

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

# 我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と 管理措置に関する研究

平成29年度 総括・分担研究報告書  
(H27-食品一般-007)

研究代表者 近藤一成

平成30（2018）年 4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

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、コレラ菌等の細菌学的分析

泉谷 秀昌  
国立感染症研究所 細菌第一部 . . . . . 9

#### 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  
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第三室長 . . . . . 17

#### 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  
山口大学共同獣医学部 . . . . . 29

#### 4. 高等植物による食中毒低減のための検査法開発

近藤 一成  
国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 . . . . . 71

#### 5. 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  
富山大学和漢医薬学総合研究所 . . . . . 85

#### 6. LAMP 法を用いた有毒きのこ検出法の開発

菅野 陽平  
北海道立衛生研究所 . . . . . 91

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 101

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

平成 29 年度

総 括 研 究 報 告 書

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

研究要旨

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

微生物関連では、Hazard の特性、米国及び EU での輸入時の違反データ、国の NFCS の performance、喫食、曝露データ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 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 1,800 株のデータを収集した。10 か所の遺伝子座を用いた *S. sonnei* の MLVA 法から 3 つの大まかなグループに大別することができ、これはゲノム解析から報告されている系統と関連することが示された。リステリアについて、研究室保有食品株データの蓄積と、国内発生散发事例由来株の解析を行った。また、また、研究協力者によるデータの統合を行い、データベースの充実を図った。

自然毒関連では、有毒植物による食中毒が、スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン（死者 1 名）、キョウチクトウで発生した。有毒植物の簡易遺伝子鑑別法 PCR-RFLP 法を実際の中毒原因植物試料に適用し、本鑑別法が有効であることを確認した。PCR-RFLP 法で確定できない場合を想定して、有毒植物 5 種の確定検査用に感度と特異性を有したリアルタイム PCR 法の確立を行った。きのこに関して、LAMP 法を利用したツキヨタケおよびクサウラベニタケの迅速かつ簡便な検査法の構築について検討した。ツキヨタケの検出を目的とした LAMP 法については、ツキヨタケおよびクサウラベニタケ近縁種のみを高精度に検出する LAMP 法を開発した。

## A. 研究目的

### 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

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

### 赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

食品および食材、ならびに人の流れがグローバル化してきている中で、食品の生物学的ハザードについても多様化、複雑化が見られる。食品における生物学的ハザードについては主に食中毒という形で我々の前に出現するが、その発生原因及び態様はさまざまである。細菌などの微生物によるハザードは、食品流通・加工ならびに原因物質などの多様性・複雑性から多岐にわたり、その要因の特定を困難なものにしている。

本研究では、国内外の生物学的ハザードに関して情報収集および原因物質の解析を行い、ハザードの特定に有用な情報もしくは解析法の検討を行う。さらに、ハザード発生時に必要な管理措置につながる対応への一助とすることを目的とする。国内外の細菌性赤痢の発生状況に関する情報収集、ならびに国内外の分離菌株に関する分子疫学的解析手法の検討及びデータベースの構築を行うことを主とする。

### リステリアのリスクに関する研究

*Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は、動物の腸管内、土壌、河川水や食品工場、冷蔵庫内など自然界や人の生活圏の様々な環境に広く存在している。本菌を原因菌とするリステリア症は、食品媒介感染症の中で最も致死率が高いことが知られている。集団事例については、欧米ではほぼ毎年発生している。一方、日本国内では集団事例はほとんど報告されておらず、2001年の国内産ナチュラルチーズを原因食品とする1例が確認されているのみである。Codexによる食品中のリステリアの国際規格設定を受けて、日本国内でも平成26年に非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ（ソフト及びセミハードに限る）中のリステリア菌数を100 colony forming unit (CFU)/g以下とする微生物規格が設定された。同時に、平成5年から用いられていた食品中のリステリア試験法が改正され、国際標準化機構 (International Organization for Standardization; ISO) の試験法に準拠した方法となり、1ロットにつき5検体を検査して全数の合格が要求されるサンプリングプランも設定された。本研究では、海外から汚染食品を媒介して国内に侵入する感染症の一つとしてリステリア症に着目し、その発生状況を正確に把握するための情報を収集するとともに、様々な由来のリステリア菌株の分子型別データを収集、蓄積することにより、国内発生事例の原因食品同定に役立てることを目的とする。

### 植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

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

#### 有毒な高等植物のリアルタイム PCR を用いた確定検査法開発

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

#### LAMP 法による迅速検査法の検討

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

出を目的とした LAMP 法の構築についても検討を行った。

## **B. 研究方法**

各分担報告書を参照

## **C. 研究結果および考察**

#### 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

次の 3 要素を掛け合わせたモデルで、ハザード、輸出国の National Food Control System (以下 NFCS という) 及び食品ごとにスコアをつけ、それらを乗じてリスクランキングを試みた。



過去 2 年間作成した Hazard の特性、国の National Food Control System の performance、喫食、曝露データ等の食品に specific なデータを網羅した半定量モデルを再検討し、入力項目を修正、再構築するため、野菜、果実について、汚染及び食品由来疾患とハザードに関する論文サーチを行い、国ごとのデータの重み付けや第三者認証である Global GAP、Canada GAP 及び ISO 22000 の認証数データ等を追加した。データや情報から管理が不十分と評価された国から輸入される食品の検査を強化することにより、限られたリソースを有効に活用し、より効果的効率的な輸入時の微生物モニタリングが実施できると考えられた。

#### 赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析



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

#### リステリアのリスクに関する研究

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

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

#### 植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

##### ・有毒植物による食中毒情報収集

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

##### ・有毒植物の遺伝子鑑別法

PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑別法により、迅速・簡便な有毒植物鑑定法を確立した。特徴は、1) 必要な機器が比較的安価であること、2) 操作が簡便であるため高度な実験手技を必要としないこと、3) 分析時間が短い (90 分以内) こと、4) 結果 (電気泳動像) の解釈が容易であることが挙げ

られる。本法を実際食中毒を起こした調理済みのサンプルで検討し、調理済みサンプルにも適用可能なことを確認した。したがって、本鑑別法は、保健所や医療機関などの現場において、食中毒患者への初期対応と平行して行え、原因種の推定・特定に有用なものと考えられる。

#### 有毒な高等植物のリアルタイム PCR を用いた確定検査法開発

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

#### ツキヨタケ迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

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

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

## **D. 結論**

### 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

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

### 赤痢菌、サルモネラ等の細菌学的分析

近年の食および人のグローバル化により、海外から様々な食品および人が国内に入りやすくなっている。と同時に、食中毒菌により汚染された食品が入ってくる機会も増加していると考えられる。今後も海外の発生状況の情報収集が必要である。また、国内の監視体制の整備のため、分離菌株の解析手法の検討ならびにデータベースの拡充を図る必要がある。

### リステリアのリスクに関する研究

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

#### 植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

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

#### 有毒な高等植物のリアルタイム PCR を用いた確定検査法開発

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

#### 迅速検査法 LAMP 法の実用化に向けた検討

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

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

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

#### **E. 健康危険情報**

なし

#### **F. 研究発表**

各分担報告書に記載した。

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」  
平成 29 年度分担研究報告書

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

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、赤痢菌の分子疫学解析を重点的に進めた。mutiocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を用いて、輸入例および国内例関連株のデータ収集および蓄積を行った。これまでに延べ約 1,800 株のデータを収集した。*S. sonnei* 輸入例関連株の解析から示唆されていた 3 グループがそれぞれ系統 II、IIIb、IIIc に、さらに系統 I も併せて MLVA データと相関することが明らかとなった。*S. flexneri* に関する MLVA 法の改良を行い、異なる菌株をより明確に区別することが可能となった。検疫所からの輸入食品サルモネラ株の解析について検討を開始した。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。

MLVA データと系統との関連性については、統計解析ソフトウェア R を使用した。

## C. 研究結果および考察

感染症発生動向調査では、2016 年の細菌性赤痢の発生数は 121 であった (図 1)。2012-2016 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 *Shigella dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii*、*S. sonnei* の 4 菌種があるが、2012-2016 年の検出頻度は *S. flexneri* が 27%、*S. sonnei* が 70% と大勢を占めていた。

米国において、2015 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 2,645 名であり、死亡率は 0.04% であった (表 1)。

2017 年に当部に送付され、解析された *S. sonnei* は 70 株であった。うち、輸入例は 41 株で、主な渡航先は東南アジア 21 株、南アジア 9 株、中央アジア、アフリカが各 3 株であった。これらについて、MLVA による解析を行った。上記輸入例はそれぞれ、これまでに収集したデータベース上にて各地域に相応するグループに振り分けられた。ミャンマー及びカンボジア由来株は南アジア由来株が多くを占めるクラスターの近くに分布した。同じツアー事例由来株、陰性確認で陽性となった株はクラスターを形成した。このほか、国内例株においてもいくつかクラスターが観察された (図 3)。

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。系統を指標に、MLVA データを主成分判別分析にかけたところ、系統 I、II、IIIb、IIIc がそれぞれの

クラスターを明確に形成させることができた（図 4）。使用している MLVA 遺伝子座の中で上記クラスターに寄与する 6 か所の遺伝子座に関するマトリクスを用いることで、系統 4 種を有意に判別可能であることが明らかとなった。2017 年株について、上記マトリクスを使用した系統推定を行い、MLVA-minimum spanning tree にあてはめると、MST 上で各系統に合わせて分布することが明らかとなった（図 5）。

*S. flexneri* については MLVA および PFGE を併用している。MLVA の分解能を向上させるため、公共データベースにあるゲノム情報を解析し MLVA に使用する遺伝子座を 17 追加した。追加した結果、特に血清型 3a において顕著な改善が見られた。すなわち、1 遺伝子座違いの株同士が 3 遺伝子座以上異なるなどの変化がみられた（図 6）。

輸入食品由来のサルモネラ株の解析を検討した。供試菌株は 1 株。血清型は Stanley であった。MLST による ST は 29 であった。同じ血清型のストック株を PFGE により比較したがパターンが一致したものはなかった。

*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。特に MLVA データと系統とは相関があり、MLVA データから系統を推測することが可能であることが示唆された。

赤痢菌のような海外からの侵入が懸念される菌種、本年検疫所で分離されたサルモネラなど、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を構築し、様々な観点からデータを解析し、技術の信頼性を高めていく必要があると考えられる。

## 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、検疫所等の先生方に深謝いたします。

## E. 研究発表

### 論文発表

泉谷秀昌、森田昌知、李謙一、大西真：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．日本食品微生物学会雑誌、第 34 巻第 2 号、90-95、2017 年

泉谷秀昌：赤痢総論．平成 29 年度国立保健医療科学院 細菌研修、2017 年 11 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（2015 年）

起因菌	感染者数	対10万人	入院数	入院率	死亡数	死亡率
カンピロバクター	6289	12.82	1087	17.3	13	0.21
リステリア	116	0.24	111	95.7	15	12.93
サルモネラ	7719	15.74	2104	27.3	32	0.41
赤痢菌	2645	5.39	626	23.7	1	0.04
STEC O1157	465	0.95	179	38.5	3	0.65
STEC non-O157	807	1.65	125	15.5	1	0.12
ビルリオ属菌	195	0.40	48	24.6	5	2.56
エルシニア	139	0.28	38	27.3	1	0.72

図 1. 細菌性赤痢：発生動向（NESID、1999-2016 年）

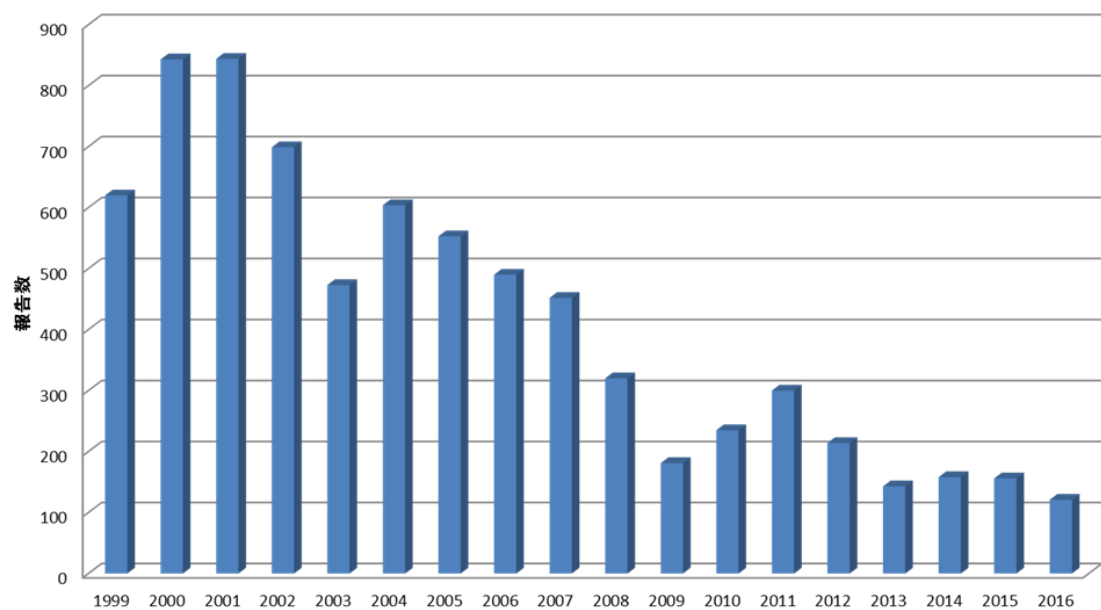


図 2. 細菌性赤痢：推定感染地域別分布（NESID、2012-2016 年）

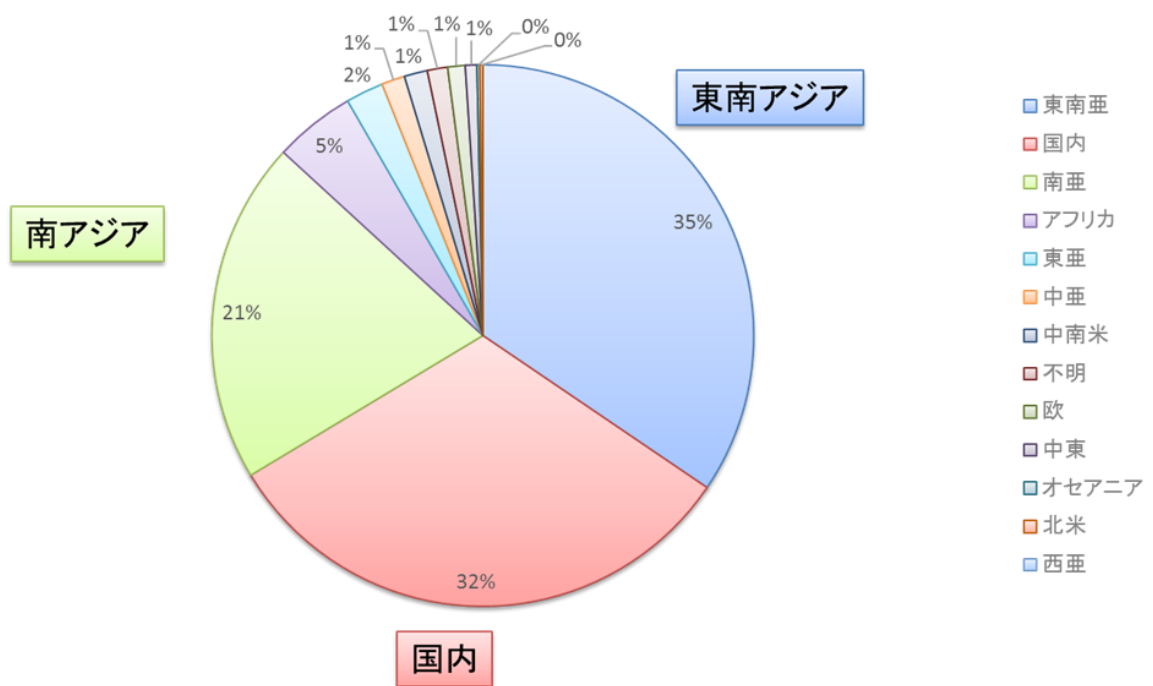




図 3. 2017 年 *S. sonnei* MLVA 解析。色つきは輸入例株を表す（緑、東南アジア；赤、南アジア；黄、アフリカなど）。色なしは国内例もしくは不明株を表す。

