな記録を保管しているか？	
10	他国とのコミュニケーション	
10.1	他国とコミュニケーションをとっているか？	
10.2	もし、yes なら、いつ、どんなときに、何を？	

(出典：FAO Risk Based Import Food)

このうち、食中毒に最も関連性が高く、リスクランキングに影響が強いと考えられた高いと考えられた項目は表 5 の 1.1, 2.1, 4, 5, 6.1, 6.2 および 7 であるが、監視安全課に保管されていた既存の各国の調査資料や web 情報ではこれらの情報は得られなかった。

さらに、WHO の国際保健規則(IHR:2005) の食品安全 Core Capability Questions and criteria (WHO IHR National Capacity Monitoring Survey のデータの活用を検討した。

ここでいう「食品安全 Core Capability」の定義は、食品由来疾患及び食品汚染を検出し、対応するメカニズムを確立し、機能させ

ることであり、表 5 に示した質問に対する回答から 100 点満点で WHO がデータを発表している。その結果は表 6 のとおり。

<http://apps.who.int/gho//data/view.main.IHRCTRY11v>。

IHR の Core Capacity であるため、食品安全管理システムのうち、緊急時対応の部分が強いこと、WHO の質問状に対する各国政府の自己申告なので、どの程度まで正確化は若干疑問が残ること、2015 年の調査結果で 100 点満点の国は 52 か国あり、WHO が求める食品安全のコアとなる能力はあるとは言え、例えば、中国、ベトナム、メキシコ、キューバなどが米国や EU と同じレベルの NFCS を有しているかといえ、これも若干疑問は残る。しかし、昨年度用いたカナダのランキングよりは十分、各国の NFCS を反映していると考えられ、カナダのデータの代わりに、このデータを用いることにした。

さらに、EU 域内各国の food safety GeoRisQ: Food Safety Performance Monitor のプロジェクト報告書から、EU 各国の indicator の設定過程について、検討した。
projects.hcss.nl/monitor/57/report/report.pdf

図 2 にその概念図を示した。

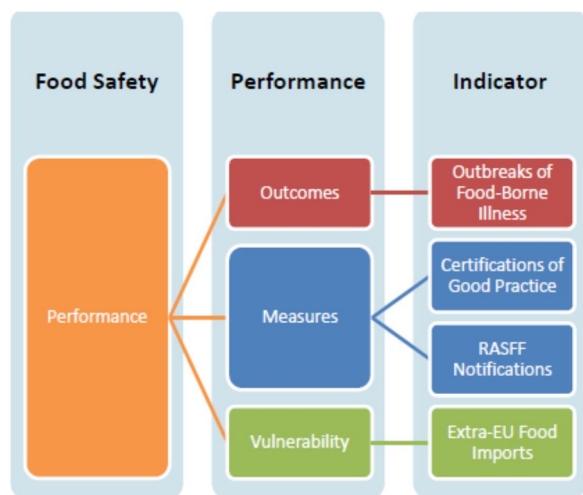


図 2 performance indicator の概念図

このなかで、4 つの indicator : すなわち：人口 10 万人当たりの食品由来疾患のアウトブレイク数、従業員 10000 人あたりの BRC (British Retail consortium: イギリスが発祥の世界中で使用されている小売業界を中心とした GHP と HACCP の認証スキーム) の証明書、RASFF、人口当たり EU27 各国以外からの食品購入額 を用いていた。

この結果を図示したのが、図 3 - 5 である。

図 3 アウトブレイク数によるランキング

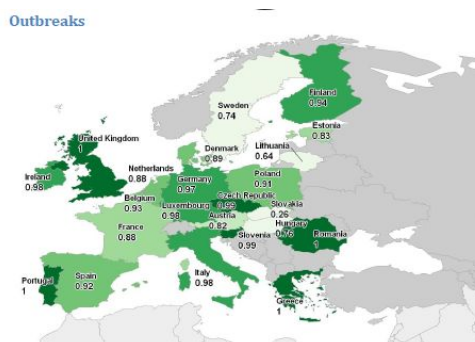


Figure 3 Number of Outbreaks of Food-Borne Illness, Reporting Rate per 100 000 Population in 2010 (Performance Score)
This map shows performance in terms of outcomes: a higher score reflects a low incidence of food-b-

図 4 BRC 証明書によるランキング

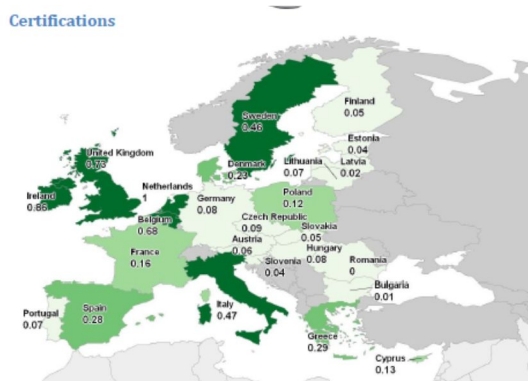


Figure 4 BRC Certifications per Food Industry (Performance Score)

図5 RASFF への通報によるランキング

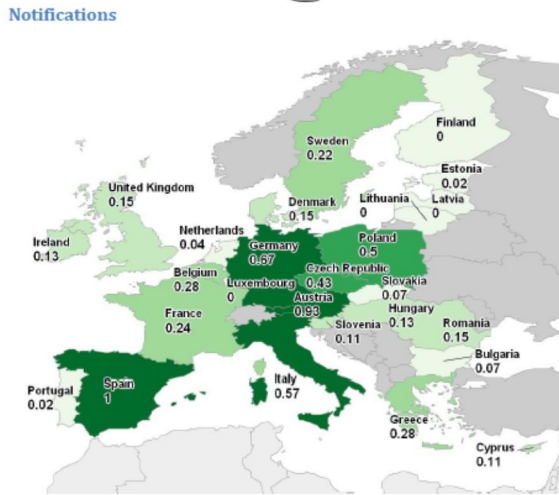


Figure 5 RASFF Follow-up Notifications (Performance Score)

図6 輸入食品の割合によるランキング

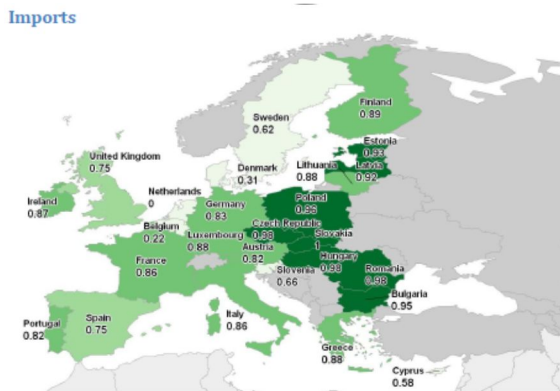


Figure 6 Food Imports from Outside the EU (Performance Score)

図7 総合ランキング

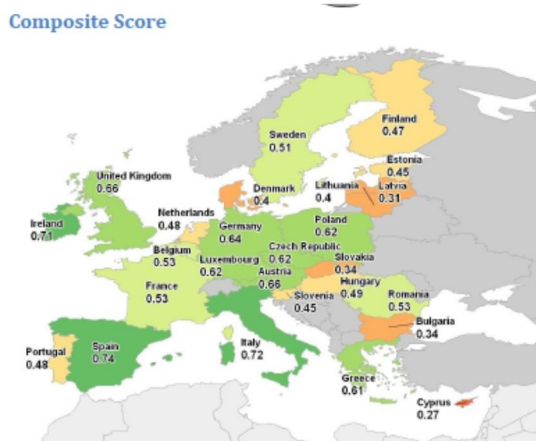


Figure 2 GeorisQ Monitor: Member State Performance in Mitigating Food Safety Risks (Score)

総合では緑が濃く、数字が1に近いスペイン、アイルランド、イタリアが高いスコアであった。次のグループは英国、ドイツ、ルクセンブルク、ポーランド、チェコ、オーストリア、ギリシャであった。

結論として、カナダのランキングを用いず、WHOのIHR Core capacity及びEUに関してはEU projectの結果をあわせて考えることにした。ただし、EU以外はexpert opinionにより数値をあてた。

2007年から2015年に、米国FDAの輸入時の微生物検査により輸入を拒否された検査項目と食品は、昨年度と同じなので、割愛した。同様に、「食品及び資料に関する早期警告システム」の2014年1月から2015年2月の間の菌種ごと、食品カテゴリーごとのアラート情報も昨年と同じデータを用いたので、割愛した。

表7に改編したモデルによる生ハム中の*Listeria monocytogenes*(Lm)のリスクランキングを示した。輸入届出件数の多かった国であるイタリア、スペインは中程度、輸入量が多いなかでは米国、ついてフランスが1,2位をして、輸入量上位2国をうわまった。これはEUプロジェクトでフランスの値がよくないことにも起因する。ドイツは今年のモデルでは輸入件数が少ないにもかかわらず、ほぼ上位2か国と同じスコアであったが、改良モデルでは低下した。スペインも低下がみられたが、これもEUプロジェクトデータによる。

表8に改編したモデルによるソフトチーズ中のLmのリスクランキングを示した。輸入届出件数の1位のフランスが1000超え、他の国を大きく引き離し、次に2位のイタリアが100以上低下し第2位であった一方、3位の米国は改編後もほぼ最も低いグループであった。輸入届出件数が低い国ではドイツのスコアが第2位のイタリアとほぼ同じ程度であった。

表9に果実中のLmのリスクランキングを示した。輸入届出件数の2番目のフィリピンが

トップで、届出件数 6 位のエクアドル、メキシコ、チリがほぼ同じスコアで続いた。輸入届出件数の第 1 位のアメリカは のほう、豪州、NZ、韓国が最もリスクが低い国であった。

表 10 に燻煙魚中の Lm のリスクランキングを示した。輸入届出件数の 4 番目のチリがトップ、次いで 8 位のフィリピンが、次いでかなりはなれて 2 位と 5 位のイギリス、フランスまでが高かった。届出件数の 1 番目のスイスは低く 550、あとはスペイン、豪、アメリカ、ノルウェーが 400 台と低かった。

表 11 に Lm の生ハム、ソフトチーズ及び燻煙魚のリスクランキングの比較を示した。相対的にソフトチーズと果実のスコアが高かったが、ソフトチーズの場合はハザードカテゴリーのスコアが高かったため、果実の場合は NFCS のスコアが大きかったこと、米国輸入時検査及び EU の RASFF の警告件数に伴うハザードスコアの上昇によるものである。

表 12 は果実中の *Salmonella* のリスクランキングを示したものである。届出数 2 位のフィリピンがトップ、次いで、届出数 3, 4, 5, 6 位のメキシコ、チリ、タイ、エクアドルがわずかの差で続いた。届出数第 1 位の米国は中程度のスコアであった。届出数第 7 位の豪州が 10 位の南アと同スコアで最も低かった。

表 13 は果実について *Listeria* と *Salmonella* の比較をしたものである。ハザードのスコアが *Salmonella* のほうが高いため、相対的にリスクは *Salmonella* が高いが、順位の傾向は同じで、南米、東南アジアが高く、豪州、NZ は低かった。

表 14 は魚介類中の *Salmonella* のリスクランキングを示したものである。魚介類すべてのデータを合算したため、「意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性」、「食品中でのハザードの増減(加工の効果)」、「交差汚染の可能性」は種々の食品があるため、中央値の 2 を割り当てた。スコアは届出

件数 1 位、2 位の中国、タイがトップ、届出件数は 10 位のフィリピン、7 位のチリ、8 位のミャンマー、12 位のインドがそれに続き、さらに 4 位のインドネシアが続いていた。欧州、北米の国々のスコアは概して低かった。

D. 考察

今回モデルを作成して病原菌、食品カテゴリー、輸出国別のリスクランキングを試みた。

昨年特定した課題としては、以下のとおり、

1) 食品分類のレベル

検討はあまり進まなかった。

2) NFCS の performance

昨年度よりは改善されたと思うが、より詳細な情報が必要

3) 喫食データ

喫食データは解決策が見いだせなかった。喫食データと食品のカテゴリーも大きな Data gap であった。

4) 輸入量は昨年度、届出データか 重量データで、比較し、大きな差が認められなかったので、届け出ベースで実施した。

5) 食品カテゴリーのスコアの差

食品カテゴリーのスコアの差は輸入量の差のみであった。この部分はより改善する必要がある。

5) FDA の *Salmonella* と *Listeria* で Rejection されている食品の数の差をどう反映すべきか? (今回は同じ推計した。)

依然として課題として残っている。

6) 我が国での輸入実績が少ないが、FDA や RASFF で違反や警告になっている国の製品のとりあつかいはどうすべきか。

依然として課題として残っている。

7) 今回は食品分類間での届出件数の差はモデルに反映されていない。これについても、依然として課題として残った。

8) ハザード、NFCS、食品という3つのカテゴリーの数値を乗じてスコアを試算しているが、NFCSの数値の変化がモデルの結果に大きく反映される。NFCSのperformanceをよりの確に反映でき、かつ信頼できて、入手可能なデータの検討が必要と考えた。
これは若干改善されたと考える。

昨年モデルに比べ、スペイン、ドイツ、豪州、NZのリスクの低下が目立った。同じEUでもイタリア、フランス、デンマークは逆にリスクが上昇していた。これは、EU域内のNFCSのPerformance indicatorが原因と考えられた。

新たな課題

1. 患者発生数の地域、国の差。

ハザードの部分で、各国ごとの人口10万人当たりの患者数を入力インプットにしようとしたが、データ不足で断念し、各国ごとの差ではなく、FERGの各ハザードの患者推定、入院推定を基にしている。国毎データは無理なので、regionごとに患者発生推定数に基づき補正をこころみた。

サルモネラについて、地域補正はEUを1として、AFR4.8, AMR5.4, EMR 8.7, SEAR4.9, WPRO4.8、リステリアについてはAMR0.5, AMR1.5, EMR0.5、SEAR0.5, WPRO1となる。表15に魚介類中の*Salmonella*のリスクランキングに地域調整として、ヨーロッパ以外は患者数のインプットを3から4にあげて計算した例をしめす。順位には影響はなく、相対リスクが1, 2位の国と最小国との差が開いた。この地域調整数値をどのようにモデルのインプットに反映させるかは、さらに今後の検討が必要と考えられた。

2. 汚染率

これも食品ごとの汚染率は、固定値を用いているが、国ごとの汚染実態を反映させたいが、地域や国によってはデータがなく、また同一国の報告でもばらつきがあることから、どのようにモデルに反映するか、一層の検討が必要と考えられた。

3. EU域内各国の food safety GeoRisQ: Food Safety Performance Monitor

このアプローチは大変興味深いものではあったが、EU域外の国については、assumptionで数字を割り振ったため、不確実性が残った。どのように不確実性を減らしモデルに反映するか、一層の検討が必要と考えられた。

E. 結論

今回、昨年度作成したモデルの改良を行い、若干の改善は認められたが、データや情報から管理が不十分と評価された国から輸入される食品の検査を強化することにより、輸入時モニタリング等に活用して、より効果的な輸入食品に起因するリスクの低減化が図れると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

石崎直人, 小西良子, 豊福 肇. 蛍光ラテックスビーズを用いた食肉中汚染微生物の分析サンプルへの存在確率の推定. 日本防菌防黴学会誌, Vol.45, No.1, pp.3-8 (2017)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表5 WHO Core Food Safety Control の評価の自己チェック項目

- 11.1.1.2. 食品安全コントロールを促進するため、国の食品法、規則または政策があるか？
- 11.1.1.3a. 国の食品法、規則または政策は更新されているか？
- 11.1.1.3b. 国の食品法、規則または政策は実施されているか？
- 11.1.1.4. 食品安全規制機関間で、調整メカニズムは確立されているか？（例）INFOSAN 緊急時コンタクトポイントと IHR のフォーカルポイント
- 11.1.1.5. 食品安全上の事件発生時に多くのセクション間の機能的なメカニズムはあるか？
- 11.1.1.6 あなたの国は INFOSAN ネットワークの活発なメンバーか？
- 11.1.1.7 食品安全リスクの優先獣医リストはあるか？
- 11.1.1.8 優先順位の高い食品安全イベントのサーベイランス、評価及び管理のガイドライン、またはマニュアルはあるか？
- 11.1.1.9. 上記のガイドライン、またはマニュアルは実施されているか？
- 11.1.1.10. 優先順位の高い食品安全イベントのサーベイランス、評価及び管理は見直され、必要に応じ更新されているか？
- 11.1.1.11. 食品の喫食による疫学的なデータはシステムチックに収集され、解析されているか？
- 11.1.1.12 リスクに基づく食品検査が実施されているか？
- 11.1.1.13. 国内または国際的な懸念の食品安全事故を確認するため、分子的なテクニックを含むラボのキャパシテフィを利用可能か？
- 11.1.1.14. 食品安全事故時に、規制機関、サーベイランス機関及びその他の関連する期間との間で、タイムリーで、システムチックな情報交換が行われているか？
- 11.1.1.15 食品安全事故を評価し、対応するため、専門家のロースターを有しているか？
- 11.1.1.16 食品安全事故に対応するための実行計画は実施されたか？
- 11.1.1.17a 食品安全事故に対応するための実行計画は実際の緊急時またはシミュレーション訓練でテストされたか？
- 11.1.1.17b. 食品安全事故に対応するための実行計画は必要に応じ、更新されているか？
- 11.1.1.18 汚染された食品を追跡、回収、及び廃棄するメカニズムがあるか？.

表 6

国別 Food Safety スコア (2010 - 2015)

	2015	2014	2013	2012	2011	2010
Afghanistan	40	20	20	13	25	26
Algeria	60	53	20	0	0	60
Andorra	67	67	0	73	83	80
Angola		20	27		58	
Antigua and Barbuda	100	100	80	80	75	73
Argentina	80	60	60	60	67	
Armenia	93	93	93	87	83	60
Australia	100	87	87	100	100	100
Austria	100	93	93	100	100	93
Azerbaijan		93	93		75	40
Bahamas	27	47			42	53
Bahrain	100	100	80	93	100	33
Bangladesh	93	73	47	27	25	40
Barbados	80	60	73	93	67	86
Belarus		93			100	
Belgium	100	100	100	100	100	93
Belize	53		27	67	83	46
Benin		13		13	33	40
Bhutan	53	53	27		42	40
Bolivia (Plurinational State of)	67	53	53	60	42	
Bosnia and Herzegovina	100	100			75	100
Botswana	67		33			53
Brazil	100	100	93		92	66
Brunei Darussalam	100	100	100	93	83	93
Bulgaria		100			100	
Burkina Faso		33	87	27		
Burundi	0	0	0	7	17	
C ̄te d'Ivoire			87		67	
Cabo Verde						60
Cambodia	73	67	47	40	33	53
Cameroon		73	73	47	50	13
Canada	100	100	100	100	100	100
Central African Republic		20	20		0	
Chad	47		27		42	
Chile	93	93	93	93	100	
China	100	87	100	93	92	100
Colombia	80	67	67	80	75	93

Comoros			13			
Congo			20	67	50	0
Cook Islands	73		100	100		
Costa Rica	100	100	100	100	67	100
Croatia	87	87	100		100	100
Cuba	100	100	100	100	100	
Cyprus		100	100		100	100
Czech Republic	100	100	100	100	100	100
Democratic People's Republic of Korea	80	73	67	60	33	93
Democratic Republic of the Congo	67	67	60	80	58	33
Denmark	100	100	100		100	93
Djibouti		80	60	67		
Dominica	100	87	86	73	50	20
Dominican Republic	47	27	27	27		40
Ecuador	93	80	53	60	17	46
Egypt		87	80	73	75	86
El Salvador	100	93	67	73	42	
Equatorial Guinea			20		17	
Eritrea	33	33	33		8	13
Estonia	100	100	100	100	83	93
Ethiopia	0	0		73	58	26
Fiji		100	87	60		26
Finland	100	87	87	100	100	100
France	100	100	100	93	83	86
Gabon					75	
Gambia		67	73		67	73
Georgia	87	100	67	67	67	86
Germany		100		100	92	100
Ghana		67	53	47	25	40
Greece						86
Grenada	67		67	67	58	
Guatemala	87	100	100	47	50	
Guinea	27	27			8	
Guinea-Bissau	0	0				
Guyana	53	73	67	67	75	46
Haiti	27	27	20		50	
Honduras	87	47	40	67	50	66

Hungary	100	93	100	93	100	86
Iceland		100		100	100	
India			100	80	58	53
Indonesia	100	100	100	87	83	100
Iran (Islamic Republic of)	100	100	100	100	58	60
Iraq		87	93	33	17	60
Ireland				100	100	100
Israel	100					0
Italy					92	93
Jamaica	87	47	67	93	100	46
Japan	100	100	100	100	100	100
Jordan		100	87	93	100	100
Kazakhstan	100	100	100	100	100	
Kenya			73	80	100	73
Kiribati		73	67	80	50	60
Kuwait	100	100	100	80	67	86
Kyrgyzstan					92	
Lao People's Democratic Republic	80	80	87	40	67	46
Latvia	100	100		100	92	73
Lebanon		87	73	60	67	80
Lesotho			80		67	73
Liberia					0	53
Libya	93	93	93	33	50	66
Lithuania	100	100	100	100	100	100
Luxembourg	80	80	80	73	83	93
Madagascar		27	27		50	
Malawi		40			58	
Malaysia	100	100	100	100	100	100
Maldives	73	100	93	67	75	80
Mali					50	
Malta		100	100	100	100	
Marshall Islands			27	20	33	60
Mauritania	20	20		13	8	33
Mauritius	73	87	60			
Mexico	100	100	93	87	83	60
Micronesia (Federated States of)	47	53	40	87	50	13
Monaco		100	100	100	100	
Mongolia	93	53	87	33	58	53

Montenegro	67	67	73	80		
Morocco		100	100	100	83	80
Mozambique	33		87	20	17	33
Myanmar	100	100	100	100	100	100
Namibia		60				
Nauru		60				40
Nepal	53	47	73	60	58	46
Netherlands	100	100	100	100	100	
New Zealand	100	100	100	100	92	100
Nicaragua	60	80	80	80	67	
Niger	53		75			
Nigeria	80	53	67	53	58	
Niue		73	67	53		
Norway	100	100	100	100		
Oman	100	80	80	93	100	20
Pakistan		53	53	47		6
Palau	100	100	100	100	100	93
Panama	60	60	87	93	75	
Papua New Guinea		67	47	47	75	
Paraguay	47		73	60	100	
Peru	100	100	87	93		
Philippines	80	80	60	47	92	33
Poland		73	73	73	92	93
Portugal	100	100			75	
Qatar		100	87	93	92	46
Republic of Korea		100	100	100		80
Republic of Moldova	80	80		67	75	93
Romania	93	87	93		92	86
Russian Federation	80	80			100	73
Rwanda	27	27	33			
Saint Kitts and Nevis	80		67	93		
Saint Lucia	60	60		40	50	0
Saint Vincent and the Grenadines	0	40	67	40		
Samoa	80	93	93	53	83	
San Marino						100
Sao Tome and Principe	0	0	0	27	33	53
Saudi Arabia		100	100	100	100	86
Senegal				40	42	

Serbia		40			42	
Seychelles	100	93	80	53	42	40
Sierra Leone		27	53		58	0
Singapore	100	100	100	100	100	100
Slovakia	100	100	100	100	100	93
Slovenia	100	100	100	87	75	93
Solomon Islands	53	53	27	27		
Somalia		0	7			
South Africa	100	100	80	60	100	93
South Sudan	0	0	0			
Spain	100	100	0	93	100	100
Sri Lanka	87	87	80	87	67	66
Sudan		40	73	7	0	40
Suriname	87	87	87	67	42	
Swaziland	40	60	47	47	67	46
Sweden	87	87	87	100	100	93
Switzerland	100	100	100	93	92	100
Syrian Arab Republic		80	80	87	50	53
Tajikistan	100	100		80	83	
Thailand		100	100	93	100	93
The former Yugoslav republic of Macedonia	100	100	87		75	
Timor-Leste	73	73	100	93	83	40
Togo	73	53	47		17	26
Tonga			60	40	42	60
Trinidad and Tobago	87	87	87	87		73
Tunisia		80	80	73	92	
Turkey		80		80		93
Turkmenistan		93			92	
Tuvalu	87		93	100		
Uganda			87	53	75	6
Ukraine	100					
United Arab Emirates	100	100	100	67	75	13
United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		No data	No data	No data	No data	No data
United Republic of Tanzania	87	60	60	53	67	
United States of America	100	100	100	100	92	100
Uruguay	100		100			
Uzbekistan		93			83	