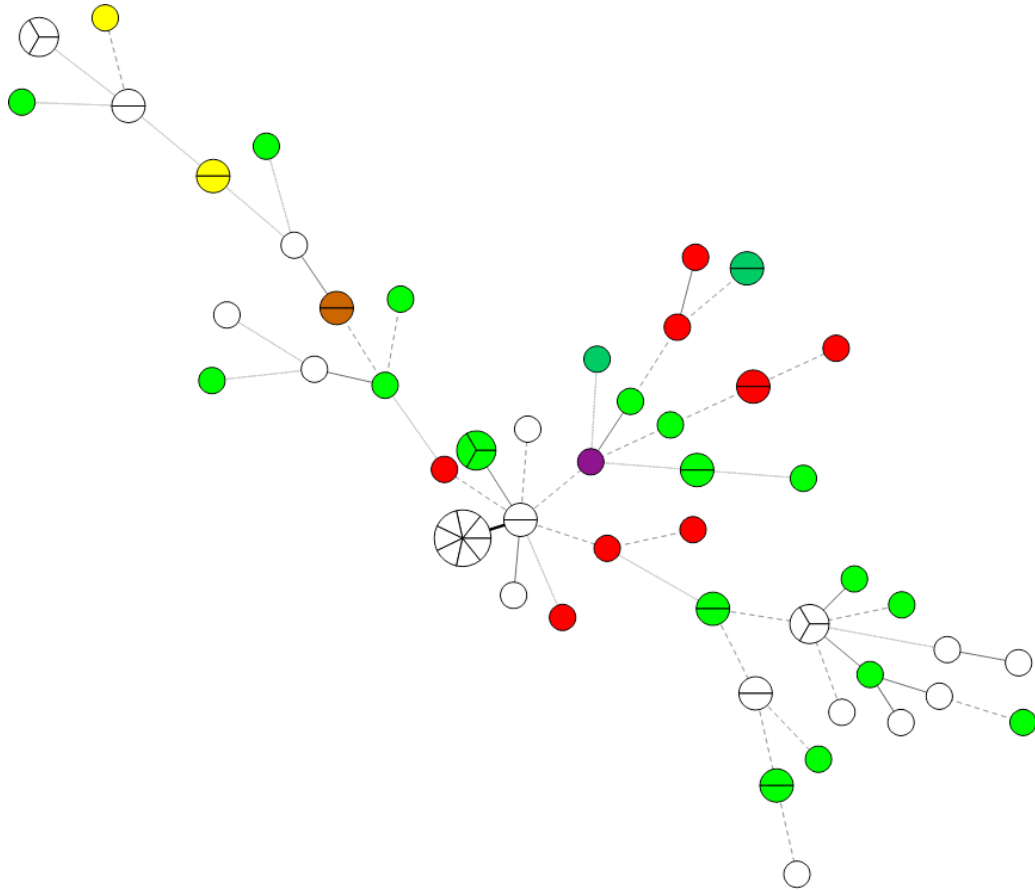


図 4. *S. sonnei* MLVA データ主成分判別分析

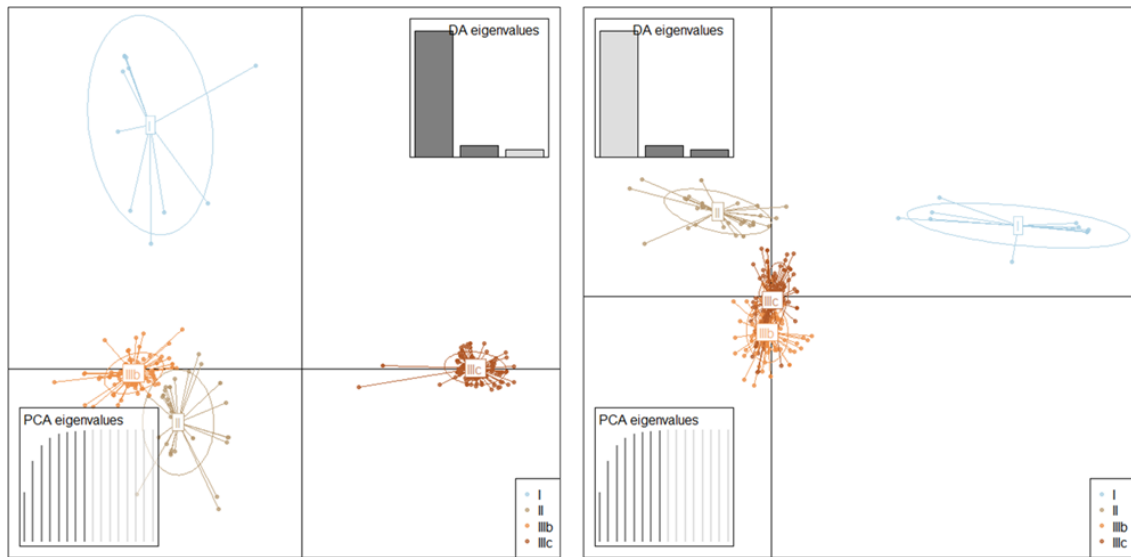


図 5. 2017 年 *S. sonnei* 株を MLVA-MST。MLVA データからの推定系統で色分けした。

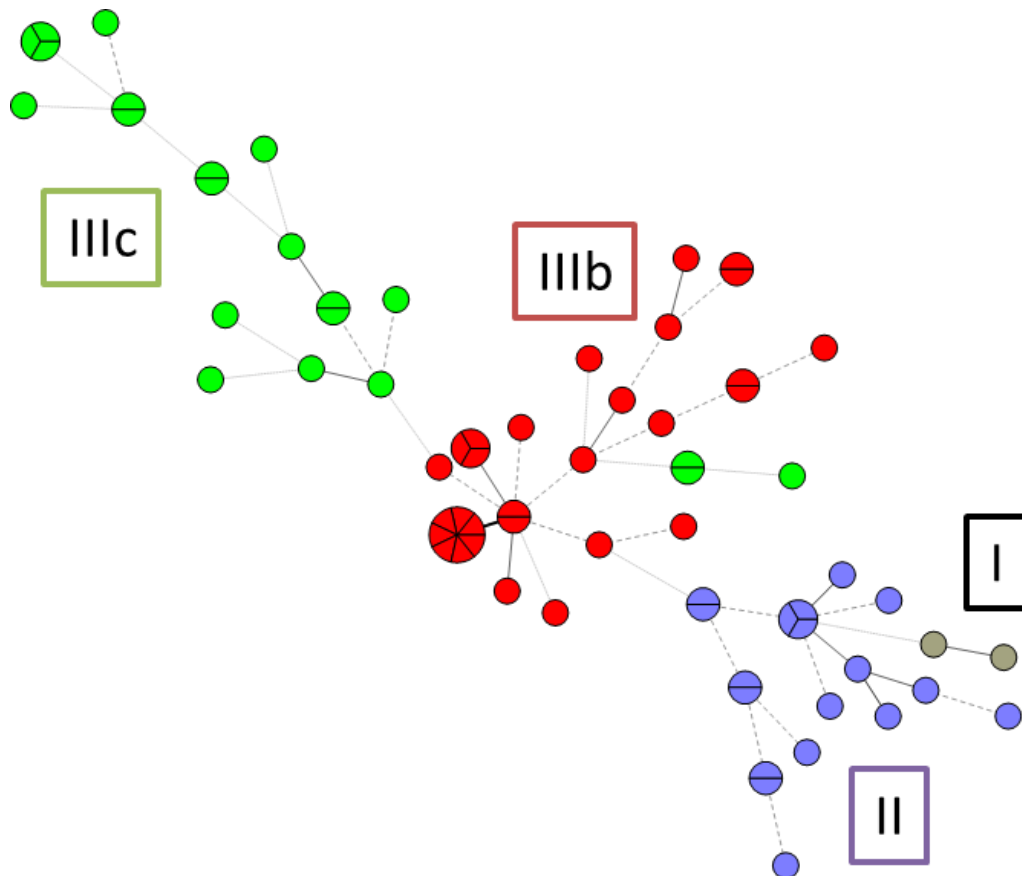
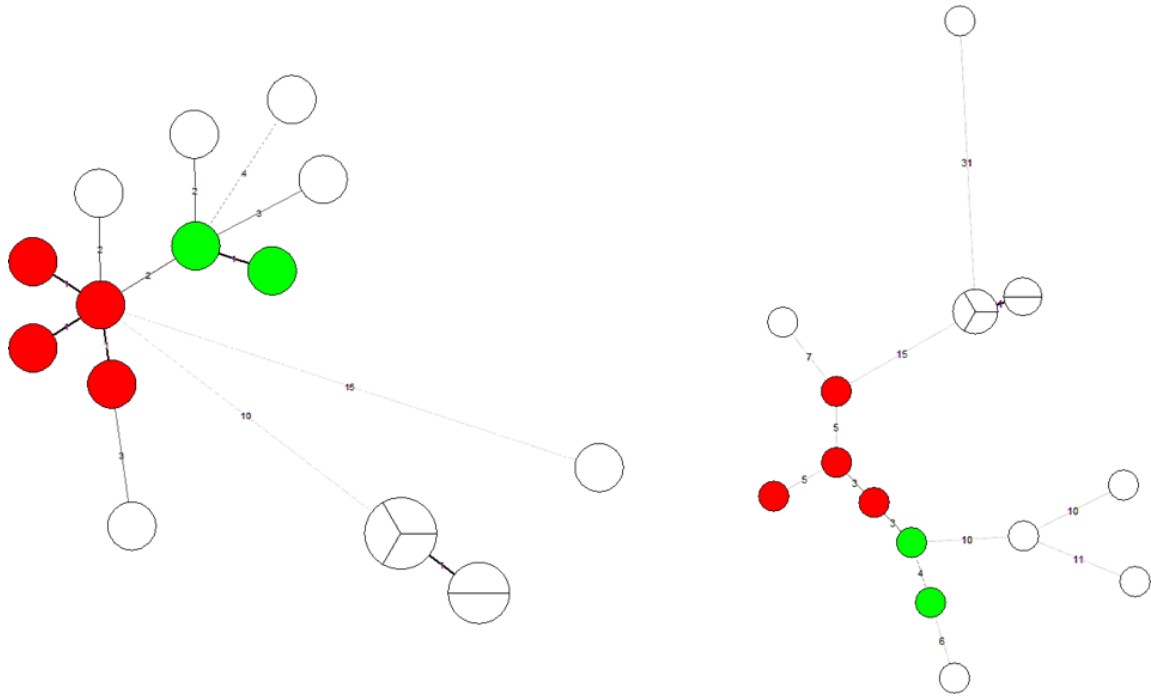


図 6. *S. flexneri* 3a MLVA-MST。左が従前の、右が 17 遺伝子座を追加したもの。色つきは single locus variant が変化した場所を表す。線上の数値は異なる遺伝子座の数を表す。



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」  
平成 29 年度分担研究報告書

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	下島優香子	東京都健康安全研究センター	微生物部
研究協力者	井田 美樹	東京都健康安全研究センター	微生物部
研究協力者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

グラム陽性桿菌 *Listeria monocytogenes*（リステリア）は、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であり、汚染食品を媒介して感染することが知られている。本菌は低温や高食塩濃度等への環境抵抗性が強く、冷蔵庫内でも増殖が可能であり、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検出されている。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おり、日本国内においても年間約 200 例の散発事例が起きていると推定されている。髄膜炎、敗血症等侵襲型リステリア症の潜伏期間は数週間から最長 3 か月にも及ぶため、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、検疫所から分与された輸入食品由来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 PFGE 解析を行い、データベースの充実を図ると共に、これまでの国内事例間の関連性、原因食品推定等の解析を行った。その結果、菌株間で極めて高い相同性を示す株が 31 組得られた。

A. 研究目的

*Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は、動物の腸管内、土壌、河川水や食品工場、冷蔵庫内など自然界や人の生活圏の様々な環境に広く存在している。本菌は

高度な環境抵抗性をもち、 $-1^{\circ}\text{C}$ 程度の低温下での増殖能、20%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。本菌を原因菌とするリステリア症は、食品

媒介感染症の中で最も致命率が高いことが知られており、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を示すが、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、敗血症等を示す侵襲性リステリア症を引き起こす。非侵襲性リステリア症の潜伏期間は数日間であるが、侵襲性の場合には数週間、長い場合には3ヶ月にも達することから、患者の喫食歴調査や冷蔵庫残品の検査が困難であるため、侵襲性リステリア症の散发事例での原因食品の特定も困難となっている。集団事例については、欧米ではほぼ毎年発生している。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年にかけてカナダを含めて発生したバック詰めサラダを原因とする事例（患者数33、確定死者数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）、2016年から2017年にかけて発生したソフトチーズを原因とする事例（患者数8、死者数2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、ドイツでも2012年から2016年にかけて、同一工場の複数製品が原因の疑いが濃厚で

ありながら、確定に至っていない大規模事例（患者66、死者3名）が発生した。更に、2016年から2017年にかけてはポーランドで生産されたスモークサーモンを原因としてデンマークとフランスで患者7名、死者1名の集団事例が、2015年から2017年にかけてEU内の5か国で同一株に由来する26名の患者（内4名死亡）の事例が発生しており、原因食品の究明が急がれている。また、オーストラリアでは2018年1月からメロンによる集団事例（患者20名、死者7名）が、南アフリカ共和国では2017年1月から現在まで、食肉加工品を原因とする患者数が1000人近くの過去最大規模の集団事例が発生している。これらの株の同一性の評価には全て、分子疫学的解析が用いられている。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（国内で年間約200例）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。また、Codexによる食品中のリステリアの国際規格設定を受けて、日本国内でも平成26年に非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ（ソフト及びセミハードに限る）中のリステリア菌数を100 colony forming unit (CFU)/g以下とする微生物規格が設定された。同時に、平成5年から用いられていた食品中のリステ

リア試験法が改正され、国際標準化機構 (International Organization for Standardization; ISO) の試験法に準拠した方法となり、1 ロットにつき 5 検体を検査して全数の合格が要求されるサンプリン グプランも設定された。

本研究では、海外から汚染食品を媒介して国内に侵入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ィ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等、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。