Vanuatu	40		87	27		26
Venezuela (Bolivarian Republic of)	93	93	87	87	67	
Viet Nam	100	100	87	87	92	100
Yemen		33	33	40		
Zambia		100	93	93	75	
Zimbabwe		60			50	

表7 生ハム中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			伊	ES	仏	米	独	AT	HU	NZ	CA	豪
Hazard												
FERG の疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L: <10 ⁶	Listeria は 1.4*10 ⁴ , すなわち Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity(% of death)	H:>0.1, M:0.1- 0.01. L: <0.01	Listeria は 0 . 2 2 で High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	H:>10 ⁶ , M; 10 ⁶ -10 ⁵ , L: <10 ⁵	1.2 * 10 ⁵ で M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Source attribution	生ハム Low	Inter-agency study report	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中での汚 染率	2 - 3 %	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
USDA Recall		>10 High, 1:Low	0	0	0	3	0	0	0	0	1	0
RASFF Alert			1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
小計			9	9	9	12	10	9	9	9	10	9
国の national food control system												
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化		あれば 1、部分 2、なければ 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品安全担当部局の有無		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WHO Food Safety Core capacity		1 ~ 3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

EU Project		1	1	3	1.5	2	2	3	1.5	1.5	1.5
小計		6	5	7	5.5	6	6	7	5.5	5.5	5.5
食品											
日本での喫食量		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	10	10	10	9	9	9	9	9	9
合計		540	450	630	660	540	486	567	445.5	495	444.5

表8 ソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			仏	伊	米	豪	NZ	DK	独	NL	英	ES
Hazard												
FERG の疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ -10 ⁶ . L: <10 ⁶	Listeriaは1.4*10 ⁴ , すなわち Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity(% of death)	H:>0.1, M:0.1-0.01. L: <0.01	High—Listeriaは0.22で H	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	H:>10 ⁶ , M; 10 ⁶ -10 ⁵ , L: <10 ⁵	1.2 * 10 ⁵ で M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Source attribution		乳製品は M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
食品中での汚染率	0.43%	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Reject		>10 High, 1:Low	3	2	0	0	0	0	0	0	1	2
RASFF Alert			3						2	1	0	0
小計			15	11	9	9	9	9	11	10	10	11
国の national food control system												
基本的食品衛生法規		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化		あれば 1、部分 2、なければ 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品安全担当部局の有無		あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WHO Food Safety Core capacity		1 ~ 3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
EU Project			3	1	1.5	1.5	1.5	3	2	3	2	1
小計			7	6	5.5	5.5	5.5	7	6	7	6	5

食品												
日本での喫食量			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性	No		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減（加工の効果）	Decrease		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量			3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
交差汚染の可能性	Low		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計			10	10	10	10	9	9	9	9	9	9
合計			1050	660	495	495	445.5	567	594	630	540	495

表9 果実中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			米	Ph i	MX	チリ	タイ	EC A	豪	Kr	台湾	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard																		
FERG の疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L: <10 ⁶	Listeriaは 1.4*10 ⁴ , すな わち Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity(% of death)	H:>0.1, M:0.1- 0.01. L: <0.01	Listeriaは 0.22 で High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	H:>10 ⁶ , M; 10 ⁶ -10 ⁵ , L: <10 ⁵	1.2* 10 ⁵ で M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Source attribution		H	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中での汚 染率	2 - 3 %	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall	>10 High, 1:Low		1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
RASFF Alert			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1
小計			12	12	14	12	12	12	12	12	12	12	12	12	13	14	12	12

国の national food control system																	
基本的食品衛生法規	あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務化		2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2
食品安全担当部局の有無	あれば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WHO Food Safety Core capacity	1~3	1	3	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
EU Project		1.5	3	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3	3	3	3	3
小計		6.5	10	8	9	8	9	5.5	6.5	7.5	6.5	5.5	8	8	7	8	8
食品																	
日本での喫食量		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
喫食頻度		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量		3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
合計		780	1080	1008	972	864	972	528	624	720	624	528	768	832	784	768	768

表 10 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			CH	英	NZ	チ リ	仏	Ca	タ イ	Ph i	No r	米	中	ES	豪	DK
Hazard																
FERG の疾病 数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L: <10 ⁶	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity(% of death)	H:>0.1, M:0.1- 0.01. L: <0.01	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	H:>10 ⁶ , M; 10 ⁶ -10 ⁵ , L: <10 ⁵	M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Source attribution		Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中での汚 染率	2 - 3 %	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall	>10 High, 1:Low		1	3	1	3	1	3	2	1	2	1	3	2	1	1
RASFF Alert			1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2
小計			10	12	10	12	12	12	11	10	11	10	12	11	10	11
国の national food control system																
基本的食品衛生法規		あ れ ば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HACCP 義務 化			1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1

食品安全担当部局の有無	あれば1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WHO Food Safety Core capacity	1~3	1	1	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1
EU Project		1.5	3	1.5	3	3	1.5	3	3	1.5	1.5	3	1	1.5	3
小計		5.5	7	5.5	9	7	5.5	8	10	5.5	5.5	8	5	5.5	7
食品															
日本での喫食量		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
喫食頻度		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量		3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8
合計		550	756	495	972	756	594	792	900	484	440	768	440	440	616

表 11 Listeria の生ハム（非加熱食肉製品）、ソフトチーズ、燻煙魚の比較

非加熱食肉製品	米	仏	ハンガリ ー	伊	独	CA	AT	ES	豪州, NZ
Hazard	12	9	9	9	10	10	9	9	9
NFCS	5.5	7	7	6	6	5.5	6	5	5.5
Food	10	10	9	10	9	9	9	10	9
Total	660	630	567	540	540	495	486	450	445.5

ソフトチー ズ	仏	伊	NL	独	DK	UK	US, OZ	ES	NZ
Hazard	15	11	10	11	9	10	9	11	9
NFCS	7	6	7	6	7	6	5.5	5	5.5
Food	10	10	9	9	9	9	10	9	9
Total	1050	660	630	594	567	540	495	495	445.5

果実	フィリピン	MX	チリ	タイ	ペルー	Fr	US	中, Br, Vn	台湾	南ア,K	NZ, OZ,
Hazard	12	14	12	12	13	14	12	12	12	12	12
NFCS	10	8	9	8	8	7	6.5	8	7.5	6.5	5.5
Food	9	9	9	9	8	8	10	8	8	8	8
Total	1080	1008	972	864	832	784	780	768	720	624	528

Smoke fish	チリ	Phil	タイ	中国	仏, UK	DK	Ca	CH	NZ	Nor	米	ES	OZ
Hazard	12	10	11	12	12	11	12	10	10	11	10	11	10
NFCS	9	10	8	8	7	7	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5	5.5
Food	9	9	9	8	9	8	9	10	9	8	8	8	8
Total	972	900	792	768	756	616	594	550	495	484	440	440	440

表 12 果実中の *Salmonella* のリスクランキング

			米	Ph i	M X	チリ	タイ	EC A	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Pe ru	仏	Br	VN
Hazard																		
FERG の疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L: <10 ⁶	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity(% of death)	H:>0.1, M:0.1- 0.01. L: <0.01	3 ⁻³ =Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (DALYs)	H:>10 ⁶ , M; 10 ⁶ -10 ⁵ , L: <10 ⁵	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
食品中での汚 染率		M	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
FDA Recall	>10 High, 1:Low		1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
RASFF Alert			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計			14	14	16	14	14	14	14	14	14	14	14	15	14	14	14	15
国の national food control system																		
基本的食品衛生法規		あ れ ば 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

HACCP 義務化	任意は2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2
食品安全担当部局の有無	あれば1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WHO Food Safety Core capacity	1~3	1	3	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
EU Project		1.5	3	3	3	3	3	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	3	3	3	3	3
小計		6.5	10	8	9	8	9	5.5	6.5	7.5	5.5	5.5	8	8	7	8	8
食品																	
日本での喫食量		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
喫食頻度		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中でのハザードの増減（加工の効果）		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
日本への輸出量		3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
交差汚染の可能性		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
小計		10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
合計		910	1260	1152	1134	1008	1008	616	728	840	616	616	960	896	784	896	960

表 13 果実について *Listeria* と *Salmonella* の比較

Listeria	米	Phi	MX	チリ	タイ	EC A	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Per u	仏	Br	VN
Hazard	12	12	14	12	12	12	12	12	12	12	12	12	13	14	12	12
NFCS	6.5	10	8	9	8	9	5.5	6.5	7.5	6.5	5.5	8	8	7	8	8
Food	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total	780	1080	1008	972	864	972	528	624	720	624	528	768	832	784	768	768

Salmonella	米	Phi	MX	チリ	タイ	EC A	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard	14	141	16	14	14	14	14	14	14	14	14	15	14	14	14	15
NFCS	6.5	10	8	9	8	9	5.5	6.5	7.5	5.5	5.5	8	8	7	8	8
Food	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total	910	1260	115 2	1134	1008	1008	616	728	840	616	616	960	784	89 6	89 6	960

表 14. 魚介類中の *Salmonella* のリスクランキング

			中国	タイ	韓国	ネシア	Nor	米国	チリ	Myan	台湾	Phi	Ca	印	豪	Ice	NZ	仏
Hazard																		
FERG の疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L: <10 ⁶	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity(% of death)	H:>0.1, M:0.1- 0.01. L: <0.01	3 ⁻³ =Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (DALYs)	H:>10 ⁶ , M; 10 ⁶ -10 ⁵ , L: <10 ⁵	High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Source attribution		Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
食品中での汚 染率	2 - 3 %	Low	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FDA Recall			3	3	2	1	0	0	1	1	0	1	1	3	0	0	1	0
RASFF Alert			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
小計			12	12	11	10	9	9	10	10	9	10	10	12	9	9	10	9
国の national food control system																		
基本的食品衛生法規		あれ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

	ば1																	
HACCP 義務化		2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
食品安全担当部局の有無	あれば1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WHO Food Safety Core capacity	1~3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
EU Project		3	3	1.5	3	1.5	1.5	3	3	3	3	1.5	3	1.5	3	1.5	3	1.5
小計		8	8	5.5	7	5.5	5.5	9	8	8	10	5.5	7	5.5	7	5.5	7	5.5
食品																		
日本での喫食量		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
喫食頻度		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
意図される用途・喫食前にハザードが死滅する可能性		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
食品中でのハザードの増減(加工の効果)		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
日本への輸出量		3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
交差汚染の可能性		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
小計		15	15	15	15	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
合計		1440	1440	907.5	1050	693	693	1260	1120	1008	1400	770	1176	693	882	770	630	630

表 15. 地域調整した魚介類中の *Salmonella* のリスクランキング

			中国	タイ	韓国	ネシ ア	No r	米国	チリ	My an	台 湾	Phi	Ca	印	豪	Ice	NZ	仏	
Hazard																			
FERG の疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L: <10 ⁶	Hig h	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
地域調整後			4	4	4	4	3	3	4	4	4	4	3	4	3	3	3	3	3
ハザード			13	13	12	11	9	9	11	11	10	11	10	13	9	9	10	9	9
合計			1560	1560	990	1155	693	693	1386	1232	1120	1580	770	1274	693	882	770	630	630
地域補正前の合計			1440	1440	907. 5	1050	693	693	1120	980	882	1260	770	1176	69 3	882	770	630	630

国名略号一覧

伊：イタリア

ES：スペイン

仏：フランス

米：アメリカ合衆国

独：ドイツ

AT：オーストリア

HU：ハンガリー

NZ：ニュージーランド

CA：カナダ：

豪：オーストラリア

DK：デンマーク

NL：オランダ

英：イギリス

Phi：フィリピン

MX：メキシコ

ECA：エクアドル

Kr：韓国

SA：南アフリカ共和国

Peru：ペルー

Br：ブラジル

VN；ベトナム

Nor: ノルウェー

ネシア：インドネシア

Myan: ミャンマー

印: インド

Ice：アイスランド

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 28 年度分担研究報告書

きのこによる食中毒低減のための分子系統樹解析と検査法開発

研究分担者：近藤一成（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者：野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ（国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

日本国内で発生するきのこ食中毒は、大部分がクサウラベニタケ、ツキヨタケによるものである。特に近縁種が多く複数種からなると考えられ、形態学的な判別が困難なクサウラベニタケについて、種の再分類と毒性との関連付けを行った。日本のクサウラベニタケは学名 *Entoloma rhodopolium* と考えられてきたが、今年度は ITS1-5.8S-ITS および RPB2 領域のデータを欧州の *E. rhodopolium* とその近縁種に解析データと比較するために、同一分子系統解析ソフトウェアを用いて比較解析した結果、日本のクサウラベニタケは 3 グループに分類され、すべて欧州起源である *E. rhodopolium* とは異なること、その近縁種 *E. sinuatum* や *E. subsinuatum* と異なること、*E. majaloides* と *E. eminens* 等既知の *Entoloma* 属きのこのいずれとも異なることが判明した。日本のクサウラベニタケは新種であることから、以下のように命名した、*E. lacus*, *E. subrhodopolium*, *E. pseudorhodopolium*。このうち、食中毒事例から回収した試料の解析から、日本で食中毒が報告されるのは、*E. subrhodopolium* と *E. pseudorhodopolium* である。今年度、高等植物による食中毒事例が多く発生した。有毒植物の簡易分析法 PCR-RFLP 法は分担研究者紺野らが行っているが、確定検査法の開発も並行して行うために、リアルタイム PCR を用いた手法を検討した結果、有毒植物に特異的な方法が確立可能であることが示唆された。引き続き検討を行い、分析法確立を行うとともに国内で実施してもらうように整備していく。

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）による食中毒被害は毎年発生する。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と考えられる。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。また、一方で、きのこによる中毒被害事例中、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。これらの現状を踏まえて、植物性自然毒の中で、きのこによる食中毒被害低減と原因きのこ特定のための施策として重要なことは次のように考えられる。一つは、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、もう一つは迅速な検査方法の確立と整備である。日本国内で食中毒被害が多く発生する、クサウラベニタケとツキヨタケのうち、クサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium*) 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、欧州における *Entoloma rhodopolium* として公開されているものと同一かどうかを含めて、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、ITS 領域を用いた系統樹解析を行い、その結果を用いて迅速分析法として PCR-RFLP 法をこれまで開発してきた。本年度は、日本国内における、クサウラベニタケ分類をさらに精度よく行い、欧州のそれと比較解析を行うために、昨年度 RPB2 領域 (RNA polymerase II second largest subunit) の配列を解析した。

欧州のグループから報告された論文において、欧州起源 *Entoloma rhodopolium* のほかに多くの *Entoloma* 属きのこの分類がされている。そこで、我々のデータと比較解析するために、論文で用いられている系統解析ソフト MEGA を用いて再度解析を行うことで、日本のクサウラベニタケの分類を再検討する。

高等植物では、今年度食中毒事例が多く、死亡者も報告された。そこで、有毒植物の確定検査のために、リアルタイム PCR 法を検討する。

B. 研究方法

クサウラベニタケとその近縁種の ITS 及び RPB2 領域を用いた MEGA7 ソフトウェアによる分子系統比較解析

(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。

(2) DNA 抽出

試料をよく洗浄し、DNA 抽出精製キット DNeasy plant mini kit または CTAB 法で抽出を行った。

(3) 分子系統樹解析による分類

得られた塩基配列は CLC Genomic workbench ver8.5 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。欧州データと比較するために、分子系統樹解析に MEGA7 ソフトウェアを用いた。

有毒植物のリアルタイム PCR 法の検討

スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ、トリカブトをターゲットとしたリアルタイム PCR 法の検討を行った。

C. 研究結果と考察

クサウラベニタケとその近縁種の ITS 及び RPB2 領域を用いた MEGA7 ソフトウェアによる分子系統比較解析

日本国内で毒きのことされているクサウラベニタケ (*Entoloma rhodopolium* と考えられているが詳細不明のまま) の分類と毒性を明らかにするために、これまでに ITS 領域のシーケンス解析の結果を用いてクサウラベニタケの系統分類を行ってきた。昨年度、系統分類解析の精度をさらに高めて 2015 年に新たに公開されたデータベース上の配列から欧州のものと比較検討するために RPB2 領域をシーケンス解析した。

そこで、本年度は ITS1-5.8S-ITS2 領域および RPB2 領域の解析データを用いて、欧州起源 *Entoloma rhodopolium* とその近縁種のシーケンスと系統樹解析結果を日本のクサウラベニタケのそれと比較するために、欧州グループが論文で用いている系統解析ソフトウェア MEGA7 を

使用して比較解析し、分類を再検討した

(昨年度は、CLC Genomicworkbench を使用)。その MEGA 解析の結果から、まず、クサウラベニタケは欧州起源 *Entoloma rhodopolium* とは異なり、また近縁の *Entoloma nidorosum* や *Entoloma majaloides* と異なる種である。さらに、既存のどの *Entoloma* の種とも異なっており、新種であると考えられたことから、次のように新たに

Entoloma latcus,

Entoloma subrhodopolium,

Entoloma pseudorhodopolium

と命名した。

また、毒性との関係について中毒事例から回収した検体を検査したところ、*Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* であることが確認されたが、一方で、*Entoloma latcus* は中毒事例品には存在しなかった。以上の結果から、国内で中毒の原因となるのは、*Entoloma subrhodopolium*, *Entoloma pseudorhodopolium* の2つのきのこであると判明した。本研究の結果から、長年分類が曖昧であったクサウラベニタケの分類と毒性との関係を明らかにすることができた。

有毒植物のリアルタイム PCR 法の検討

今年度は、各高等植物のバーコーディング領域である *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* をデータベースおよびシーケンス解析により収集した。

データベース (NCBI) から入手できなかったニラ *matK*, オオバギボウシ *rbcL*, オオバギボウシ *matK*, オオバギボウシ

trnH-psbA, ギョウジャニンニク
trnH-psbA, チョウセンアサガオ rbcL, チョウセンアサガオ matK, ニリンソウ rbcL, ヤマトリカブト rbcL, ヤマトリカブト matK, ヤマトリカブト trnH-psbA について、PCR を行い、得られた増幅産物についてシーケンス解析を行った。データベースおよびシーケンス解析によって収集した各有毒植物と誤認しやすい食用植物の rbcL, matK および trnH-psbA の配列のアライメント解析を行った。

D. 結論

クサウラベニタケとその近縁種の ITS 及び RPB2 領域を用いた MEGA7 ソフトウェアによる分子系統比較解析

食中毒が多いクサウラベニタケの再分類を行った結果から、日本のクサウラベニタケ 3 種は新種であり、中毒はそのうち 2 種で起きることを明らかにした。本結果は、食中毒が起きるクサウラベニタケ種の同定が確実に可能になり、中毒防止と原因特定に威力を発揮すると考えられた。

有毒植物のリアルタイム PCR 法の検討

食中毒事例の多い、あるいは死亡事例のある有毒植物をターゲットとした特異的なリアルタイム PCR 法が開発可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 菅野陽平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成 : PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法、日本食品衛生学会誌、印刷中

2) Kazunari Kondo, Kosuke Nakamura, Takumi Ishigaki, Kozue Sakata, Saemi Obitsu, Akio Noguchi, Nozomi Fukuda, Eiji Nagasawa, Reiko Teshima, Tomoko Nishimaki-Mogami.

Molecular phylogenetic analysis of new *Entoloma rhodopolium*-related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP. *Scientific Reports*, accepted.

2. 学会発表

1) 菅野陽平、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、近藤一成 : Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたツキヨタケの迅速判別法の検討、第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会 (北海道)、2016 年 10 月

2) 坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、石垣拓実、加藤怜子、近藤一成 : ITS-RPB2 領域を用いたクサウラベニタケ系統分類と中毒事例検体の分析 : 第 53 回全国衛生化学技術協議会年会 (青森)、2016 年 11 月

3. 知的財産権の出願・登録状況

なし

日本で食中毒が多いキノコの一つ、
「クサウラベニタケ」はクサウラベニタケではない



Entoloma rhodopolium 欧州起源（無毒）
= クサウラベニタケ（日本）



clade-I



E. lacus
(新種)

clade-II

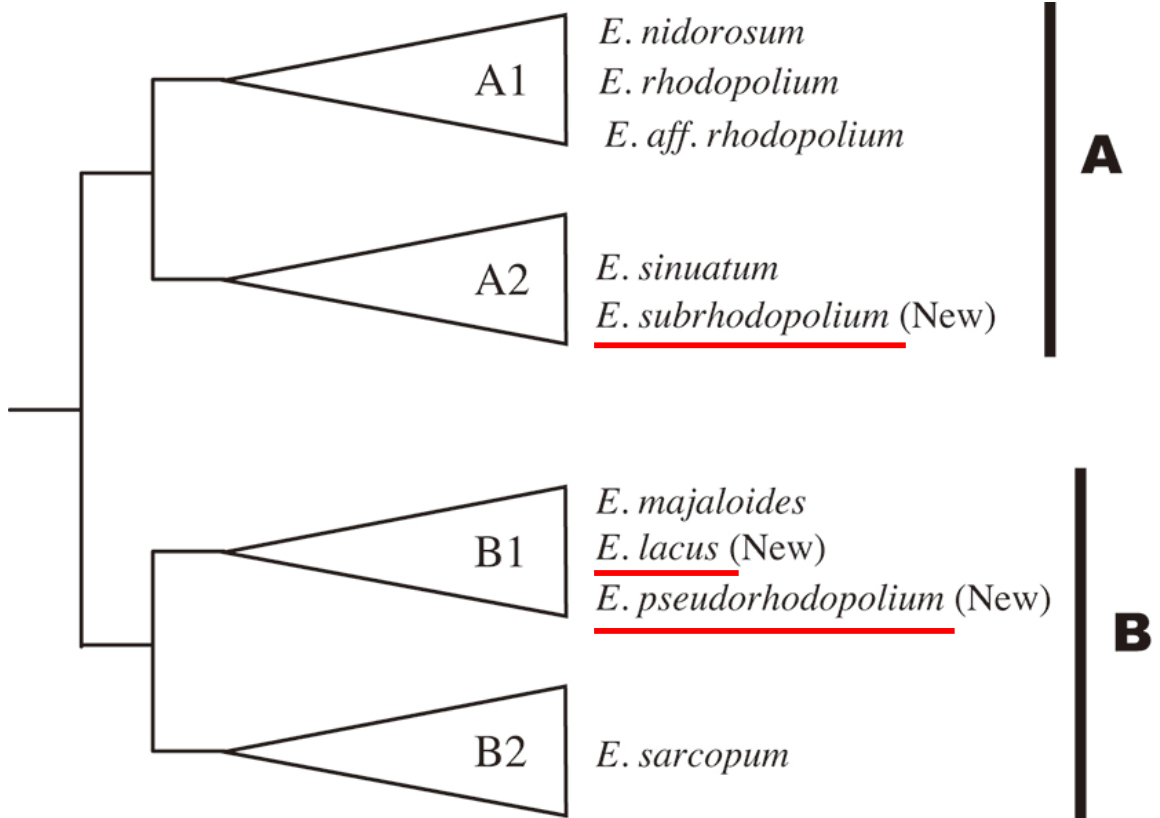


E. subrhodopolium
(新種)

clade-III



E. pseudorhodopolium
(新種)



クサウラベニタケの2遺伝子座により分類解析
した結果、従来考えられてきた*E. rhodopolium*を含めて
既存種とは異なる新しい種であることが示された

食用直物と誤食される主な有毒植物

食 ニラ 毒 スイセン



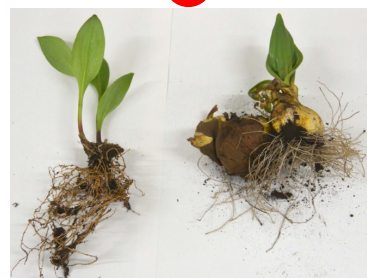
消費者庁HP

食 ギボウシ 毒 バイケイソウ



厚労省HP

食 ギョウジャニンニク 毒 イヌサフラン



消費者庁HP

食 ゴボウ 毒 チョウセンアサガオ



岡山県HP

食 ニリンソウ



毒 トリカブト



厚労省HP

有毒植物の判別検討に用いた高等植物

葉緑体上のDNAバーコーディング領域の配列①

	和名	学名	rbcl		matK		tmH-psbA	
			length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
食	ニラ	<i>Allium tuberosum</i>	1,434	JN969266	854	KC704497	577	GQ434888
毒	ニホンズイセン	<i>Narcissus tazetta</i> var. <i>chinensis</i>	1,334	HM640487	1,563	HM640601	644	GQ923940
毒	スイセン	<i>Narcissus tazetta</i>	703	GQ436660	1,565	HM011047	558	GQ435346
毒	スイセン属	<i>Narcissus elegans</i>	1,341	AF116972	882	KU127381		