## B. 研究方法

### 1. 検体

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 432 株について解析を実施し、同一食品及 び患者由来で血清型及び PFGE 型が完全に 一致していた株については最終的な解析か らは除外したため、患者由来株 111 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 257 株、環境由来 株 1 株及び標準菌株 1 株を対象とした (表 1)。血清型の内訳は、1/2a グループ (1/2a、 1/2c、3a 及び 3c) が 195 株、1/2b グループ (1/2b 及び 3b) が 57 株、4b グループ (4ab、 4b、4d 及び 4e) が 121 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 1.2 に設定した。得られた相同性が 75% 以上のものを同一クラスターとして分類し、 相同性が 95%以上の株については、個々に 泳動パターンを目視して同一性の確認を行 った。

### 3. 諸外国におけるリスティア症集団事例 に関する情報収集

2017 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 解析の結果を表 2 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 39 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 1/2a グループ (1/2a、1/2c、3a 及び 3c) に属す る 195 菌株は 26 クラスターに分類され、そ の内 10 クラスターは 1 菌株のみで構成され ていた。本血清型 1/2a に属する菌株は 25 クラスターに分かれており、分子疫学的に

多様性が高いことが示された。一方、同血清型の患者株 24 株のうち 12 株は同一クラスターに属していた。血清型 1/2c に属する 34 菌株は、1 菌株を除いて同一クラスターに分類されていた。血清型 3a に属する 6 菌株のうち 3 菌株は同一クラスターに属していた。血清型 1/2b グループ (1/2b 及び 3b) に属する 57 菌株は 5 つのクラスターに分かれており、その内 2 つのクラスターに 50 菌株が分類された。4b グループ (4ab、4b、4d 及び 4e) に属する 121 株は 8 つのクラスターに分類され、その内 3 クラスターは 1 菌株のみで構成されていた。本グループに属する患者由来株 70 菌株は 7 クラスターに分かれたが、そのうちの 3 つのクラスターにそれぞれ 8 菌株、20 菌株及び 35 菌株が属していた。1/2b グループと 4b グループの患者由来株の多くは、食品由来株も多く属する大きいクラスターに属していたが、血清型 1/2a グループの患者由来株の多くは特定のクラスターに分類されていた。本クラスターは、鶏肉及び水産食品との相関が高かった。

菌株間で PFGE 解析の結果が 100% の相同性を示したものの、及び 95% 以上の相同性を示し、個別の確認で同一であることが確認されたものは、31 組見られた (表 3)。患者株間で、分離年 (1 年以内) と分離場所が近い (同一県又は隣県) ものは 4 群、19 群、20 群、26 群、27 群及び 30 群の 6 群 (表 4、青色部分) であり、これらは集団事例の可能性が高いと思われた。また、食品由来株と患者株で分離年の近いものは 7 群、8 群、9 群、14 群、15 群、26 群及び 27 群の 7 群 (表 4、茶色部分) であった。なかでも 14 群の患者 2 は聞き取り調査により

複数種類の非加熱食肉製品の喫食歴が明らかになっており、同年の非加熱食肉製品由来菌株と同一であったことから、原因食品として有力であると推察された。一方、同群の患者 1 については喫食歴の情報に非加熱食肉製品は見られなかった。同様に、15 群の患者についても、喫食歴の情報に非加熱食肉製品は見られなかった。

## 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

2017 年度に諸外国で発生した主なリステリア症集団事例は 5 例の報告が見られた (表 5)。原因食品は、ソフトチーズ、メロン、食肉製品、輸入スモークサーモンであり、1 例が不明であった。集団事例の発生は米国、オーストラリア、南アフリカ共和国で各 1 件、EU 圏内の複数の国で 2 件あった。現時点での患者数は 7 名から 659 名となっており、致命率は 12.4% から 27.3% となっていたが、内 3 事例では流行が収束しておらず、患者数等が未確定であった。

## D. 考察

本研究において、患者由来株 111 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 257 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、患者由来株は特定のクラスターに高い相関をもって分類されることが示された。特に血清型 1/2a グループの患者由来株の半数は鶏肉及び水産食品由来株と相関の高いクラスター (クラスター 21) に属しており、食肉製品由来株と相関の高いクラスター (クラスター 1) に属している患者由来株は 4 株のみであった。

一方で、BioNumerics による解析で高い相同性を示した株の泳動パターンを個別に確認したところ、患者由来株と分離年が近い食品由来株 6 株のうち、食肉製品由来株が 3 株であり、食肉製品がいくつかの国内散发事例の原因食品となっている可能性が示唆された。また、今回同一とされた菌株群については、より高い精度で相同性を解析するため、ここ数年欧米でリステリア集団事例菌株の解析に多く用いられている全ゲノム塩基配列解析を行う必要があると思われる。更に、今年度の研究で患者の喫食歴と食品由来株の型別が一致したものが見られ、散发事例の原因の推定が可能となった。原因食品の同定には患者の喫食歴の情報が不可欠であり、今後の国内事例発生時に、保健所等によりできる限り迅速に聞き取り調査を行うためのフォーマット等の整備や、より多くの地方衛生研究所等との情報共有やデータベースの拡充が必要であると思われる。

今年度における諸外国でのリステリア症発生状況は、概ね例年と同様の発生頻度である一方で、南アフリカ共和国では 650 名を超える患者数、180 名の死者数となる大規模事例が発生した。EU 諸国では、分子疫学解析によって、過去 2 年間に各国で同じ菌株による患者が出現していることが明らかとなっている（表 5）。また、EU 内からの輸入食品により、複数の国での事例が発生していることも明らかとなった。EU 内での非加熱喫食食品の検査では Codex のリステリア規格に違反する食品がほとんど検出されないにもかかわらず、リステリア症発生率が減少していないことが明らかとなっており、より高感度な試験法や、迅速

な分子疫学解析と結果の共有が望まれている。

本研究の結果から、分子疫学的解析を行うことで、国内の様々な由来のリステリア菌株のデータが蓄積され、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。一方今後の課題として、継続的な調査の必要と共に、国内のより多くの試験所からの情報を統合し、データベース化すること、高い相関を示した菌株群については、より深度の高い情報の集積のため全ゲノム塩基配列解析を行うこと、輸入事例の検出のための国際的な情報の共有が必要であると思われる。

## E. 結論

本研究の結果、リステリアの血清型別及び PFGE 解析により、これまで散发事例と思われた事例間で高い相関が見られ、集団事例の可能性のある例や、散发事例の原因食品として可能性の高い例が見出された。今後、新しい患者由来株や食品分離株の解析を継続し、データの蓄積と有効活用を行うことで、米国等で行われているのと同様に、集団事例の早期発見や、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. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

なし



H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 使用菌株

		血清型			
血清型 1/2a グループ	1/2a	1/2c	3a	3c	
	155	34	6	1	
血清型 1/2b グループ	1/2b	3b	UT		
	52	4	1		
血清型 4b グループ	4b	4d	4ab	4e	UT
	101	10	2	3	5

UT: 型別不能

表2 血清型ごとのクラスター分類

血清型 1/2a グループ	クラスター	血清型				
		1/2a	1/2c	3a	3c	
	1	7	33		1	
	2	3				
	3		1			
	4	21				
	5	11				
	6	13				
	7	1				
	8	1				
	9	2		1		
	10	6				
	11	2				
	12	18				
	13	2				
	14	3				
	15	2		1		
	16	4				
	17	5		1		
	18	1				
	19	1				
	20	3				
	21	44		3		
	22	1				
	23	1				
	24	1				
	25	1				
	26	1				
血清型 1/2b グループ	クラスター	1/2b	3b	UT		
	1	33	3	1		
	2	2				
	3	1				
	4	3	1			
	5	13				
血清型 4b グループ	クラスター	4b	4d	4ab	4e	UT
	1	17	2			
	2	1	1			
	3	31	2	1		3
	4	3				
	5	46	5	1	3	2
	6	1				
	7	1				
	8	1				

UT: 型別不能

表3 由来ごとのクラスター分類

血清型 1/2a グループ	クラス ター	由来											合計
		鶏肉	豚肉	牛肉	食肉 製品	魚介 類	乳 製品	その他 食品	患者	環境	患畜	標準 株	
	1	3	6	5	14	7	1	1	4				41
	2	1			2								3
	3			1									1
	4		1		14			4	2				21
	5	2	4	2	2		1						11
	6				7	2		1	3				13
	7							1					1
	8							1					1
	9				2	1							3
	10					5		1					6
	11					2							2
	12	3	4	2	5	3			1				18
	13				2								2
	14					2		1					3
	15						3						3
	16	2			2								4
	17						1	2	3				6
	18						1						1
	19							1					1
	20				2			1					3
	21	14	1	2	4	13			13				47
	22					1							1
	23				1								1
	24								1				1
	25							1					1
	26						1						1
血清型 1/2b グループ	クラス ター												合計
	1	3	2		7	6	4	5	9	1			37
	2					2							2
	3								1				1
	4					3		1					4
	5		2	1	4	1			5				13
血清型 4b グループ	クラス ター												合計
	1	2		1	1	1	2	4	8				19
	2								2				2
	3	1	4	1	8	1		1	20			1	37
	4								3				3
	5		3	4	7			5	35		3		57
	6								1				1
	7					1							1
	8								1				1

表 4 血清型別及び PFGE 解析で同一とされた菌株群

同一とされた菌株群	由来										
血清型別	分離年										
1	魚介類 1	魚介類 2	患者								
1/2a	2010	2010	1988								
2	患者	魚介類									
1/2a	2006	2010									
3	豚肉	患者									
1/2a	2012	1991									
4	患者 1	患者 2									
1/2a	1987	1988									
5	鶏肉	患者	牛肉	豚肉	鶏肉 1	鶏肉 2	鶏肉 3	魚介類 1	魚介類 2	魚介類 3	患者
1/2a	2012	2001	2012	2012	2012	2012	2012	2010	2010	2010	2002
6	患者 1	患者 2									
1/2a	1989	2016									
7	食肉製品	患者									
1/2a	2002	2003									
8	患者	食肉製品 1	食肉製品 2								
1/2a	2011	2013	2011								
9	患者	魚介類									
1/2a	1999	2000									
10	患者	魚介類									
1/2b	2003	2010									
11	患者	乳製品									
1/2b	1999	2001									
12	患者 1	患者 2	牛肉	豚肉 1	豚肉 2						
1/2b	1988	1992	2012	2012	2012						
13	患者	松前漬									
4b	1998	2002									
14	魚介類	食肉製品	患者 1	患者 2							
4b	2008	2016	2016	2016							
15	患者	食肉製品 1	食肉製品 2	食肉製品 3	食肉製品 4	食肉製品 5					
4b	2017	2016	2008	2007	2007	2000					
16	患者 1	患者 2	標準株								
4b	1974	1989									

表 4 血清型別及び PFGE 解析で同一とされた菌株群 (続)

同一と された 菌株群	由来					
17	患者	食肉製品				
4b 患者株は 型別不能	1987	2000				
18	患者 1	患者 2				
4b	1992	1990				
19	患者 1	患者 2				
型別不能	1991	1991				
20	鶏肉	患者 1	食肉製品	患者 2	患者 3	豚肉
4b	2006	1989	2002	1988	1988	1991
21	患者	牛肉	豚肉			
4b	不明	1991	1991			
22	患者 1	患者 2				
4b	1988	1988				
23	患者 1	患者 2	患者 3			
4b	1991	1992	1998			
24	患者 1	患者 2				
4b	不明	不明				
25	患者	枝豆				
4b	2006	2016				
26	患者 1	患者 2	牛肉	患者 3	患者 4	患者 5
4b	1988	1991	1991	1991	1998	
27	患者 1	患者 2	エシヤロット			
4b	2003	2002	2004			
28	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5	
4b	1995	1992	1974	1998	1989	
29	患者	食肉製品				
4b	1988	2000				
30	患者 1	患者 2	患者 3			
4b	1989	1990	1989			
31	牛肉	患者				
4b	2012	2003				

表 5 2017 年度に発生した主なリステリア集団事例

発生国	発生時期	原因食品	患者数	死者数
米国	2016.9～2017.3	ソフトチーズ	8	2
オーストラリア	2018.2 時点	メロン	10	2
南アフリカ共和国	2017.1～ 2018.3 上旬時点	食肉製品	659	180
デンマーク・フランス	2016～2017	ポーランド産 スモークサーモン	7	1
EU（オーストラリア、デンマーク、 フィンランド、スウェーデン、英国）	2015～ 2017.12 時点	不明	26	4

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」  
平成 29 年度分担研究報告書

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集・解析

研究分担者 豊福 肇 山口共同大学獣医学部

研究要旨

過去 2 年間作成した Hazard の特性、国の National Food Control System の performance、喫食、曝露データ等の食品に specific なデータを網羅した半定量モデルを再検討し、入力項目を修正、再構築した。

今年度は、野菜、果実について、汚染及び食品由来疾患とハザードに関する論文サーチを行い、国ごとのデータの重み付けを変更した。また、国としての食品規制だけでなく、民間の第三者認証である Global GAP、Canada GAP 及び ISO 22000 の認証数データ並びにリコールデータの調査した国の数を増やし、モデルのインプットにしたことにより、モデルの不確実性を若干減少させることができた。

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。

B. 研究方法

昨年度試作したモデルの解析と欠点、改善点

National Food Control System（以下「NFCS」という）について、政府情報には限界があるので、加工食品については ISO 22000、BRC 及び IFS 認証数、果実については Global GAP 認証数をモデルに追加した。また、果実については学術論文をサーチし、アウトブレイクデータを調査しその結果もモデルに反映させた。

## C. 研究結果

図 1 にモデルの概念を示した。モデルはハザード、輸出国の NFCS、及び食品ごとに関与する事項についてデータを採し、それを 1 から 3 のスコアをつけ、各グループのスコア小計を乗じてリスクランキングを試みた。

また、3 要素それぞれのデータと、データの出所、及びスコアを表 1~3 に示した。

### ハザードに関するデータ

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。)

### 国の NFCS

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 Yes=3、任意、または輸出のみについては 2 とした。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) のデータを活用した。

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の数値をインプットとして用いた。

[projects.hcss.nl/monitor/57/report/report.pdf](https://projects.hcss.nl/monitor/57/report/report.pdf)

図 2 にその概念図を示した。このなかで、4 つの indicator : すなわち : ①人口 10 万人当たりの食品由来疾患のアウトブレイク数、②従業員 10000 人あたりの BRC の証明書、③RASFF、④人口当たり EU27 か国以外からの食品購入額を示していた。この結果を図示したのが、図 3~6 である。

- ① 人口 10 万人当たりの食品由来疾患のアウトブレイク数は、アウトブレイクが少ないほうが food safety control system の performance は良いと考え、少ない国が 1、多い国は 0 とした。国による報告システムの違いは③である程度カバーできると考え、補正していない。



- ② BRC の認証数は GHP と HACCP の認証スキームであり、かつ認証企業数が公表されている BRC の認証数を用い、認証数が多い国が 1、少ない国が 0 とした。ただし、BRC の普及率は国によって異なり、フランス、ドイツは類似の IFS の認証スキームを利用する食品企業が多いが、認証数が公表されていないため、活用できなかった。
- ③ RASFF への措置をとった通報数については、措置をとった通報が多いほど、food control system の performance がよいと考え 1、少ない国が 0 とした。
- ④ EU 域外の国の食品安全基準は EU ほど厳しくないとの仮定のもと、輸入食品への支出額が少ない国が 1、多い国が 0 とした。4 つの数値を単純に平均して総合ランキングの数値を算出した。