食	オオバギボウシ (ウルイ)	<i>Hosta sieboldiana</i>	1,469	this study	1,604	this study	686	this study
食	タマノカンザシ	<i>Hosta plantaginea</i>	1,334	HM640480	1,566	HM640594	656	KC704294
食	タチギボウシ	<i>Hosta rectifolia</i>	1,327	L10253				
毒	バイケイソウ	<i>Veratrum album</i> subsp. <i>oxysepalum</i>	1,225	JN417478	1,536	JF807719	314	JF807759
毒	コバイケイソウ変種	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>stamineum</i>			1,536	JF807731	301	JF807783
毒	ミカワバイケイソウ	<i>Veratrum stamineum</i> var. <i>micranthum</i>			1,536	JF807729	289	KT254787
毒	コバイケイソウ	<i>Veratrum stamineum</i>	1,384	KM242996	1,555	AB040184		
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum album</i>	1,390	D28168	1,537	JF807687	294	KJ395078
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum maaackii</i>	1,390	AB018849	1,556	AB040183	309	JF807786
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum parviflorum</i>	1,365	AJ235813				
毒	シュロソウ属	<i>Veratrum virginicum</i>	1,371	AJ276348	1,509	KM242777		

葉緑体上のDNAバーコーディング領域の配列②

	和名	学名	rbcl		matK		tmH-psbA	
			length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
食	ギョウジャニンニク	<i>Allium victorialis</i> var. <i>Platyphyllum</i>	1,334	HM640483	1,563	HM640597	697	this study
食	ギョウジャニンニク種	<i>Allium victorialis</i>	703	KC704768	854	KC704498	578	HQ690620
毒	イヌサフラン	<i>Colchicum autumnale</i>	649	KC899451	827	FR865065	477	JF934069
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum agrippinum</i>	642	KC899465	423	KC899635		
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum speciosum</i>	1,399	L12673	1,553	AB040181	439	JF934163
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum montanum</i>	1,334	KC796873	1,532	JN417407	439	JF934134
毒	イヌサフラン属	<i>Colchicum bommuelleri</i>	1,356	KC796865	1,532	JN417406	439	JF934161

食	ゴボウ	<i>Arctium lappa</i>	1,244	AB530978	985	AY013520	478	AB727572
毒	チョウセンアサガオ	<i>Datura metel</i>	663	JN244364	815	GQ434220	468	JX467620
毒	ケチョウセンアサガオ	<i>Datura innoxia</i>	932	EF438895	1,264	JX996059	517	KC146630
毒	シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	<i>Datura stramonium</i>	1,408	DSU08611	1,527	KP756825	514	KC146637

食	ニリンソウ	<i>Anemone flaccida</i>	1,477	this study	1,533	AB110530	480	AB117604
食	イチリンソウ属	<i>Anemone nemorosa</i>	1,408	KM360632	869	JN895407		
?	イチリンソウ属	<i>Anemone americana</i>	1,428	EU053901	1,161	AF542590	375	KP643346
?	シュウメイギク	<i>Anemone hupehensis</i>	1,395	FJ626577	1,212	FJ626488		
毒	ヨウシュトリカブト	<i>Aconitum napellus</i>	1,424	EU053898	863	JN895413	222	ZPLPP033-13
毒	オクトリカブト	<i>Aconitum japonicum</i> ssp. <i>Subcuneatum</i>	666	LC036440	1,224	LC036452	211	LC152848
毒	ヤマトリカブト	<i>Aconitum japonicum</i>	1,480	this study	1,816	this study	324	this study
毒	ウゼントリカブト	<i>Aconitum okuyamae</i>	666	LC036442	1,224	LC036456	211	LC152849
毒	カワチブシ	<i>Aconitum grossedentatum</i>	665	LC152818	1,243	LC152826	204	LC152853
毒	センウズモドキ	<i>Aconitum jaluense</i> subsp. <i>iwatekense</i>	666	LC036441	1,224	LC036454	211	LC036489
毒	レイジンソウ	<i>Aconitum loczyanum</i>	665	LC152819	1,243	LC152828	212	LC152855
毒	エゾトリカブト	<i>Aconitum sachalinense</i>	666	LC036445	1,224	LC036459	211	LC036496

有毒植物の判別検討に用いた配列情報

NCBI等の公共データベース及びシーケンス解析から必要な配列を得た

植物毒分析法開発と毒性評価
（植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発）

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

- 1) 有毒植物による食中毒が、例年より多く発生し、中でもイヌサフランで 2 名、スイセンで一名の死亡例が特記される。
- 2) 有毒植物の遺伝子鑑別法の実験条件を、イヌサフランについても構築した。
- 3) 有毒植物の遺伝子鑑別法を実際の中毒原因植物試料(イヌサフラン)に適用し、本鑑別法が有効であることを確認した。

I. 有毒植物による食中毒情報収集

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. 中毒情報の収集

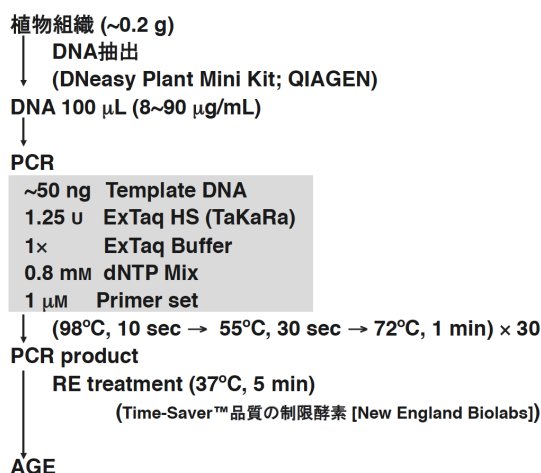
新聞などのメディア報道から現地の担当保健所を探し出し、連絡をとり、聞き取り調査を行う。必要に応じて、現地調査を行い、より詳細な聞き取り調査、発生現場の視察、原因植物の試料入手を検討する。試料が得られた場合は、毒成分分析や遺伝子鑑別によって植物種を同定する。

2. 中毒原因植物の DNA 分析による同定

(1) PCR-RFLP 法を利用した鑑別 (図 1)

入手した植物 (約 5 mm²) および Lysis Buffer (TaKaRa) 200 μL を 1.5 mL チューブに入れ、ペレットミキサーで組織を破碎した。組織破碎液 100 μL を新しいチューブに移し、Proteinase K 1 μL を加え、65°C で 5 分間反応後、98°C で 2 分間加熱し酵素を失活させた上清を PCR 反応の鋳型とした。

図 1. PCR-RFLP 法の実験概要



PCR 反応液は 50 μL として調製した: 鋳型 DNA (上記の上清) 2.5 μL, プライマー対 (10 μM; BG-rF1, BG-rR2) (プライマーの配列は表 1 参照) 各 1.25 μL, 2 × Gflex PCR Buffer 25 μL, Tks Gflex DNA Polymerase (TaKaRa) 1 μL, dH₂O 19 μL. PCR 反応条件は、94°C で 1 分間加熱後、98°C で 10 秒、55°C で 15 秒、68°C で 30 秒を 30 サイクル行った。

PCR 反応終了後、反応液の一部を制限酵素処理した。制限酵素反応の組成は以下の通り: PCR 産物 2 μL, BgII 5 μL, NEBuffer3 5 μL, dH₂O 38 μL. これを 37°C で 5 分間反応後、反応液の一部 (15 μL) を 3%アガロースゲル電気泳動し、UV 照射下バンドを検出した。

C. 研究結果

1. 中毒情報の収集

平成 28 年度に報告された有毒植物による中毒事例を表 1 に示した。

表 1. 平成 28 年度に報告された有毒植物による中毒事例

月日	場所	原因種	摂食者数	患者数	死者数
3月6日	石川県	スイセン	4	4	0
3月9日	兵庫県	スイセン	11	10	0
3月30日	山形県	スイセン	1	1	0
4月6日	福島県	バイケイソウ	1	1	0
4月8日	宮城県	バイケイソウ	2	2	0
4月10日	山形県	スイセン	2	2	0
4月10日	岐阜県	ハシリドコロ	2	2	0
4月21日	北海道	イヌサフラン	1	1	1
4月23日	秋田県	トリカブト	1	1	0
5月1日	長野県	イヌサフラン	1	1	0
5月2日	長野県	バイケイソウ	2	2	0
5月6日	長野県	スイセン	12	11	0
5月14日	宮城県	イヌサフラン	1	1	1
5月29日	北海道	スイセン	1	1	1
11月9日	兵庫県	チョウセンアサガオ	1	1	0

例年に比べ発生事例が多く、イヌサフランで 2 件 2 名、スイセンで 1 件 1 名の死亡例が発生したのは特記される。イヌサフランによる中毒事例は、近年多く、死亡例も多い。平成 25 年(2013 年)以降 4 年間で 9 件発生し、うち 5 件 5 名が死亡している。スイセンによる死亡事例は、初めて発生した。いずれも、身近に豊富にあるので、今後さらなる注意が必要である。

2. 中毒原因植物の DNA 分析による同定

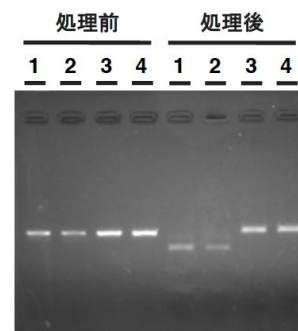
平成 24~25 年度において、DNA 鑑別による迅速・簡便な植物種の同定法を開発した。本法は、高価な機器を必要とせず、操作が簡便であるため高度な実験手技を必要としないこと、また分析時間が短く(90 分以内)、結果(電気泳動像)の解釈が容易であることなどの特徴があり、保健所や医療機関などの現場において、食中毒患

者への初期対応と平行して行えるものと考えている。

(1) PCR-RFLP 法を利用したイヌサフランの鑑別

これまで実験条件を構築したのは、中毒例の多い 4 種(バイケイソウ類、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセン)についてであったが、昨今の事例、特に、死亡例の多いことに鑑み、イヌサフランについても実験条件を構築した。DNA 領域として *rbcL*、制限酵素として *PstI* を用いることにより、イヌサフランは切断されて 2 本のバンドに、対象のギョウジャニンニクは切断されずに一本のバンドしか見えず、明確に区別することができた(図 2)。

図 2. PCR-RFLP 法によるイヌサフランの鑑別



1. イヌサフラン; 2. イヌサフラン;
3. ギョウジャニンニク; 4. ギョウジャニンニク

(2) PCR-RFLP 法を利用した中毒原因植物の鑑別

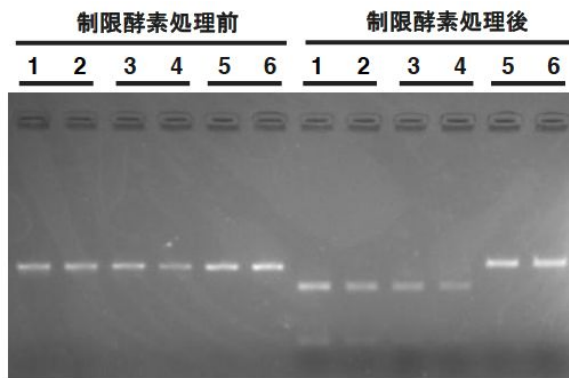
実際中毒を引き起こした原因植物を入手し、本法を適用して、植物種の同定を試みた。

入手した中毒原因植物は形態学的な鑑定の結果、イヌサフランであると推定された。そこで、今回構築した DNA 鑑別法(イヌサフランとギョウジャニンニクを識別する PCR-RFLP 法)を適用した。

入手した植物の DNA を鋳型として PCR を行い、*rbcL* の部分断片を増幅した。PCR 増幅産物を制限酵素 *PstI* で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した(図 3)。その結果、入手した植物由来の PCR 増幅産物は制限酵素により消化され、バイケイソウ由来の PCR 増幅産物と同様の泳動パターンを示すことが確認できた(図 3)。

図 3. PCR-RFLP 法を利用した中毒原因植物(イヌサフラン)

ン)の鑑別



1. 食中毒サンプル 1; 2. 食中毒サンプル 2;
3. イヌサフラン; 4. イヌサフラン;
5. ギョウジャニンニク; 6. ギョウジャニンニク

III. 考察

中毒情報の収集は、食中毒の実態を把握し、注意喚起や啓蒙など、中毒防止対策を立てるためにも重要である。今後とも日常的に情報収集に努め、その結果を中毒対策につなげたい。特に、最近事例が多く、しかも死亡例も多いイヌサフランは、さらに注意して、啓蒙などに努める。

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、専門家による形態学的鑑定や原因成分の化学分析が行われているが、しばしば結論に至るまで時間がかかり、問題となっている。

そこで我々は、遺伝子鑑別を活用した、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てきた。その結果、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。この鑑別法の特徴は、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。これまでに、中毒例の多い4種(バイケイソウ類、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセン)について実験条件を構築したが、今回さらに、最近特に中毒例、死亡例のおおいイヌサフランについても、実験条件を確立した。本法を実際食中毒を起こした調理済みのサンプルで検討し、調理済みサンプルにも適用可能なことを確認した。したがって、本鑑別法は、保健所や医療機関などの現場において、食中毒患者への初期対応と平行して行え、原因種の推定・特定に有用なものと考えられる。

IV. 結論

有毒植物による食中毒情報を収集し、イヌサフラン、スイセンによる死亡例を確認した。

PCR-RFLP法を利用したイヌサフランの遺伝子鑑別法を構築し、実際食中毒を起こした調理済みのサンプルにも適用可能なことを確認した。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 of 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。

V. 健康危険情報

特になし

VI. 研究発表

特になし

VII. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

LAMP 法開発 (LAMP 法を用いた有毒きのこ検出法の開発)

研究分担者 菅野陽平 北海道立衛生研究所

研究要旨

日本国内で発生するきのこの食中毒は、大部分がツキヨタケ、クサウラベニタケによるものである。中毒事例数が常に多いツキヨタケおよび近縁種が多く形態学的な判別が困難なクサウラベニタケについて、喫食前に食毒が判別できれば食中毒の発生件数を大きく低減することが可能となる。LAMP 法は目視でも判定可能な遺伝子増幅法であり、野外でも実施可能であることから、喫食前検査法として LAMP 法を利用したツキヨタケおよびクサウラベニタケの迅速かつ簡便な検査法の構築について検討した。ツキヨタケの検出を目的とした LAMP 法については、ツキヨタケと誤認されやすいシイタケやヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのここと交差せず、ツキヨタケのみを高精度に検出する LAMP 法を開発した。さらに、本法は加熱や消化の影響を受けにくいことから、きのこ食中毒発生時の原因特定にも役立てられると考えられる。また、クサウラベニタケにおいては、LAMP 法の開発に向けて選択的に検出する新たな知見が得られた。

本法は、きのこ採取現場でも実施可能な喫食前検査として中毒発生予防につながると期待される。そして、中毒発生時における検査でも原因きのこの特定に役立てられ、自然毒による食中毒のリスク管理に大きく貢献できるものと考えられる。

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）による食中毒被害は毎年発生する。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、多数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、喫食し中毒に至る場合が多いと考えられる。国内できのこによる中毒事例について過去 10 年以上のデータを解析すると、ツキヨタケとクサウラベニタケの 2 つのきのこが多くを占める。

また一方で、きのこによる食中毒被害で、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、喫食後吐瀉物の場合には同定不可能になる。これらの現状を踏まえて、植物性自然毒の中で、きのこによる食中毒被害低減と原因きのこ特定のための施策として重要なことは次のように考えられる。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、もう一つは迅速な検査方法の確立と整備である。

日本国内で食中毒被害が多く発生するツキヨタケについて、野外においても実施可能な迅速検査法として、LAMP法を用いたツキヨタケ検出法について検討した。LAMP法は、PCR法の代わりに4種類のプライマーを用いて、等温で反応が進む遺伝子増幅法で、遺伝子増幅が進行すると紫外光下で強い緑色の蛍光を示し、自然光下においても明確な緑色を示す。これまでツキヨタケのITS領域を標的として増幅を示す反応系を構築しており、ツキヨタケ以外の食用キノコに対して交差性を確認した。また、実際に食中毒を引き起こしたツキヨタケの残存試料(食中毒検体)を対象として検討も行った。さらに、我が国においてツキヨタケと共に食中毒の報告の多いクサウラベニタケの検出を目的としたLAMP法の構築についても検討を行った。

B. 研究方法

(1) 試料

ツキヨタケは、山形県、島根県で採取した。また、ツキヨタケの食中毒検体試料は、秋田県、山形県より分与されたものを試料として用いた。

シイタケ、ヒラタケ、ムキタケなどの食用キノコは国内産(北海道、秋田県、新潟県、茨城県、佐賀県)で市販されていたものを試料として用いた。

クサウラベニタケは、東京都、北海道、山形、島根、鳥取、富山、新潟で採取した。

ウラベニホテイシメジは、福島、茨城、鳥取で採取したものを試料として用いた。

(2) DNA抽出

試料をよく洗浄し、DNA抽出精製キットDNeasy plant mini kit (QIAGEN)もしくは簡易DNA抽出キットPrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific)でDNA抽出を行った。

また、試料を30分加熱および人工消化液60分間浸漬処理した擬似加熱消化試料から簡易DNA抽出キットを用いてDNA抽出を行った。

(3) LAMP法

Loopamp DNA増幅試薬キット(栄研化学)を用い、必要に応じて、Loopamp 蛍光・目視検出試薬(栄研化学)を反応液に添加してLAMP法を実施した。

ツキヨタケのLAMP法は、以下のプライマーを使用した。

LAMP_Tukiyo-F3(ID74) :

5' - TGCTTCTGAAGCTTGGACTG -3'

LAMP_Tukiyo-B3(ID74) :

5' - ACACCTCCACAGCTCTTTGA -3'

LAMP_Tukiyo-FIP(ID74) :

5' - CCGACTAATCCGGTTTCCGC

TGGCTTGCTGGCATCACTAG -3'

LAMP_Tukiyo-BIP(ID74) :

5' - ACGCCTTGGTGGTTTGACAAGG

AGACAGAGCAACCTGAGTTG -3'

の4本、および

LAMP_Tukiyo-F3(ID21) :

5'- GAAGCTTGGACTGTGGAG -3'

LAMP_Tukiyo-B3(ID21) :

5'- GTGaaAACAGACGATTAGAGAG -3'

LAMP_Tukiyo-FIP(ID21) :

5'- ACACCAAGGCTTagGTCCGA

ACtaGATGTTCTCAGCTCCT -3'

LAMP_Tukiyo-BIP(ID21) :

5'- ATCTACGCCTTgtGGTTTGAT

TTGAAATGAAAGCAGACAGA -3'

の4本の、2つの組合せで行った。

またクサウラベニタケのLAMP法は、以下のプライマーを使用した。

Kusa3-2_F3 :

5'- TGGAGGAAAATGCCATTCC -3'

Kusa3-2_B3 :

5'- TAGAGGTCGACAGACGCG -3'

Kusa3-2_FIP :

5'- AGATTTGCGGGATCACGGTG

AACCTTGCACCAAGGTGTTTCG -3'

Kusa3-2_BIP :

5'- AAGGACGACATCAGCCCAG

AGGGGCATCCGTATACAGGCG -3'

の4本、

Kusa1-2_F3 :

5'- CCCATTCCCAAACACCTTGT -3'

Kusa1-2_B3 :

5'- GGACCAGCTGCTGATTTTCC -3'

Kusa1-2_FIP :

5'- CGTCCTTGCGCCGTAGCTTTTT

GTGTCTGGATGGGTGTTTCAT -3'

Kusa1-2_BIP :

5'- CCAGAGGTCTCTGTTGTCCGTG

TAGAGGTCGACAGACGCG -3'

の4本、および

Kusa1-3_F3 :

5'- TGggGGTTAGAGTCGTTGG -3'

Kusa1-3_B3 :

5'- TAGAGGTCGACAGACGCG -3'

Kusa1-3_FIP :

5'- CGGGATCACGATGAACACCCAT

AGGAAAATGCCATTCCCAA -3'

Kusa1-3_BIP :

5'- TACGGCGCAAGGACGACATC

GTAGCTCCTTCTCCCGGATA -3'

の4本の、3つの組合せで行った。

増幅反応は、63 で1時間保持後に、酵素を失活させるため80 で5分間処理した。増幅の確認は、目視もしくはリアルタイム濁度測定装置 LA-320C (栄研化学)を用いて行った。

C. 研究結果と考察

ツキヨタケ迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

野外で実施可能な有毒きのこの検査法を構築するため、一定温度の反応で標的遺伝子を増幅・確認可能なLAMP法によるツキヨタケ検出法を検討してきた。新たに設計したプライマーセットを含む2組のプライマーを用いて、ツキヨタケおよび13種の食用きのこを対象にLAMP法を行った。その結果、図1に示すとおり、ツキヨタケ由来DNAおよびツキヨタケのITS領域を組み込んだツキヨタケプラスミドでのみ標的遺伝子が増幅された。作製したプライ

マーセットのうち、ID21の方が反応時間の早い段階で増幅し始め、かつ同一反応時間における増幅量(濁度量)も多かったことから、以後の検討にはID21のプライマーを用いた。また、いずれのプライマーセットにおいても一般的な食用きのこには反応せずツキヨタケのみで増幅を示し、その選択性の高さが確認された。この結果より、ID21のプライマーを用いたLAMP法を利用することで、野外でも実施可能なツキヨタケの簡易検査法の構築につながると考えられる。

続いて、実際にツキヨタケによる食中毒が発生したときの食中毒検体試料を対象にLAMP法を行った。同時にツキヨタケやツキヨタケが誤認されやすい食用きのこ(シイタケ、ヒラタケ、ムキタケ)も対象とした。また、DNA抽出は、30分程度で抽出可能な簡易DNA抽出キットを用いた。その結果、図2に示したとおり、ツキヨタケおよび食中毒検体でのみ増幅が確認された。しかし、食中毒検体では、増幅開始が他のツキヨタケに比べ遙かに遅かった。食中毒検体に関して、これまで構築してきたツキヨタケ迅速検査法PCR-RFLP法で確認した結果、ムキタケと思われるバンドパターンが示された(図3)。また、ツキヨタケを検知するリアルタイムPCR法では、微量のツキヨタケ由来DNAの存在を確認した(図4)。さらにITS領域のシーケンスを実施した結果、ムキタケ(*Sarcomyxa edulis* Genbank Accession no. LC098752)などと97%の高い相同性を示した。これらの結果より、食中毒検体は、ムキタケであり、食中毒を引き起こしたツキヨタケと一緒に調理された為に、