総合（図 7）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。

今年度は、国の食品安全マネジメントシステムを補完するシステムとして、GFSI でベンチマークされている BRC、IFS、Global GAP 及び ISO 22000 の食品安全マネジメントシステムの民間認証システムの認証データを活用し、認証数が多い国が 1、少ない国が 3 または 4 とした。IFS は承認施設数データが入手できなかったため、認証機関のデータを用いた。

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、詳細は割愛した。

表 9 に改編したモデルによる生ハム中の 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、スペインがリスクは低く、逆にアメリカ、カナダのリスクが大きかった。

表 10 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 位のフランスが他の国を大きく引き離し、リスクが大きかった。逆に届出数の少ないスペインはリスクが最も低かったが、届出数 3、4、5 位の米国、オーストラリア、ニュージーランドはスペインについてリスクが低かった。輸入届出数 2 位のイタリアはフランスほどではないがフランスに次ぐリスクの大きさとなり、次いで届出数下位のオランダがほぼ同じ程度であった。

表 11 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、メキシコが続き、チリはそれよりやや低いスコアで続いた。輸入届出件数の第 1 位のアメリカは下のほうで、NZ が最もリスクが低く、次いで南ア、豪州、やや離れて韓国がリスクの低い国であった。

表 12 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 位のチリがトップ、次いで届出数最下位のデンマークで、この 2 国が突出した大きなリスクであった。逆にスペイン、豪州、米国が低かつ

た。届出件数の1番目のスイスは中程度であった。

表13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。いずれの食品カテゴリーでもスペインが最もリスクが低く、かつどの食品カテゴリーでもほぼ同じリスクであった。

リスクが最も大きな国のリスクはソフトチーズ、燻煙魚、生ハム、の順番で大きかった。フランスは生ハムでは8位、ソフトチーズでは最下位、燻煙魚は8位であった。米国は生ハムで最下位、ソフトチーズと燻煙魚で2位であった。イタリアは、生ハムは3位、ソフトチーズは下から2番目（燻煙魚は届出数が少ないため対象外）、豪州はそれぞれ2、4、1位と安定してリスクが少ない国であった。

表14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位のフィリピンと3位のメキシコが最もリスクが大きく、次いで、届出数5、6位のタイ、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位の豪州と10位の南アと同スコアで最も低かった。

表15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、順位の傾向は同じであった。

表16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。リス

クは届出件数2位のタイが最も多く、次いで10位のフィリピン、8位のミャンマー、7位のチリ、1位の中国、3位の韓国と続いた。逆に最もリスクが低いのは届出件数16位のフランス、ついで、米国、豪州の順であった。欧州、北米の国々のスコアは概して低く、逆にアジアの国々は概して高かった。

## D. 考察

昨年度まで作成したモデルを改良して病原菌、食品カテゴリー、輸出国別のリスクランキングを試みた。

NFCSのperformanceについてはGFSIでベンチマークされた民間認証等の認証数または認証機関数のデータを組み込んだ。しかし、これらの認証のうち、特にBRCやIFSは欧米が主で、それ以外地域での認証は限られていることに起因し、欧米以外の国々のリスクが相対的に上昇したと考えられた。

すべての輸入食品がこのような第3者認証のスキームで認証を受けているとは限らないが、このようなスキームは輸出産業を中心に普及していると考えられることから、一定の意味はあると考えた。

今年度は、文献情報から食中毒及び汚染データをモデルのインプットとして活用することを試みたが、この2つの病原菌について、報告がある国は欧米、カナダ、豪州等一部に限られており、結果的には個別の国ごとの入力値とすることは断念せざるを得なかった。

残念ながら課題としていた、以下の点は解消できなかった。

- 1) 食品分類のレベル：大分類がいか、小分類がいか。Lm の場合は魚介類全体よりも燻煙魚のほうが Risk に特異的と考えられた。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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)
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 汚染率も食品ごとのばらつきとデータがあり、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。

## E. 結論

今回、最終年度ということで、過去に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、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. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

食品のリスク分析・評価に基づく科学的な衛生監視指導体制の現状と課題（特集 衛生監視・指導行政の現状と課題）公衆衛生、81(8):2017.8 p.618-624

### 2. 学会発表

豊福肇. 輸入食品リスクランキングモデルの構築. 第 113 回日本食品衛生学会学術講演会. 平成 29 年 11 月 9-10 日, 東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
FERG の疾病数	Kirk, et.al. 2015. <i>PLOS Medicine</i> <b>12</b> (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 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 Alert	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
WHO Food Safety Core capacity	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
ISO 22000 認証数	ISO web より（表 4 に示した）
BRC 認証数	BRC web より（表 5 に示した）
IFS 認証機関数	IFS web より（表 6 に示した）
FSSC 22000 承認数	FSSC 22000 データベースより（表 7 に示した）
Global GAP 認証農場数	Global GAP web より（表 8 に示した）

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

表 4 国別 ISO 22000:2005 認証サイト数

国名	ISO 22000;2005	
TOTAL	33141	ランキング
CHINA	11937	0.5
FRANCE	3571	1
GREECE	2068	1
INDIA	1974	1
ITALY	1754	1
JAPAN	1281	1
TAIPEI, CHINESE	688	1.5
SPAIN	661	1.5
POLAND	464	2
TURKEY	379	2
INDONESIA	369	2
AUSTRALIA	359	2
SRI LANKA	352	2
THAILAND	345	2
MALAYSIA	316	2
VIET NAM	282	2
RUSSIAN FEDERATION	267	2
SINGAPORE	265	2
EGYPT	250	2
PORTUGAL	239	2
UNITED ARAB EMIRATES	204	2
KOREA, REPUBLIC OF	203	2
SOUTH AFRICA	200	2
BULGARIA	196	2
NETHERLANDS	196	2
SAUDI ARABIA	196	2
UKRAINE	185	2
PAKISTAN	167	2
ISRAEL	160	2
ROMANIA	158	2
SERBIA	157	2
DENMARK	148	2
TUNISIA	144	2
CZECH REPUBLIC	139	2
GERMANY	139	2
HONG KONG, CHINA	138	2
KENYA	136	2
HUNGARY	127	2
MEXICO	125	2

表 4 国別 ISO 22000:2005 認証サイト数 (続)

国名	ISO 22000;2005	
TOTAL	33141	ランキング
SLOVAKIA	112	2
LEBANON	111	2
BELGIUM	101	2
UNITED STATES OF AMERICA	93	3
COLOMBIA	86	3
UNITED KINGDOM	84	3
IRAN, ISLAMIC REPUBLIC OF	76	3
SWEDEN	67	3
SWITZERLAND	63	3
CROATIA	62	3
IRELAND	62	3
ARGENTINA	61	3
BRAZIL	57	3
FINLAND	55	3
MOROCCO	53	3
NORWAY	52	3
AUSTRIA	48	3
JORDAN	46	3
CANADA	45	3
CHILE	43	3
CYPRUS	42	3
BAHRAIN	36	3
KUWAIT	34	3
PHILIPPINES	33	3
LATVIA	31	3
LITHUANIA	27	3
OMAN	27	3
QATAR	27	3
ECUADOR	25	3
MALDIVES	25	3
MOLDOVA, REPUBLIC OF	24	3
BANGLADESH	23	3
NIGERIA	23	3
BELARUS	22	3
ESTONIA	22	3
MAURITIUS	21	3
NEW ZEALAND	21	3
GUATEMALA	16	3
THE FORMER YUGOSLAV REPUBLIC OF MACEDONIA	16	3

表 4 国別 ISO 22000:2005 認証サイト数 (続)

国名	ISO 22000;2005	
TOTAL	33141	ランキング
GHANA	15	3
MACAU, CHINA	15	3
BOLIVIA	14	3
PERU	13	3
FIJI	12	3
NICARAGUA	12	3
ALBANIA	10	3
BOSNIA AND HERZEGOVINA	10	3
DOMINICAN REPUBLIC	10	3
AZERBAIJAN	9	3
GEORGIA	9	3
KAZAKHSTAN	9	3
UGANDA	9	3
CÔTE D'IVOIRE	8	3
MALTA	8	3
SUDAN	8	3
ARMENIA	7	3
HONDURAS	7	3
RWANDA	7	3
ICELAND	6	3
LAO PEOPLE'S DEMOCRATIC REPUBLIC	6	3
ANGOLA	5	3
CAMBODIA	5	3
CONGO, THE DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE	5	3
MONTENEGRO	5	3
PARAGUAY	5	3
TANZANIA, UNITED REPUBLIC OF	5	3
ALGERIA	4	3
CAMEROON	4	3
COSTA RICA	4	3
ETHIOPIA	4	3
MADAGASCAR	4	3
MONGOLIA	4	3
SLOVENIA	4	3
ZAMBIA	4	3
KOREA, DEMOCRATIC PEOPLE'S REPUBLIC OF	3	3



表 4 国別 ISO 22000:2005 認証サイト数 (続)

国名	ISO 22000;2005	
TOTAL	33141	ランキング
MALAWI	3	3
MONACO	3	3
TAJIKISTAN	3	3
URUGUAY	3	3
UZBEKISTAN	3	3
VENEZUELA	3	3
ANDORRA	2	3
BRUNEI DARUSSALAM	2	3
CUBA	2	3
EL SALVADOR	2	3
JAMAICA	2	3
LIBYAN ARAB JAMAHIRIYA	2	3
LUXEMBOURG	2	3
MYANMAR	2	3
NAMIBIA	2	3
NEPAL	2	3
SEYCHELLES	2	3
ZIMBABWE	2	3
AFGHANISTAN	1	3
BHUTAN	1	3
BOTSWANA	1	3
COMOROS	1	3
GABON	1	3
GUINEA-BISSAU	1	3
KOSOVO	1	3
KYRGYZSTAN	1	3
LESOTHO	1	3
LIECHTENSTEIN	1	3
MALI	1	3
MOZAMBIQUE	1	3
PAPUA NEW GUINEA	1	3
SAN MARINO, REPUBLIC OF	1	3
SURINAME	1	3
SYRIAN ARAB REPUBLIC	1	3
TOGO	1	3
TRINIDAD AND TOBAGO	1	3
TURKMENISTAN	1	3
BAHAMAS	0	3

表 4 国別 ISO 22000:2005 認証サイト数 (続)

国名	ISO 22000;2005	
TOTAL	33141	ランキング
TRINIDAD AND TOBAGO	1	3
TURKMENISTAN	1	3
BAHAMAS	0	3
BARBADOS	0	3
BELIZE	0	3
BENIN	0	3
BERMUDA	0	3
BURKINA FASO	0	3
CAPE VERDE	0	3
CAYMAN ISLANDS (UK)	0	3
CENTRAL AFRICAN REPUBLIC	0	3
CHAD	0	3
CHRISTMAS ISLAND	0	3
COCOS (KEELING) ISLANDS	0	3
CONGO, REPUBLIC OF	0	3
DJIBOUTI	0	3
EQUATORIAL GUINEA	0	3
ERITREA	0	3
GAMBIA	0	3
GIBRALTAR (UK)	0	3
GRENADA	0	3
GUAM	0	3
GUINEA	0	3
GUYANA	0	3
HAITI	0	3
IRAQ	0	3
KIRIBATI	0	3
LIBERIA	0	3
MAURITANIA, ISLAMIC REPUBLIC OF	0	3
MICRONESIA, FEDERATED STATES OF	0	3
NETHERLANDS ANTILLES (NL)	0	3
NEW CALEDONIA	0	3
NIGER	0	3
PALESTINE	0	3
PANAMA	0	3
PUERTO RICO	0	3
SAINT KITTS AND NEVIS	0	3
SAINT LUCIA	0	3

表 4 国別 ISO 22000:2005 認証サイト数 (続)

国名	ISO 22000;2005	
	TOTAL	ランキング
SAINT VINCENT AND THE GRENADINES	0	3
SAMOA, INDEPENDENT STATE OF	0	3
SENEGAL	0	3
SIERRA LEONE	0	3
SOLOMON ISLANDS	0	3
SOMALIA	0	3
SWAZILAND	0	3
YEMEN	0	3

表 5 国別 BRC 認証数

国	認証数	ランク	国	認証数	ランク
英国	2616	1	ハンガリー	91	3
イタリア	2498	1	ノルウェー	91	3
アメリカ	1845	1	チェコ	77	3
中国	1829	1	スリランカ	61	3
スペイン	1550	1	スイス	48	3
オランダ	868	1.5	フィリピン	44	3
ポーランド	780	1.5	エクアドル	41	3
フランス	705	1.5	マレーシア	31	3
インド	532	2	ウルグアイ	30	3
カナダ	521	2	ロシア	18	3
トルコ	517	2	コスタリカ	17	3
ベルギー	411	2	フィンランド	17	3
タイ	409	2	パラグアイ	17	3
アイルランド	365	2	チュニジア	17	3
豪州	318	2	台湾	16	3
チリ	298	2	コロンビア	13	3
ドイツ	284	2	Guatemala	12	3
ベトナム	284	2	クロアチア	11	3
南ア	261	2	シンガポール	11	3
ニュージーランド	218	2	ホンジュラス	7	3
ペルー	170	2	韓国	6	3
モロッコ	150	2	Japan	5	3
スウェーデン	137	2	カンボジア	4	3
ポルトガル	130	2	香港	4	3
ブラジル	127	2	ウガンダ	3	3
アルゼンチン	123	2	ザンビア	1	3
インドネシア	123	2	カメルーン	0	3
デンマーク	111	2	キューバ	0	3
メキシコ	107	2	ジャマイカ	0	3

表 6 国別 IFS 認証機関数

国名	機関数	ランキング
ドイツ	20	1
スペイン	12	1
フランス	7	2
イタリア	9	2
米国	3	2
英国	2	2
デンマーク	1	3
ポーランド	4	2
インド	1	3
ギリシャ	2	3
Bosnia and Herzegovina	1	3
オランダ	2	3
スイス	2	3
オーストリア	2	3
豪州	1	3
ベルギー	1	3
チェコ	1	3

表 7 国別 FSSC 22000 認証数

国名	認証数	ランキング
アメリカ	1222	1
オーストラリア	167	2
ニュージーランド	77	3
イタリア	338	2
オーストリア	86	3
ベルギー	174	2
ブラジル	421	2
カナダ	311	2
チリ	66	3
中国	1525	1
デンマーク	105	2
フランス	370	2
ドイツ	454	2
ハンガリー	64	3
インド	1045	1
インドネシア	255	2
韓国	351	2
日本	1482	1
メキシコ	610	1.5
ミャンマー	7	3.5
オランダ	662	1.5
ノルウェー	74	3
ペルー	42	3
フィリピン	116	2
ポーランド	211	2
南ア	645	1.5
スイス	397	2
英国	118	2
ベトナム	142	2
タイ	238	2

表 8 国別 Global GAP 認証数

国名	Number of certified farms (absolute)	Ranking
スペイン	29,853	0.5
イタリア	18,792	1
ギリシャ	10,764	1
オランダ	9,516	1
ドイツ	8,650	1
ペルー	3,460	2
フランス	3,415	2
インド	3,319	2
ベルギー	3,186	2
チリ	2,828	2
オーストリア	2,516	2
トルコ	2,442	2
南ア	1,797	3
ニュージーランド	1,516	3
イスラエル	1,266	3

表9 生ハム中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			イ タ リ ア	ス ペ イン	フ ラ ン ス	米 国	ド イ ツ	オ ー ス ト リ ア	ハン ガ リー	中 国	カナ ダ	豪 洲
Hazard												
FERG の 疾病数	H:>10 <sup>8</sup> , M:10 <sup>8</sup> -10 <sup>6</sup> . L:<10 <sup>6</sup>	<i>Listeria</i> は 1.4*10 <sup>4</sup> , 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	<i>Listeria</i> は 0.22 で High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	H:>10 <sup>6</sup> , M:10 <sup>6</sup> -10 <sup>5</sup> , L:<10 <sup>5</sup>	1.2*10 <sup>5</sup> 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



表 9 生ハム中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		イ タ リ ア	ス ペ イ ン	フ ラ ン ス	米 国	ド イ ツ	オ ー ス ト リ ア	ハン ガ リ ー	中 国	カナ ダ	豪 洲
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
ISO 22000 承認数		1	1.5	1	3	3	3	2	3	3	2
BRC 承認数		1	1	1.5	1	2	2	3	3	2	2
FSSC 22000		2	2	2	1	2	3	3	3	2	2
IFS 認証機関数		2	1	2	2	1	3	4	4	4	3
民間認証小計/4		1.5	1.3 75	1.6 25	1.75	2	2.7 5	3	3.2 5	2.75	2.2 5
EU Project		1	1	3	1.5	2	2	3	1.5	1.5	1.5
小計		7.5	6.3 75	8.6 25	7.25	8	8.7 5	10	8.7 5	8.25	7.7 5

表9 生ハム中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		イ タ リ ア	ス ペ イ ン	フ ラ ン ス	米 国	ド イ ツ	オ ー ス ト リ ア	ハン ガ リ ー	中 国	カナ ダ	豪 洲
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
日本への輸出货量	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		675	573 .75	776 .25	870	720	708 .75	810	708 .75	742. 5	627 .75

表 10 ソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			仏	伊	米	豪	中	デンマーク	独	蘭	英	スペイン
Hazard												
FERG の 疾病数	H:>10 <sup>8</sup> , M:10 <sup>8</sup> - 10 <sup>6</sup> . L: <10 <sup>6</sup>	<i>Listeria</i> は 1.4*10 <sup>4</sup> , 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	<i>Listeria</i> は 0.22 で High	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Severity (DALYs)	H:>10 <sup>6</sup> , M: 10 <sup>6</sup> -10 <sup>5</sup> , L: <10 <sup>5</sup>	1.2 * 10 <sup>5</sup> 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

表 10 ソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		仏	伊	米	豪	中	デン マーク	独	蘭	英	ス ペ イン
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
ISO 22000 承認数		1	1	3	2	3	2	2	2	3	1.5
BRC 承認数		2	1	1	2	2	2	2	1.5	1	1
FSSC 22000 認証数		2	2	1	2	3	2	2	1.5	2	2
IFS 認証機関数		2	2	2	3	4	3	1	3	2	1
民間認証小計/4		1.7 5	1.5	1.7 5	2.25	3	2.2 5	1.7 5	2	2	1.3 75
EU Project		3	1	1.5	1.5	1.5	3	2	3	2	1
小計		8.7 5	7.5	7.2 5	7.75	8.5	9.2 5	7.7 5	9	8	6.3 75

表 10 ソフトチーズ中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		仏	伊	米	豪	中	デンマーク	独	蘭	英	スペイン
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		131 2.5	825	652. 5	697. 5	688. 5	749. 25	767. 25	810	720	631. 125

表 11 果実中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			米	フィリピン	メキシコ	チリ	タイ	エクアドル	豪	韓国	台湾	南ア	NZ	中国	ペルー	仏	ブラジル	ベトナム
Hazard																		
FERG の 疾病数	H:>10 <sup>8</sup> , M:10 <sup>8</sup> - 10 <sup>6</sup> . L:<10 <sup>6</sup>	<i>Listeria</i> は 1.4*10 <sup>4</sup> , 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	<i>Listeria</i> 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 <sup>6</sup> , M; 10 <sup>6</sup> -10 <sup>5</sup> , L:<10 <sup>5</sup>	1.2*10 <sup>5</sup> 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

表 11 果実中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		米	フィリピン	メキシコ	チリ	タイ	エクアドル	豪	韓国	台湾	南ア	NZ	中国	ペルー	仏	ブラジル	ベトナム
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
Global GAP 承認数		4	4	4	2	4	4	4	4	4	3	3	4	2	2	4	4
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		10.5	14	12	11	12	13	9.5	10.5	11.5	9.5	8.5	12	10	9	12	12

表 11 果実中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

	米	フィリピン	メキシコ	チリ	タイ	エクアドル	豪	韓国	台湾	南ア	NZ	中国	ペルー	仏	ブラジル	ベトナム
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
日本への輸出货量	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	1260	1512	1512	1188	1296	1404	912	1008	1104	912	816	1152	1040	1008	1152	1152



表 12 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			ス イス	英	ス ウェ ーデン	チ リ	仏	カナ ダ	タイ	フィ リ ピ ン	ノ ル ウ エー	米	中	ス ペ イン	豪	デン マ ーク
Hazard																
FERG の 疾病数	H:>10 <sup>8</sup> , M:10 <sup>8</sup> - 10 <sup>6</sup> . L: <10 <sup>6</sup>	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 <sup>6</sup> , M: 10 <sup>6</sup> -10 <sup>5</sup> , L: <10 <sup>5</sup>	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

表 12 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		ス イス	英	ス ウェ ーデン	チ リ	仏	カナ ダ	タイ	フ ィ リ ピ ン	ノ ル ウ エー	米	中	ス ペ イ ン	豪	デン マ ーク
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
ISO 22000 承認数		3	3	3	3	1	3	2	3	3	3	0.5	1.5	2	2
BRC 承認数		3	1	2	2	1.5	2	2	4	3	1	1	1	2	2
FSSC 22000 承認数		2	2	3	3	2	2	2	2	3	1	1	2	2	2
IFS 認証機関数		3	2	4	4	2	4	4	4	4	2	4	1	1	3
民間認証小計/4		2.7 5	2	3	3	1.6 25	2.7 5	2.5	3.2 5	3.2 5	1.7 5	1.6 25	1.3 75	1.7 5	2.2 5
EU Project		1.5	3	1.5	3	3	1.5	3	3	1.5	1.5	3	1	1.5	3
小計		8.2 5	9	8.5	12	8.6 25	8.2 5	10. 5	13. 25	8.7 5	7.2 5	9.6 25	6.3 75	7.2 5	9.2 5

表 12 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

	スイス	英	EU	チリ	仏	カナダ	タイ	フィリピン	ノルウェー	米	中	スペイン	豪	デンマーク
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	825	972	765	1296	931.5	891	1039.5	1192.5	770	580	924	561	580	1232

表 13 Lm の生ハム（非加熱食肉製品）、ソフトチーズ、燻煙魚の risk 比較

非加熱 食肉製品	スペイン	豪州	伊	AT	NZ	独	カナダ	仏	ハンガリー	米
Hazard	9	9	9	9	9	10	10	9	9	12
NFCS	6.375	7.75	7.5	8.75	8.75	8	8.25	8.625	10	7.25
Food	10	9	10	9	9	9	9	10	9	10
Total	573.75	627.75	675	708.75	708.75	720	742.5	776.25	810	870

ソフトチーズ	スペイン	米国	NZ	豪州	英	デンマーク	独	オランダ	伊	仏
Hazard	11	9	9	9	10	9	11	10	11	15
NFCS	6.375	7.25	8.5	7.75	8	9.25	7.75	9	7.5	8.75
Food	9	10	9	10	9	9	9	9	10	10
Total	631.1	652.5	688.5	697.5	720	749.25	767.25	810	825	1312.5

燻煙魚	スペイン	豪	米	英	NZ	ノルウェー	スイス	カナダ	中	仏	タイ	フィリピン	デンマーク	チリ
Hazard	11	10	10	12	10	11	10	12	12	12	11	10	11	12
NFCS	6.375	7.25	7.25	9	8.5	8.75	8.25	8.25	9.6	8.6	10.5	13.25	9.25	12
Food	8	8	8	9	9	8	10	9	8	9	9	9	8	9
Total	561	580	580	972	765	770	825	891	924	931.5	1039.5	1192.5	1232	1296

表 14 果実中の *Salmonella* のリスクランキング

			米	フィリピン	メキシコ	チリ	タイ	エクアドル	豪	韓国	台湾	南ア	NZ	中	ペルー	仏	ブラジル	ベトナム
Hazard																		
FERG の 疾病数	H:>10 <sup>8</sup> , M:10 <sup>8</sup> - 10 <sup>6</sup> . L: <10 <sup>6</sup>	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 <sup>-3</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Severity (DALYs)	H:>10 <sup>6</sup> , M: 10 <sup>6</sup> -10 <sup>5</sup> , L: <10 <sup>5</sup>	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

表 14 果実中の *Salmonella* のリスクランキング (続)

		米	フィリピン	メキシコ	チリ	タイ	エクアドル	豪	韓国	台湾	南ア	NZ	中	ペルー	仏	ブラジル	ベトナム
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
Global GAP 認証農場数		4	4	4	2	4	4	4	4	4	3	3	4	2	2	4	4
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		10.5	14	12	11	12	12	9.5	10.5	11.5	8.5	8.5	12	10	9	12	12

表 14 果実中の *Salmonella* のリスクランキング (続)

	米	フィリピン	メキシコ	チリ	タイ	エクアドル	豪	韓国	台湾	南ア	中	中	ペルー	仏	ブラジル	ベトナム
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
日本への輸出货量	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	1470	1764	1728	1386	1512	1512	1064	1176	1288	952	952	1440	1120	1008	1344	1440

表 15 果実について *Listeria* と *Salmonella* の risk 比較

<i>Listeria</i>	米	Phi	MX	チリ	タイ	ECA	豪	Kr	台	SA	NZ	中国	Peru	仏	Br	VN
Hazard	12	12	14	12	12	12	12	12	12	12	12	12	13	14	12	12
NFCS	10.5	14	12	11	12	13	9.5	10.5	11.5	9.5	8.5	12	10	9	12	12
Food	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total	1260	1512	1512	1188	1296	1404	912	1008	1104	912	816	1152	1040	1008	1152	1152

<i>Salmonella</i>	米	Phi	MX	チリ	タイ	ECA	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	10.5	14	12	11	12	12	9.5	10.5	11.5	8.5	8.5	12	10	9	12	12
Food	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Total	1470	1764	1728	1386	1512	1512	1064	1176	1288	952	952	1440	1120	1008	1344	1440



表 16 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 <sup>8</sup> M:10 <sup>8</sup> -10 <sup>6</sup> L:<10 <sup>6</sup>	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 <sup>^-3</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Severity (DALYs)	H:>10 <sup>6</sup> M:10 <sup>6</sup> -10 <sup>5</sup> L:<10 <sup>5</sup>	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

表 16 魚介類中の *Salmonella* のリスクランキング (続)

		中国	タイ	韓国	ネシア	Nor	米国	チリ	Myan	台湾	Phi	Ca	印	豪	Ice	NZ	仏
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	1	1	1	1	2	2	2	2	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
WHO Food Safety Core capacity	1~3	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1
ISO 22000 承認数		0.5	2	2	2	3	3	3	3	1.5	3	3	1	2	3	3	1
BRC 承認数		1	2	3	2	3	1	2	4	3	3	2	2	2	4	2	1.5
FSSC 22000 認証数		0.5	2	2	2	3	3	3	3	1.5	3	3	1	2	3	3	1
IFS 認証機関数		4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	3	3	4	4	2
民間認証平均		1.6 3	2.5	2.7 5	2.5	3.2 5	1.7 5	3	3.5	2.6 25	3	2.7 5	1.7 5	2.2 5	3.5	3	1.6 25
EU Project		3	3	1.5	3	1.5	1.5	3	3	3	3	1.5	3	1.5	3	1.5	1
小計		9.6 3	10. 5	8.2 5	9.5	8.7 5	7.2 5	12	11. 5	10. 6	13	8.2 5	8.7 5	7.7 5	10. 5	8.5	6.6 25

表 16 魚介類中の *Salmonella* のリスクランキング (続)

	中国	タイ	韓国	ネシア	Nor	米国	チリ	Myan	台湾	Phi	Ca	印	豪	Ice	NZ	仏
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
喫食頻度	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
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
日本への輸出力	3	3	3	3	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
小計	15	15	15	15	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
合計	173 3	189 0	136 1	142 5	110 2	914	168 0	161 0	133 9	182 0	115 5	147 0	977	132 3	119 0	834 .75

【注記】 表中の国名略号一覧

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



図1 モデルの概念図

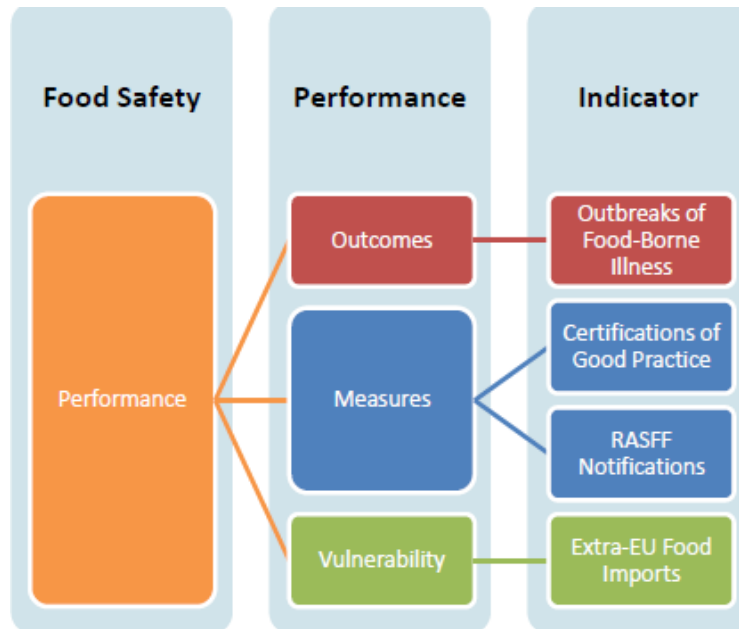


図2 performance indicator の概念図

## Outbreaks

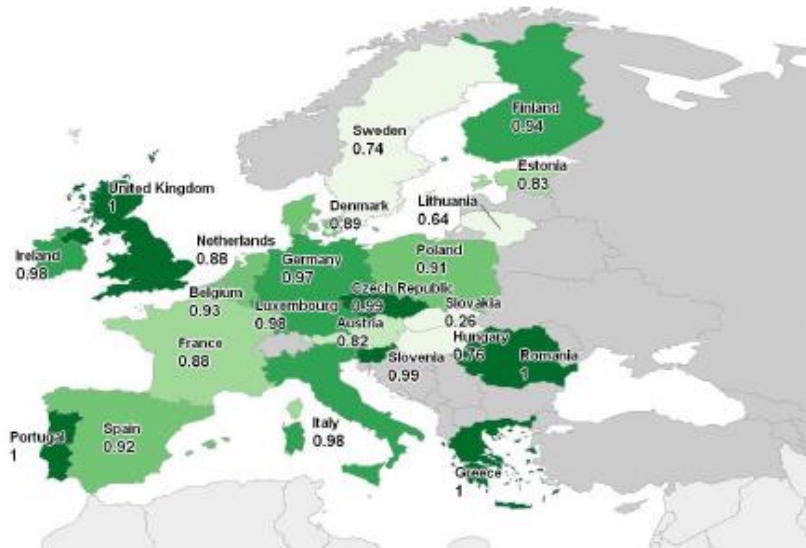


Figure 3 Number of Outbreaks of Food-Borne Illness, Reporting Rate per 100 000 Population in 2010 (Performance Score)