わずかなツキヨタケのDNAが付着していたと推定された。

さらに、ツキヨタケや食中毒検体試料、誤認されやすい食用きのこを加熱、人工胃液に浸漬処理した擬似加熱消化試料を対象にLAMP法を実施した。その結果、図5に示すとおり、加熱・消化処理の影響で増幅開始は少し遅延したが、図2と同様にツキヨタケに関する試料で増幅を示した。ただし、ムキタケと考えられる食中毒検体については、増幅が確認できなかった。これらのことから、ツキヨタケ検出用のLAMP法は、生のきのこの喫食前診断と共に、食中毒発生時の確認試験法としても高い信頼性を有することが確認された。

クサウラベニタケ迅速検査法 LAMP 法の検討

これまでのクサウラベニタケの分子系統解析により、日本のクサウラベニタケとされてきたきのこは、欧州の *Entoloma rhodopolium* とは異なる3つのグループ(clade-I, clade-II, clade-III)に分類されることが明らかとなった。

そこで、我が国においてツキヨタケと並び食中毒報告事例の多いクサウラベニタケを、野外でも実施可能なLAMP法で判別するためには、標的を絞る必要がある。これまでクサウラベニタケとされた食中毒事例ではclade-IIおよびclade-IIIが多数を占めていたことから、clade-IIとclade-IIIを検出するLAMP法の構築を試みた。その結果、3種類のLAMP法用プライマーによってクサウラベニタケの遺伝子の増幅が確認できた(図6)。Kusa3-2の

プライマーセットは、clade-III を検出し増幅を示した。Kusa1-2 のプライマーセットは、clade-II と clade-III のみならず、clade-I でも増幅を示したが、誤認されやすい可食きのこのウラボニホテイシメジでも増幅を示した。また Kusa1-3 では、clade-III の他にわずかに clade-II も増幅が見られた。Kusa1-2 は、プライマーの認識配列の調整が必要である。一方、Kusa1-3 はループプライマーなどの利用で clade-II の増幅を補助するなどの改善が必要であるが、クサウラベニタケの LAMP 法の構築へ向けて大きな知見が得られた。

D. 結論

ツキヨタケ迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

ツキヨタケ検出用に開発した LAMP 法は、シイタケ、ヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのこを交差せずにツキヨタケだけを検出することが確認された。また、過去に食中毒を引き起こしたツキヨタケの検体についても同様に検出することが可能であった。そして、簡易 DNA 抽出法(操作時間 30 分)と LAMP 法(反応時間 60 分)を組み合わせることによって、2 時間以内での迅速な判定が達成できた。LAMP 法は、きのこを採取する現場で検査できる方法であり、喫食前診断に大きく寄与できると考えられ、ツキヨタケによる食中毒を未然に防ぐことに大いに役立てられると期待される。また、本法は擬似加熱消化処理の影響を受けにくいことから、食中毒発生時に調理品や吐瀉物など原形を留めてい

ない試料でもツキヨタケの特定に寄与できると考えられる。

クサウラベニタケ迅速検査法 LAMP 法の検討

ツキヨタケと共に日本国内で食中毒事例が多いクサウラベニタケの検出を目的とした LAMP 法は、プライマー配列の調整やループプライマーの利用で構築できる可能性が見出された。クサウラベニタケを検出する LAMP 法が構築できれば、ツキヨタケと共に喫食前診断に利用することで日本国内における有毒きのこの食中毒発生予防につながり、ひいては食中毒の大幅な低減が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

菅野陽平、坂田こずえ、中村公亮、野口秋雄、福田のぞみ、鈴木智宏、近藤一成：. PCR-RFLP によるツキヨタケの迅速判別法、日本食品衛生学会誌、投稿中

2. 学会発表

菅野陽平、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、近藤一成： Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いたツキヨタケの迅速判別法の検討、第 112 回 日本食品衛生学会学術講演会、北海道、2016 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

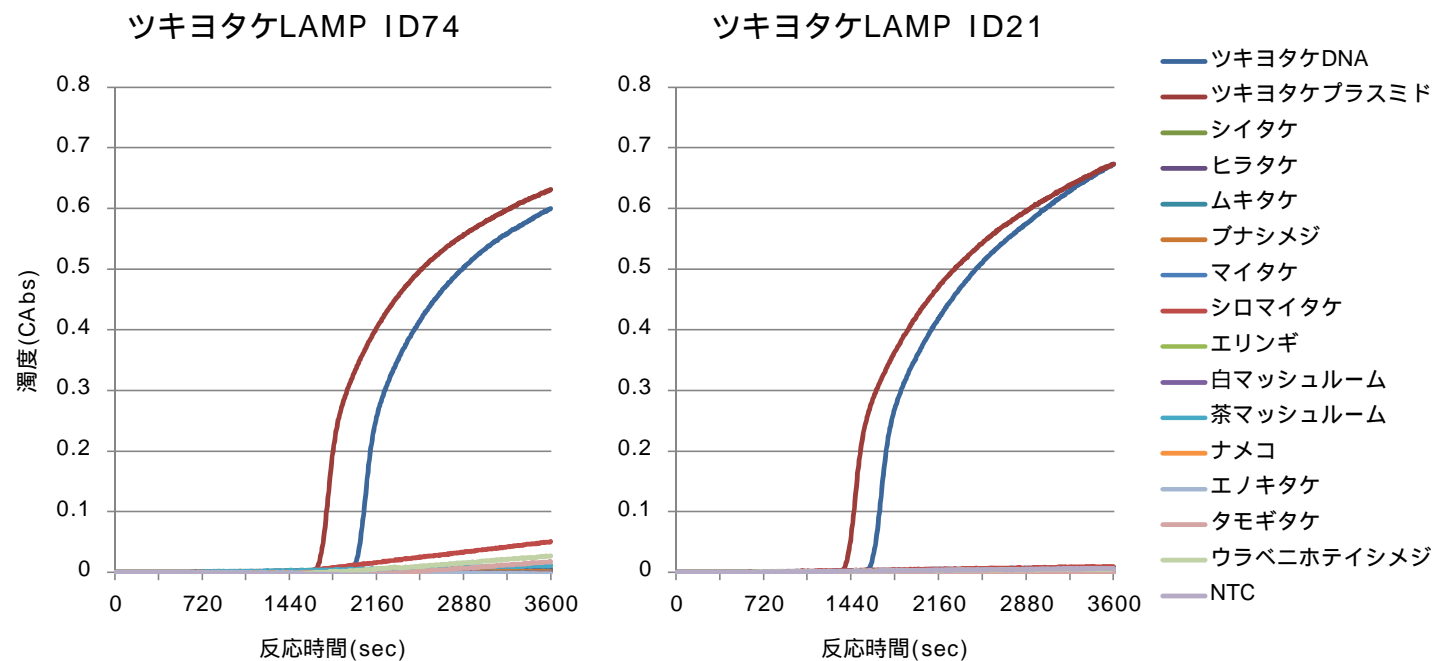


図1 ツキヨタケ検出用LAMP法の検討

ツキヨタケ検出用に設計したプライマーセットを用いて、ツキヨタケおよび食用きのこから抽出したDNAを対象に増幅を確認した。

その結果、ID74 とID21の両プライマーセットにおいてツキヨタケDNAおよびツキヨタケのITS領域を組み込んだプラスミドDNAでのみ明確な増幅を示した。

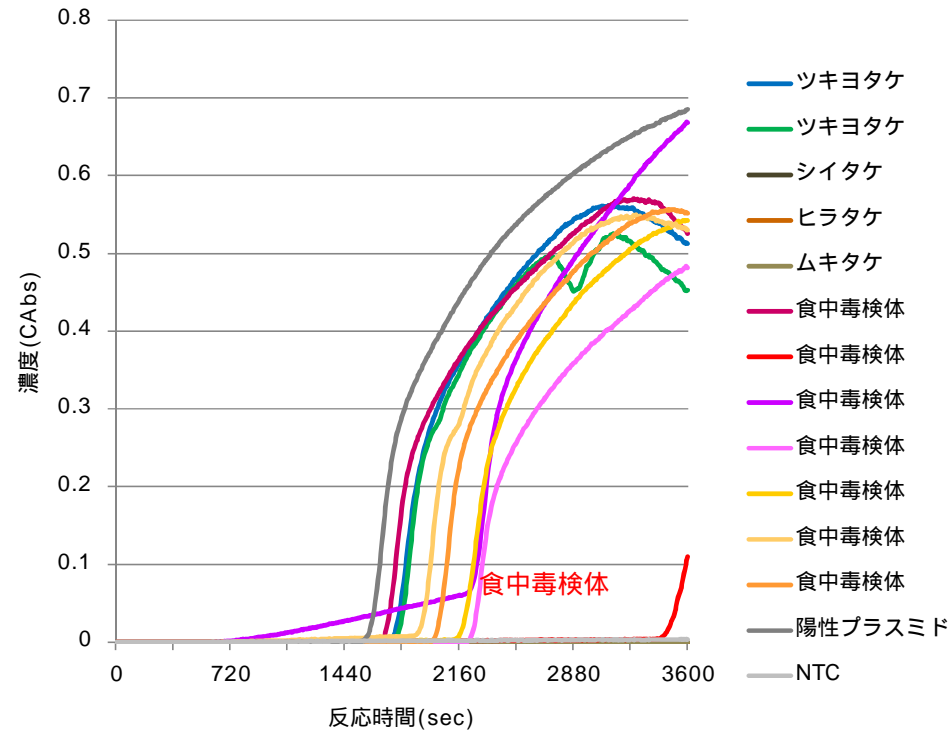


図2 LAMP法によるツキヨタケ食中毒検体の確認

ツキヨタケ検出用プライマーセット(ID21)を用いて、ツキヨタケおよびツキヨタケにより食中毒が引き起こされた食中毒検体等に対してLAMP法を実施した。各キノコからのDNA抽出は、簡易DNA抽出キットを用いた。

ツキヨタケおよびほとんどの食中毒検体で増幅が認められたが、食中毒検体は増殖開始が他のツキヨタケよりもかなり遅かった。

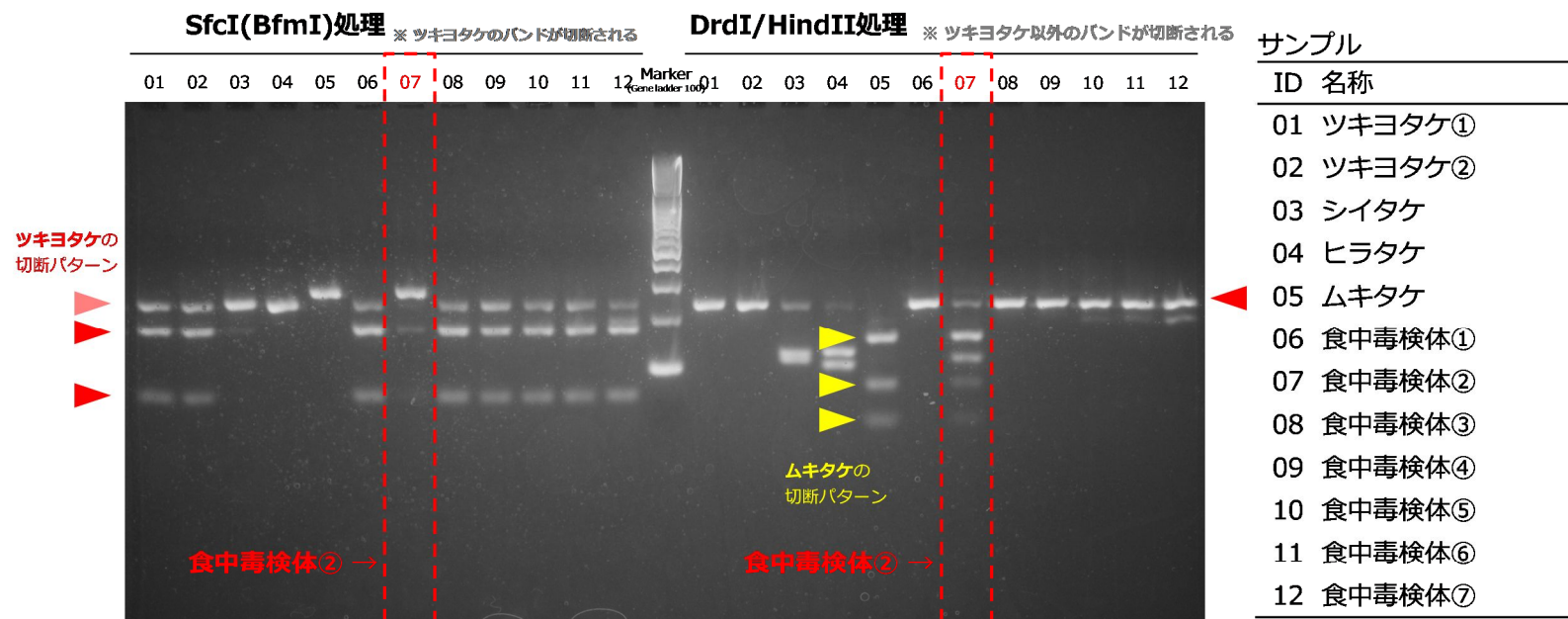


図3 ツキヨタケ確認用PCR-RFLPによるツキヨタケおよび食中毒検体の確認

我々がこれまでにツキヨタケ確認用に構築したShort PCR-RFLP法をツキヨタケおよびツキヨタケによる食中毒検体等に対して実施した。各レーン番号とサンプルの対応は右の表に示した。SfcI処理では、ツキヨタケのバンドが切断され、DrdIとHindIIの同時処理では、ツキヨタケ以外(シイタケ、ヒラタケ、ムキタケ)が切断される。ツキヨタケの切断パターンは赤い矢印で示した。また、DrdI/HindII処理でのムキタケの切断パターンは黄色い矢印で示した。食中毒検体②に関しては、赤の点線で示した。