This map shows performance in terms of outcomes: a higher score reflects a low incidence of food-b

図3 アウトブレイク数によるランキング

## Certifications

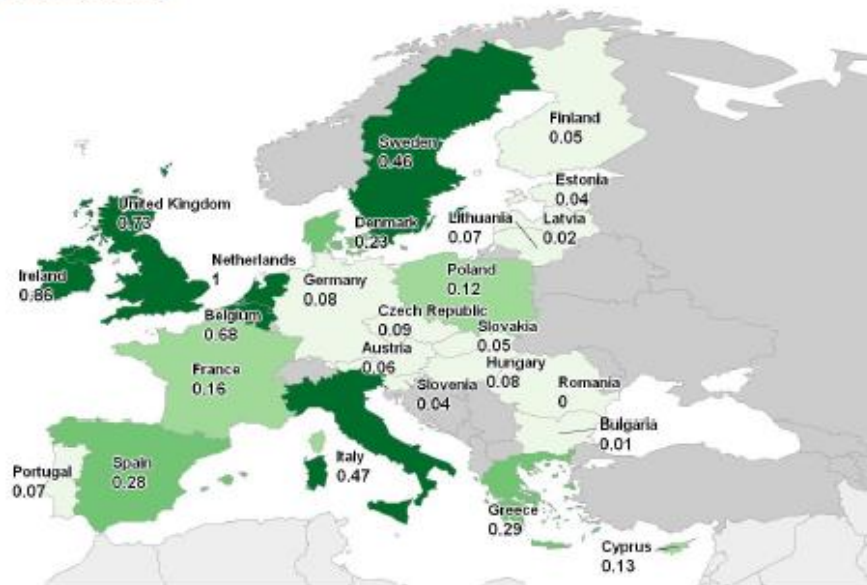


Figure 4 BRC Certifications per Food Industry (Performance Score)

図4 BRC 証明書によるランキング

## Notifications

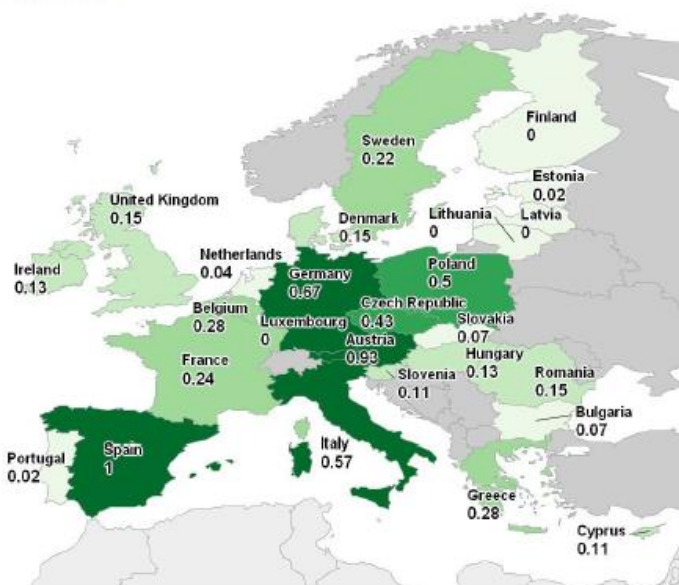


Figure 5 RASFF Follow-up Notifications (Performance Score)

図5 RASFF への通報によるランキング

## Imports

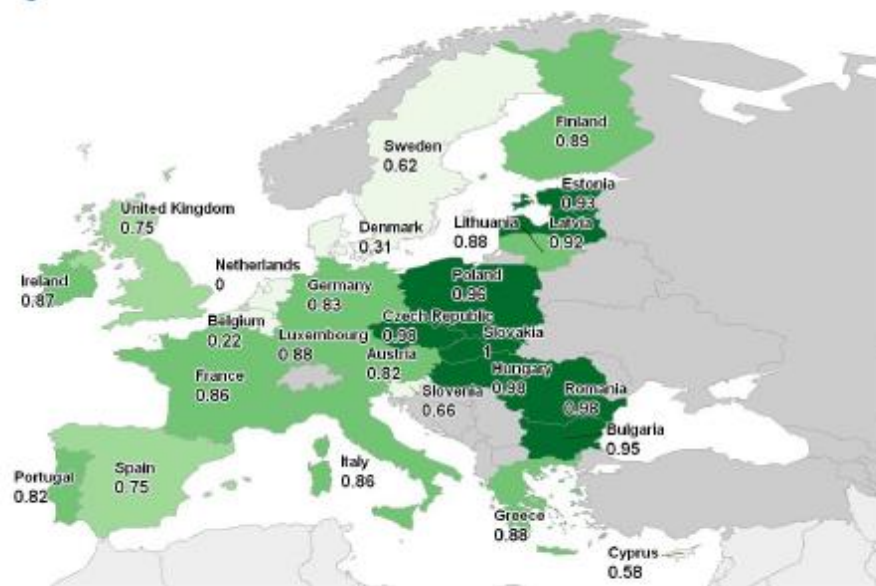


Figure 6 Food Imports from Outside the EU (Performance Score)

図6 輸入食品の割合によるランキング

## Composite Score

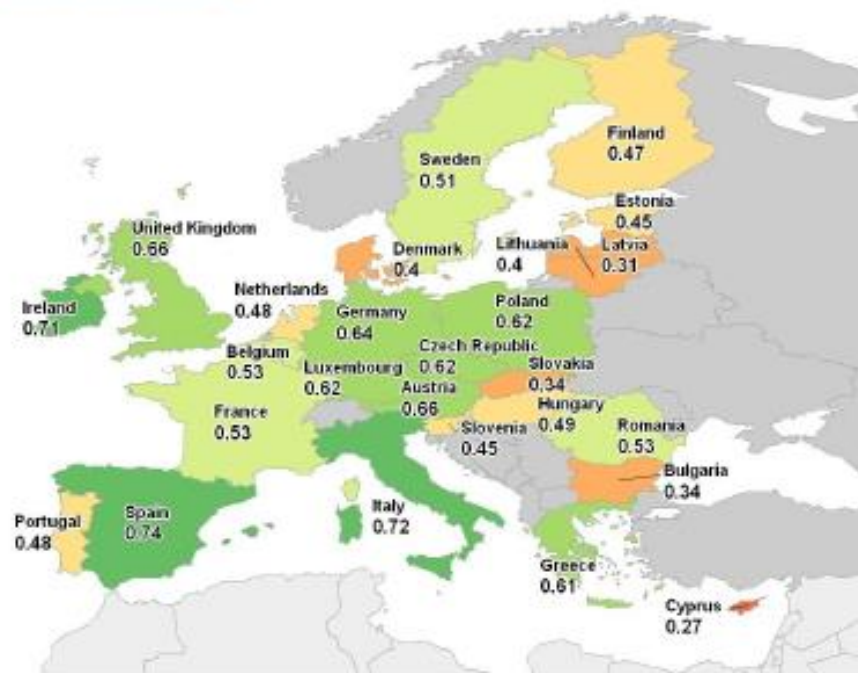


Figure 2 GeoRisQ Monitor: Member State Performance in Mitigating Food Safety Risks (Score)

図7 総合ランキング



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」  
平成 29 年度分担研究報告書

高等植物による食中毒低減のための検査法開発

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	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	坂田こずえ	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

自然毒分野においては、喫食前検査での中毒防止、および中毒発生時の原因特定のために微量の食品残渣から分析鑑別法が検査の現場から強く求められている。

有毒植物による食中毒は、形態の似ている食用植物との誤食が主な原因である。食中毒時における原因植物の迅速かつ簡便な特定を目的として、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 法を用いた有毒植物同定法の開発を行った。リアルタイム PCR の反応系を開発するにあたり、まず各植物のバーコーディング領域 *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* をデータベースおよびシーケンス解析により収集した。有毒植物とそれと誤食しやすい食用植物の配列アライメント解析から *matK* において適度に変異箇所が見られたため、*matK* に対するプライマー・プローブの設計を行った。各反応系は有毒植物と誤認しやすい食用植物や代表的な食用植物には反応性を示さず、有毒植物に対し高い特異性を示し、十分な感度を有していた。本方法により、有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便な有毒植物の同定が可能になると考えられる。

A. 研究目的

日本国内では、有毒植物を食用植物と誤認して摂取することによる食中毒事例が毎年発生している。特に、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセンは発生件数が多く、有毒植物による食中毒事例全体の約 7 割を占める<sup>1),2)</sup>。さらに、イヌサフランは近年複数の死亡事例が報告されている<sup>3)</sup>。有毒植物による食中毒事例の発生場所は、「家庭」が 7 割以上を占めて

おり、その原因は山菜採りや家庭菜園で自ら採取したり、採取した植物を知人から譲りうけたり、道の駅などで誤って販売されたりしている場合が多い<sup>1),2)</sup>。

「家庭」での発生が多い有毒植物による食中毒事例において、原因植物の特定はその後の治療法を決定する上で大変重要である。しかし、現在行われているような伝統的な植物形態学による鑑定では、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。また、有毒成分を液体クロマトグラフィー等で分析することでも鑑定は可能であるが、微量試料からの検出や前処理が困難な場合がある。一方、塩基配列解析による植物種の同定は、検出感度が高いため微量試料からでも検出が可能であるが、同定に9時間以上要し、調理や消化によってDNAが断片化された場合、同定は困難である。DNAを指標にした同定法として、PCR-RFLP法は塩基配列解析に比べて同定までの時間が短く、ある程度断片化されたDNAにも有効であるが、操作が煩雑であり、コンタミネーションの危険性を伴う。以上のことから、簡便で迅速な有毒植物の同定法が求められている。

そこで、本研究では食中毒事例が多いスイセン、バイケイソウ、チョウセンアサガオ、および死亡事例のあるイヌサフラン、トリカブトをターゲットとしてリアルタイムPCR法を用いた有毒植物同定法の開発を行った。

## B. 研究方法

### B-1. 試料

オオバギボウシ葉（苗）、ゴボウ根、ニリンソウ根はインターネットまたはスーパーマーケットから購入した。イヌサフラン葉は岐阜県保健環境研究所から分与してもらった。ニラ、スイセン、バイケイソウ、ギョウジャニンニク、チョウセンアサガオ、ヤマトリカブトのDNA溶液は昭和薬科大学 篠崎淳一先生から分与してもらった。

### B-2. DNA抽出

オオバギボウシ葉、ゴボウ根、ニリンソ

ウ根およびイヌサフラン葉 100 mg とメタルコーン（MC-0316, 安井器械）を粉碎用チューブ（ST-0350F-O, 安井器械）に入れて蓋をし、粉碎器専用ラック（TR-348FPP, 安井器械）にのせ、-80℃で20分間冷却した。冷却後、粉碎机（MULTI-BEADS SHOCKER® MB701, 安井器械）にて2,500 rpm, 30秒間粉碎した。その後、-80℃で20分間冷却し、再度粉碎机にて2,500 rpm, 30秒間粉碎した。DNA抽出はDNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用い、キットのプロトコールに従って行った。

### B-3. バーコーディング領域のシーケンス解析

表1に示すプライマー<sup>(4)-10)</sup>を参照した)を用いて、バーコーディング領域 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase L-subunit (*rbcL*), maturase K (*matK*), histidine tRNA (*trnH*) - photosystem II protein D1 (*psbA*) 間の遺伝子間領域 (*trnH-psbA*) をPCR増幅させた。反応液組成は以下の通りである。2 × KOD Fx Neo Buffer 25 μL, 2 mM each dNTP Mixture 10 μL, 50 μM FW primer 0.5 μL, 50 μM RV primer 0.5 μL, 1 U/μL KOD Fx Neo 1 μL を混合し、各植物DNA溶液 (1 ng/μL) 1 μL を添加し、蒸留水で全量 50 μL に調製した。プライマーは500 bp以上の増幅断片が生成するようなFW primer とRV primerの全ての組み合わせで試験した。反応はGeneAmp® PCR System 9700を用い、94℃で2分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、98℃, 10秒, 50℃ (*matK*) または55℃ (*rbcL* および *trnH-psbA*), 30秒, 68℃, 1分を1サイクルとして、35サイクルの増幅反応を行った。増幅産物を1%アガロースゲル電気泳動に供し、検出さ

れた主要バンドを切り出し、精製した。精製後、PCR に用いたプライマーに連結した M13f プライマーおよび M13r プライマーを用いてシーケンス解析した（表 1）。

#### B-4. リアルタイム PCR

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、ヤマトリカブトとそれと誤認しやすい食用植物の各バーコーディング領域をアライメント解析し、変異箇所が多い領域で有毒植物を検出するプライマー・プローブを設計した（表 2）。リアルタイム PCR 機器には LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を用いた。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。FastStart Universal Probe Master (Roche) 12.5  $\mu$ L, 50  $\mu$ M F primer 0.25  $\mu$ L, 50  $\mu$ M R primer 0.25  $\mu$ L, 10  $\mu$ M probe 0.5  $\mu$ L を混合し、DNA 抽出液またはブランク試料液（蒸留水）2.5  $\mu$ L を添加し、滅菌水で全量 25  $\mu$ L に調製した。反応条件は以下の通りである。95°C で 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C, 15 秒, 60°C, 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。反応は、各 DNA 抽出液あたり 2 ウェル併行して行った。

#### B-5. 反応特異性解析

リアルタイム PCR の反応特異性解析には、各有毒植物、各食用植物、イネ、コムギ、トウモロコシ、ダイズ、インゲン、エンドウ、ジャガイモ、ナス、トマト、ピーマン、コマツナ、ニンジン、ニラ、ゴボウの DNA 抽出液を用い、各食用植物では 12.5 ng/well, その他では 1 ng/well を反応液に添加した。

#### B-6. PCR 効率の算出

各有毒植物の DNA 抽出液の希釈系列を用いて、3 ウェル併行でリアルタイム PCR

を行い、DNA 量の対数値と  $C_q$  値をプロットして得られた傾きから PCR 効率を算出した。

#### B-7. 検出限界の算出

各有毒植物の DNA 抽出液を 0.01 ~ 0.2 pg/well になるように反応液に添加し、21 ウェル併行でリアルタイム PCR をを行い、95% 以上の陽性率を示した DNA 量を検出限界とした。

#### B-8. 誤食事故品への適用可否について

誤食事故品（スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン）を対象に、構築したリアルタイム PCR の検知適応について検討した。事故品は、調理残品（スイセン；卵とじ、バイケイソウ及びイヌサフラン；茹で）であった。DNA 抽出は DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) および PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用い、キットのプロトコールに従って行った。

### **C. 研究結果**

#### C-1. バーコーディング領域のアライメント解析

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、表 1 に示すプライマーを用いて PCR をを行い、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（NCBI）およびシーケンス解析によって収集した各有毒植物とそれと誤認しやすい食

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 (表 3). その結果, 全ての有毒植物において, 適度に変異箇所が見られた *matK* に対して, リアルタイム PCR に用いるプライマー・プローブの設計を行った (図 1, 表 2).

#### C-2. 反応特異性解析

C-1 にて設計したプライマー・プローブを用いてリアルタイム PCR の反応特異性の解析を行った. その結果, すべての反応系において有毒植物と誤認しやすい食用植物には反応性を示さず, 有毒植物に対し反応性を示した (図 2-6). さらに, 代表的な食用植物に対しても反応性は示さなかった

(図 2-6). また, バイケイソウ, イヌサフラン, オオバギボウシ, ギョウジャニンニクは芽生え時の形態が互いによく似ているため, これらの間での反応特異性を検討した. その結果, バイケイソウ *matK* 反応系はオオバギボウシ, ギョウジャニンニクおよびイヌサフランに反応性を示さず (図 3), イヌサフラン *matK* 反応系はオオバギボウシ, ギョウジャニンニクおよびバイケイソウに反応性を示さなかった (図 4). チョウセンアサガオについては, 同じナス科のジャガイモ, ナス, トマト, ピーマンに対して 12.5 ng/well の DNA 量でも反応性は示さなかった (図 5).

#### C-3. PCR 効率の算出

DNA 量の対数値と  $C_q$  値をプロットした結果, 全ての反応系で良好な直線性が得られた ( $R^2 = 0.9915-0.9998$ , 図 7). 各反応系の PCR 効率は, 87.5% (スイセン), 92.6% (バイケイソウ), 73.4% (イヌサフラン), 74.9% (チョウセンアサガオ), 93.7 (トリカブト) であった (図 7).

#### C-4. 検出限界の算出

各反応系の検出限界は, 0.2 pg/well (スイセン), 0.05 pg/well (バイケイソウ), 0.05 pg/well (イヌサフラン), 0.1 pg/well (チョウセンアサガオ), 0.1 pg/well (トリカブト) であった.

#### C-5. 誤食事故品への適用可否について

二通りの抽出法による DNA 試料液を調製してリアルタイム PCR で測定した. その結果, スイセン (A), バイケイソウ (B), イヌサフラン (C) と考えられた中毒事故品よりそれぞれスイセン, バイケイソウ, イヌサフランの検出が確認された (図 8). 本法は調理された検体にも適用可能と考えられた.

#### D. 考察

リアルタイム PCR による検査法は PCR-RFLP 法のように煩雑な電気泳動操作が必要ないため, 迅速かつ簡便に実施できる. また, 陽性かどうかの判定を目視ではなく装置で行うため, 判定に個人差が出ない. そこで, 有毒植物の同定法としてリアルタイム PCR を用いた方法の開発を試みた. リアルタイム PCR の反応系を開発するにあたり, まず各植物のバーコーディング領域 *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* をデータベース (NCBI) およびシーケンス解析により収集した. 有毒植物と食用植物の配列アライメント解析から *matK* において適度に変異箇所が見られたため, *matK* に対するプライマー・プローブの設計を行った. 各反応系は有毒植物と誤認しやすい食用植物や代表的な食用植物には反応性を示さず, 有毒植物に対し高い特異性を示した. 各反応系の PCR 効率は, スイセン, バイケイソ

ウ、トリカブトでは良好であったが、イヌサフラン、チョウセンアサガオでは低かった。一方、各反応系の検出限界は 0.05~0.2 pg/wel であり、十分な感度を有していた。以上の結果から、本方法は有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便に有毒植物を同定できると考えられる。

調理や消化によって DNA が断片化された試料からの検出については、松山らの報告<sup>11)</sup>では検出限界が 1~10 pg/well, 増幅断片長が 72~234 bp の反応系で消化処理試料からの検出が可能であったことが報告されている。本研究で開発した反応系は増幅断片長が 97~125 bp であることから (表 2), DNA が断片化された試料からの検出が可能であると推察される。実際に調理処理や消化処理を行った試料および DNA 精製を省略した粗抽出液試料からの検出について検証する必要があることから、誤食事故品について二通りの抽出法による DNA 試料液を供したところ、提供された事故品のすべてにおいて検知可能であった。

## E. 結論

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リアルタイム PCR 法を用いた有毒植物同定法を開発した。本方法は、標的の有毒植物に高い特異性を示し、十分な感度を有していることから、有毒植物の食中毒発生時に迅速かつ簡便に有毒植物を同定できると考えられる。

## 【参考文献】

- 1) Toda, M. et al., *Food Hyg. Saf. Sci.*, 53, 105-120 (2012).
- 2) Toda, M. et al., *Food Hyg. Saf. Sci.*, 55,

55-63 (2014).

- 3) 塩見ら：自然毒のリスクプロファイル.  
[http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/poison/index.html)
- 4) Kress, W. J. et al., *PLoS ONE*, **2**, e508 (2007).
- 5) Fay, M. F. et al., *Kew Bull.*, **52**, 111-120 (1997).
- 6) Fay, M. F. et al., *Taxon*, **47**, 43-50 (1998).
- 7) Johnson L.A. et al., *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **82**, 149-175 (1995).
- 8) Hamilton, M. B. et al., *Mol. Ecol.*, **8**, 513-525 (1999).
- 9) Tate, J. A. et al., *Syst. Bot.*, **28**, 723-737 (2003).
- 10) Sang, T. et al., *Am. J. Bot.*, **84**, 1120-1136 (1997).
- 11) Matsuyama, S. et al., *Int. J. Legal Med.*, **125**, 211-217 (2011).

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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* 7: 14942, DOI: 10.1038/s41598-017-14466-x, 2017

2. 学会発表

- 1) 坂田こずえ、野口秋雄、加藤怜子、篠崎淳一、紺野勝弘、近藤一成：有毒植物のリアルタイム PCR を用いた検知法について. 第回 日本食品衛生学会学術講演会（東京）2017 年 11 月
- 2) 坂田こずえ、野口秋雄、加藤怜子、篠崎淳一、紺野勝弘、近藤一成：リアルタイム PCR 法による有毒植物の検出法開発. 第回 全国衛生化学技術協議会年会（奈良）2017 年 11 月
3. その他  
国立保健医療科学院平成 29 年度短期

研修「きのこの食中毒」，食品衛生危機管理研修，平成 29 年 10 月 18 日

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 バーコーディング領域のシーケンス解析に使用したプライマー

primer name	sequence (5'-3') <sup>a</sup>	direction	reference
rbcL			
rbcLa_F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	FW	4)
rbcL-627F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> CATTTATGCGCTGGAGAGACCG	FW	this study
rbcL-724R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> TCGCATGTACCTGCAGTAGC	RV	5)
rbcL-1291R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> AGCAAGATCACGTCCTTCATTACG	RV	this study
rbcL-1460R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	RV	6)
matK			
trnK-710F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> GTATCGCACTATGTWTCATTTGA	FW	7)
matK-1f+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> ATGGAAGAATTACAAGGATATTGA	FW	this study
matK-1412F+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> ATATAATTCTTATGTATGTGAAT	FW	7)
matK-1506R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> TTCCATAGAAATATATTCG	RV	7)
matK-1513r+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> ATAATATCCAAATACCAAATACG	RV	this study
trnK-2R+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> AACTAGTCGGATGGAGTAG	RV	7)
trnH-psbA			
trnH(GUG)+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> ACTGCCTTGATCCACTTGGC	FW	8)
trnH2+M13f	<u>TGTA AACGACGGCCAGT</u> CGCGCATGGTGGATTACAAATCC	FW	9)
psbA+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> CGAAGCTCCATCTACCAATGG	RV	8)
psbAF+M13r	<u>TCAGGAAACAGCTATGACT</u> GTTATGCATGAACGTAATGCTC	RV	10)

<sup>a</sup> 下線はプライマーに連結した M13f および M13r プライマーの相補配列を示す。

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー・プローブ

primer name	sequence (5'-3')	amplicon size (bp)
Narcissus		
Narcissus_matK-F1	CTTTTGGAACCTTTCTTGAACGAACAC	125
Narcissus_matK-R1	GAAAGGATCTTTGAAGAACCAGGAG	
Narcissus_matK-P1	FAM-TCCTATGAAAATCGTTACGA-MGB	
Veratrum		
Veratrum_matK-F1	CGCAATGTTTTGAAAAGATTAGGTTCGA	119
Veratrum_matK-R1	GATCCATGTAAAGTAAAGGAAAAAGGGT	
Veratrum_matK-P1	FAM-TTGATCTTCGCGCAAACA-MGB	
Colchicum		
Colchicum_matK-F2	CAGGATCCATATCAACCAATTAAAAAACC	97
Colchicum_matK-R2	CATTTTGTTTTGACCGCCAAGGG	
Colchicum_matK-P2	FAM-TCCTTTTGGGGGGATATTT-MGB	
Datura		
Datura_matK-F6	GAGGGATTTCCATTTATTI <sup>a</sup> TGGAAATG	122
Datura_matK-R6-2	GGAAATGTTGAATGAATTGATCGGAAG	
Datura_matK-P6	FAM-TATCTTCTTTTGAAGGC-MGB	
Aconitum		
Aconitum_matK-F1	ATCACTGGCTAAATCGAAATTTTGTA	100
Aconitum_matK-R1	ACCAAATCTATCGATAATATCAGAATCG	
Aconitum_matK-P1	FAM-CCATCAGTAAGCCGACTTGGGCCG-BHQ1	

<sup>a</sup> I はデオキシイノシンを示す。

表 3 本研究で収集した有毒植物と食用植物の rbcL, matK および trnH-psbA の配列

和名		学名	rbcL		matK		trnH-psbA	
			length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.	length (bp)	Acc. No.
食	ニラ	<i>Allium tuberosum</i>	1,434	JN969266	1,552	this study	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 maackii</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	-	-
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>	1,440	NC_030064	1,551	NC_030064	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 bornmuelleri</i>	1,356	KC796865	1,532	JN417406	439	JF934161
食	ゴボウ	<i>Arctium lappa</i>	1,400	KM360645	1,490	AY013520 + JN895220	478	AB727572
毒	チョウセンアサガオ	<i>Datura metel</i>	1,513	this study	1,824	this study	468	JX467620
毒	ケチョウセンアサガオ	<i>Datura innoxia</i>	1,264	JX996059	932	EF438895	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	-	-
食	イチリンソウ属	<i>Anemone americana</i>	1,428	EU053901	1,161	AF542590	375	KP643346
食	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 jalense</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



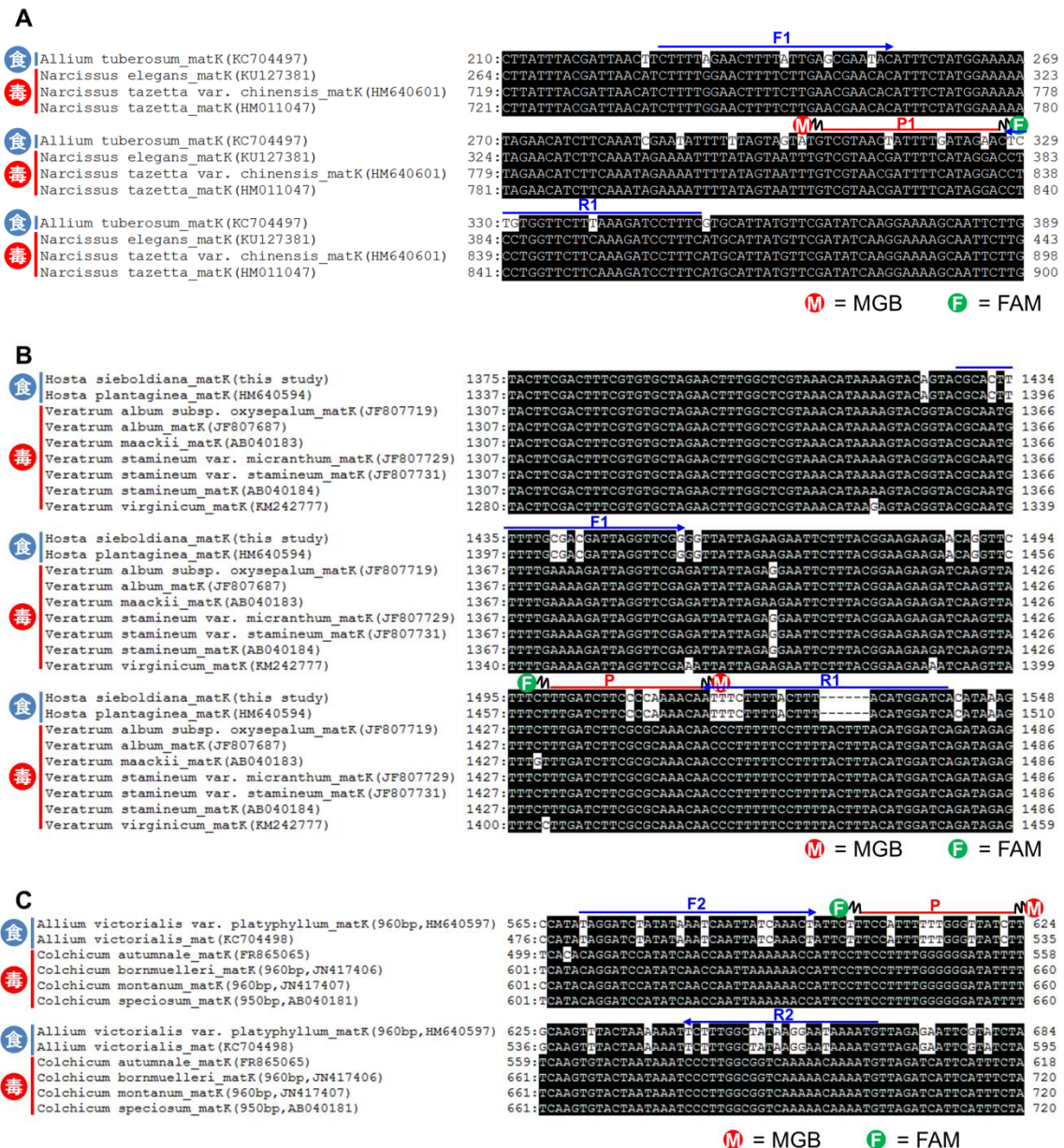


図1 各有毒植物とそれと誤認しやすい食用植物の matK の配列アライメント解析

(A) ニラとスイセン matK の配列アライメント解析結果. (B) ギボウシとバイケイソウ matK の配列アライメント解析結果. (C) ギョウジャニンニクとイヌサフラン matK の配列アライメント解析結果. 青字矢印, リアルタイム PCR に用いたプライマー配列. 赤線, リアルタイム PCR に用いたプローブ配列.