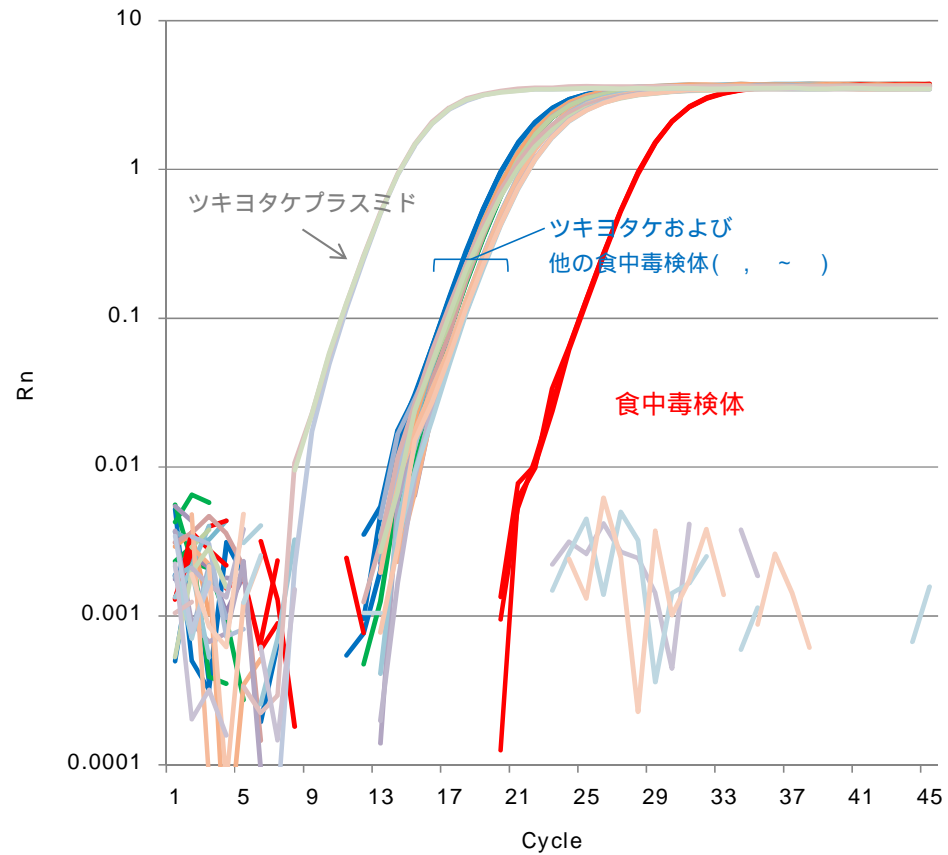


図4 リアルタイムPCRによるツキヨタケおよび食中毒検体の確認

我々がこれまでに構築したツキヨタケ確認用リアルタイムPCR法でツキヨタケおよびツキヨタケによる食中毒検体等を確認した。その結果、ツキヨタケおよび他のツキヨタケ食中毒検体(, ~)でほぼ一様の増幅を示したが、食中毒検体ではその $1/2^{7\sim 9}$ 程度の割合の僅かなツキヨタケ由来DNAが含まれていたことが明らかとなった。

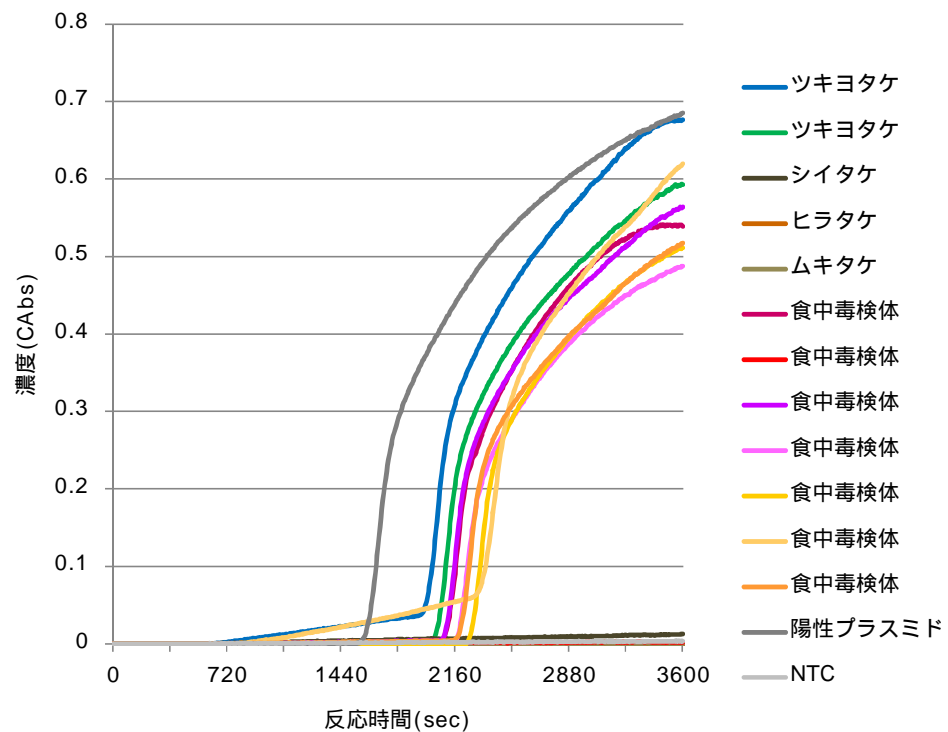
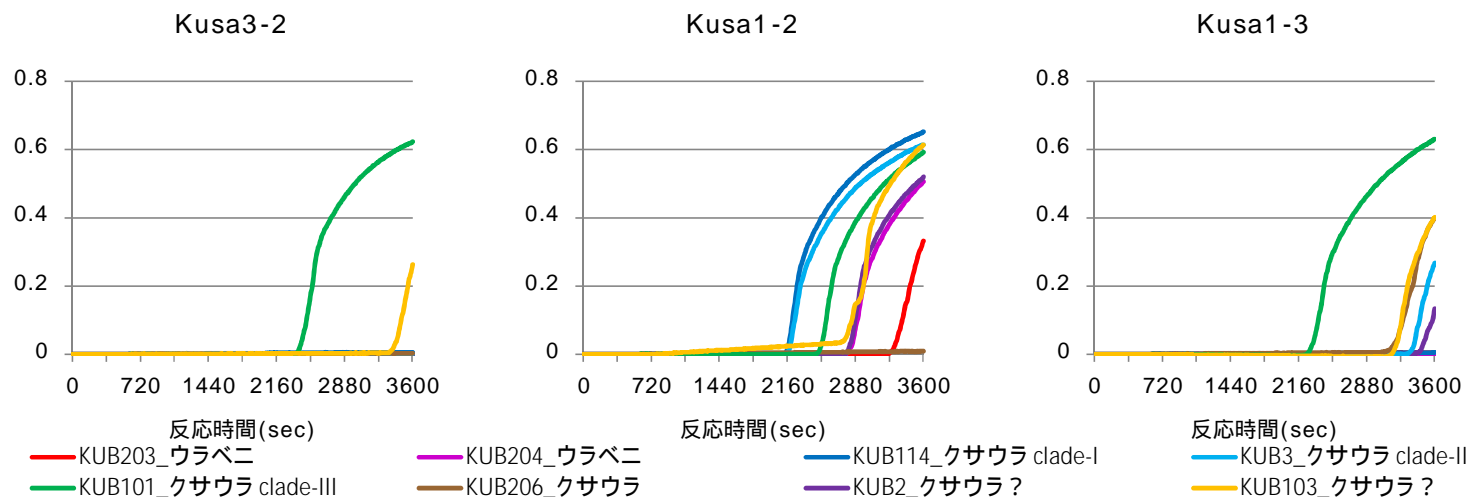


図5 擬似加熱消化処理によるツキヨタケLAMP法への影響

ツキヨタケが疑われる食中毒発生時の調理品や吐瀉物の確認試験を想定し、擬似加熱消化処理した試料を対象としてLAMP法を実施した。

その結果、ツキヨタケおよび食中毒検体を除く食中毒検体で図2と同様の増幅を示した。ただ、いずれの試料も加熱もしくは消化処理により、増幅開始時間が遅延していた。



試料(各 5 ng/ tube)	備考	増幅の有無		
		Kusa3-2	Kusa1-2	Kusa1-3
KUB203_ウラベニ	可食キノコ	-	++	-
KUB204_ウラベニ	可食キノコ	-	+++	-
KUB114_クサウラ clade-I	毒性少?	-	+++	-
KUB3_クサウラ clade-II	中毒例多数	-	+++	+
KUB101_クサウラ clade-III	中毒例多数	+++	+++	+++
KUB206_クサウラ	独立群	-	-	++
KUB2_クサウラ?	独立群 E. sinuatumに近い	-	+++	+
KUB103_クサウラ?	E. sericatum K541と一致	++	+++	++

増幅の有無は、反応後(63 60分)の濁度から以下の暫定基準で判定した。

- +++ : 0.4以上
- ++ : 0.2以上、0.4未満
- +
- : 0.1以上、0.2未満
- : 0.1未満

図6 クサウラベニタケ検出用LAMP法の検討

クサウラベニタケの検出を目的に設計した3種類のプライマーセットを使用して、各種クサウラベニタケおよび誤認されやすいウラベニホテイシメジから抽出したDNAを対象にLAMP法を実施した。その増幅および増幅結果の一覧を示した。

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
なし							

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
石崎直人, 小西良子, 豊福肇	蛍光ラテックスビーズを用いた食肉中汚染微生物の分析サンプルへの存在確率の推定.	日本防菌防黴学会誌	Vol. 45, No. 1	pp. 3-8	2017
菅野陽平, 坂田こずえ, 中村公亮, 野口秋雄, 福田のぞみ, 鈴木智宏, 近藤一成	PCR-RFLPによるツキヨタケの迅速判別法	日本食品衛生学会誌			印刷中
Kazunari Kondo, Kosuke Nakamura, Takumi Ishigaki, Kozue Sakata, Soaemi Obitsu, Akio Noguchi, Nozomi Fukuda, Eiji Nagasawa, Reiko Teshima, Tomoko Nishimaki-Mogami.	Molecular phylogenetic analysis of new <i>Entoloma rhodopoliolum</i> -related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP	<i>Scientific Reports</i>			accepted
Nguyen DT, Ngo TC, Le TH, Nguyen HT, Morita M, Arakawa E, Ohnishi M, Nguyen BM, Izumiya H.	Molecular epidemiology of <i>Vibrio cholerae</i> O1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis.	<i>J Med Microbiol.</i>	65(9)	1007-12.	2016 Sep