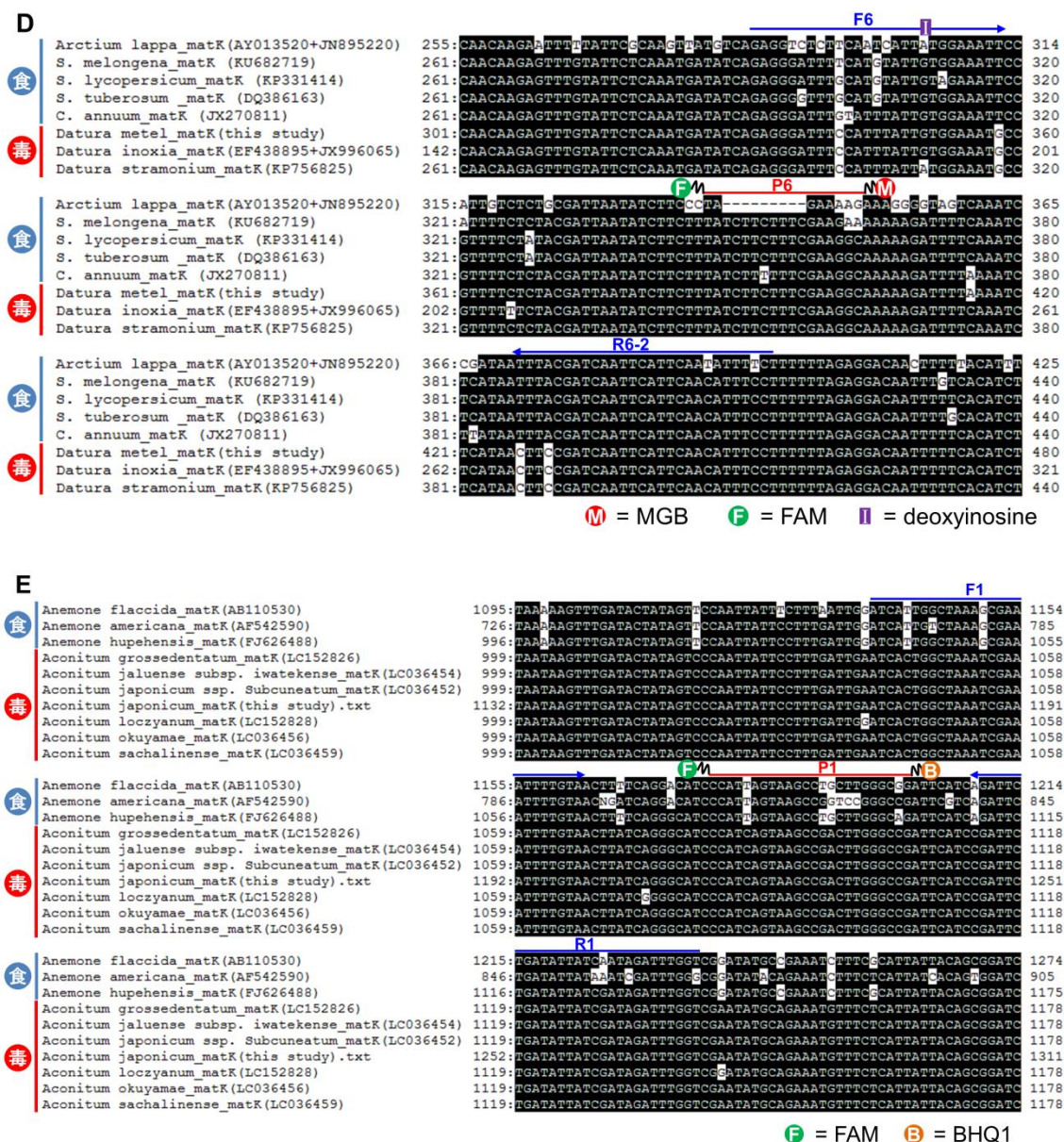


図1 各有毒植物とそれと誤認しやすい食用植物の matK の配列アライメント解析(続き)

(D) ゴボウとチョウセンアサガオ matK の配列アライメント解析結果. (E) ニリンソウとトリカブト matK の配列アライメント解析結果. 青字矢印, リアルタイム PCR に用いたプライマー配列. 赤線, リアルタイム PCR に用いたプローブ配列.



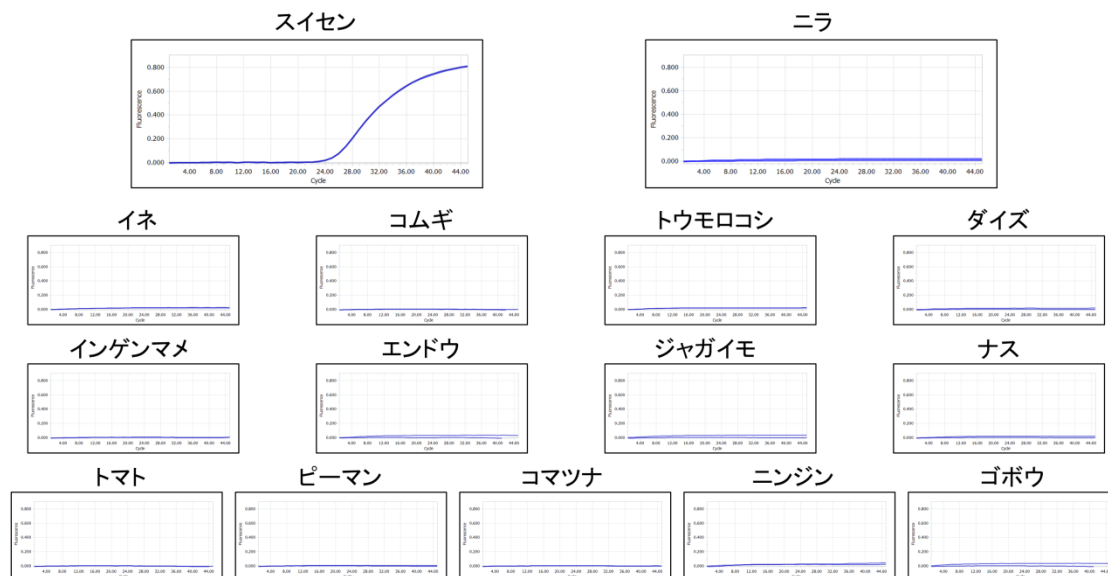


図2 スイセン matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ニラは 12.5 ng/well，その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

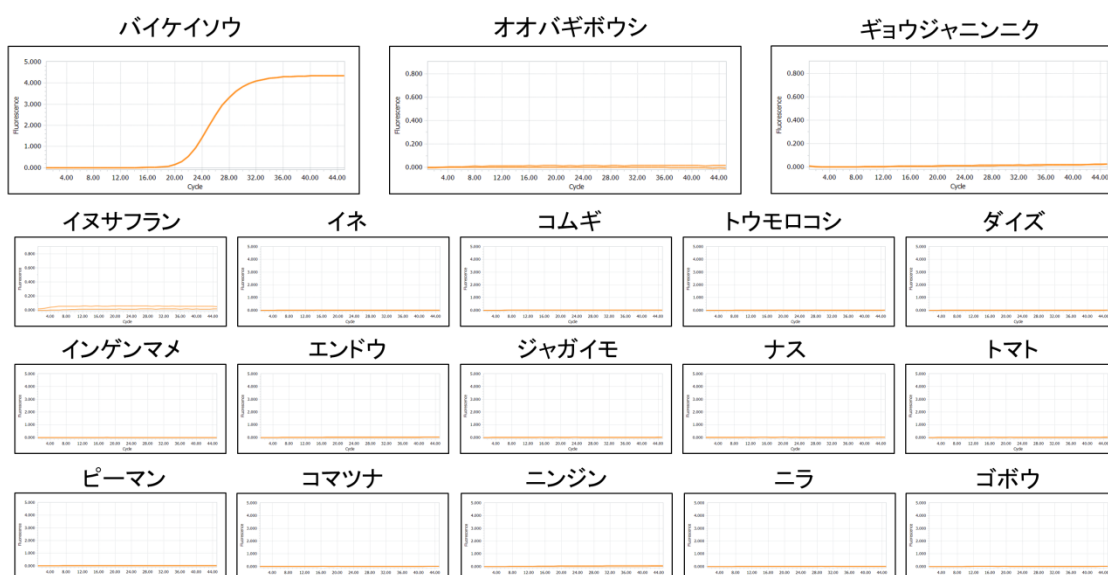


図3 バイケイソウ matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。オオバギボウシ，ギョウジャニンニク，イヌサフランは 12.5 ng/well，その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。



図4 イヌサフラン matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ギョウジャニンニク，オオバギボウシ，バイケイソウは 12.5 ng/well，その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

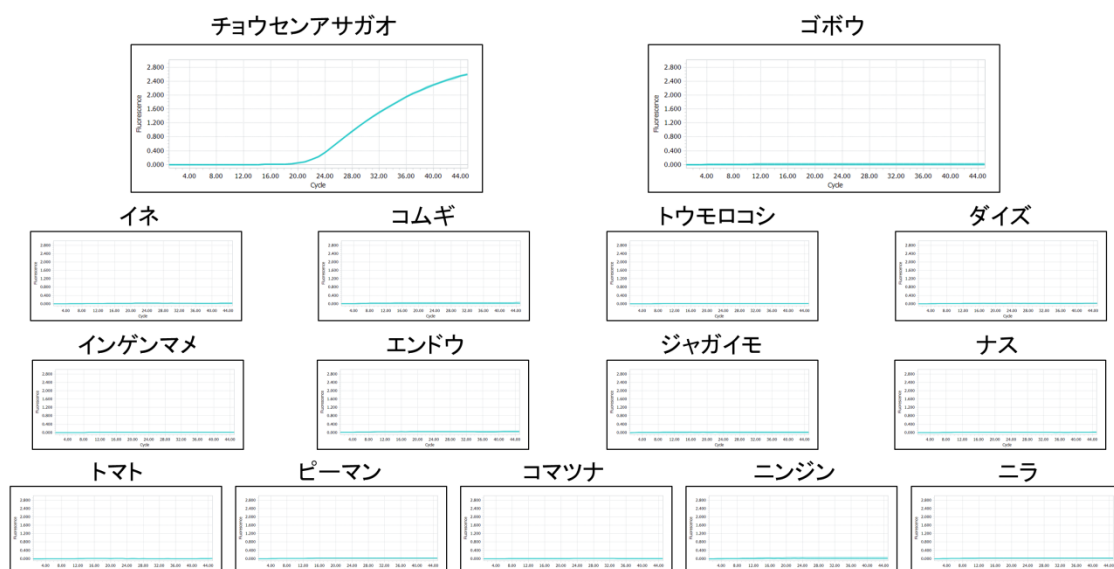


図5 チョウセンアサガオ matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した。ゴボウ，ジャガイモ，ナス，トマト，ピーマンは 12.5 ng/well，その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った。

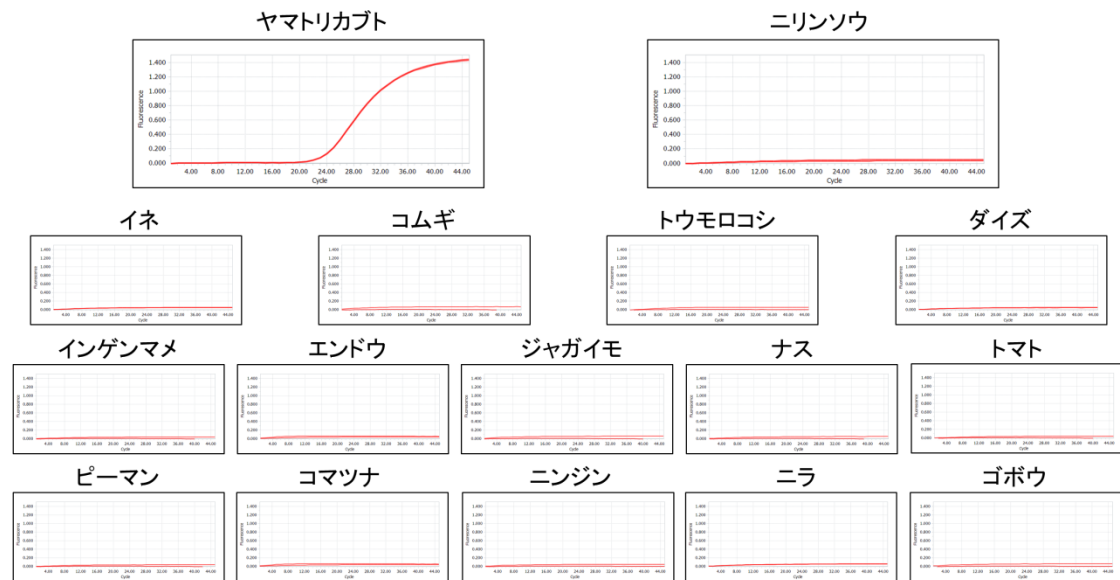


図6 トリカブト matK 反応系の反応特異性

各植物 DNA に対するリアルタイム PCR の増幅曲線を示した．ニリンソウは 12.5 ng/well, その他の植物は 1 ng/well の DNA 量にて反応を行った．

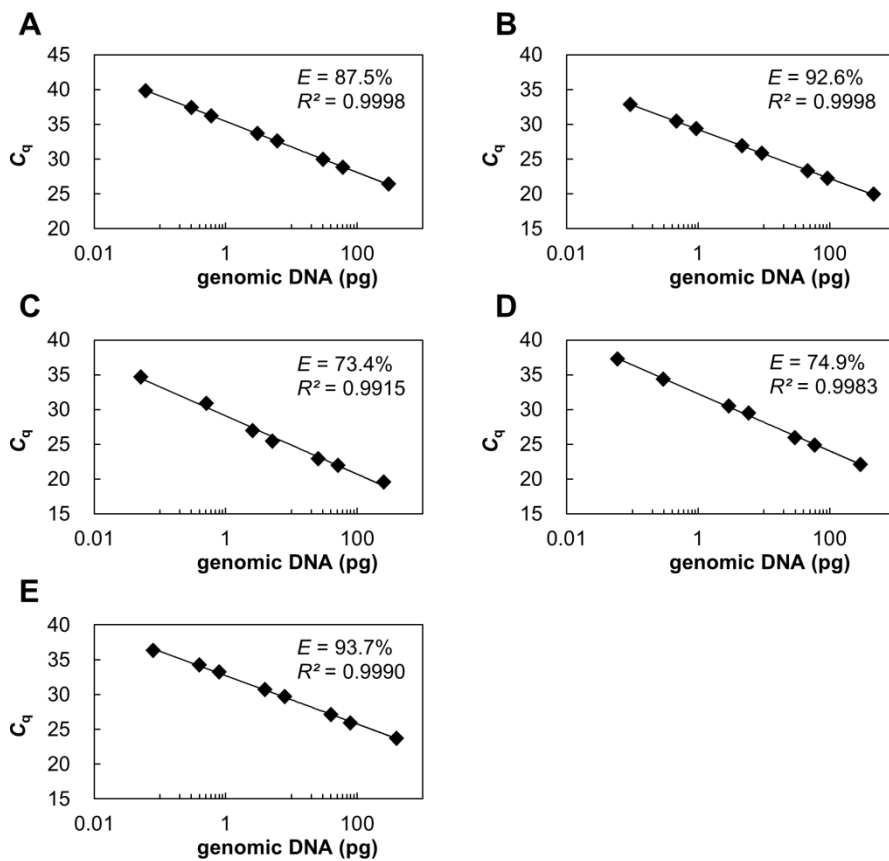


図7 各反応系のPCR効率

横軸に各有毒植物のDNA量の対数値、縦軸に $C_q$ 値をプロットした。(A) スイセン、(B) バイケイソウ、(C) イヌサフラン、(D) チョウセンアサガオ、(E) トリカブト matK 反応系のプロット図。E, PCR 効率。

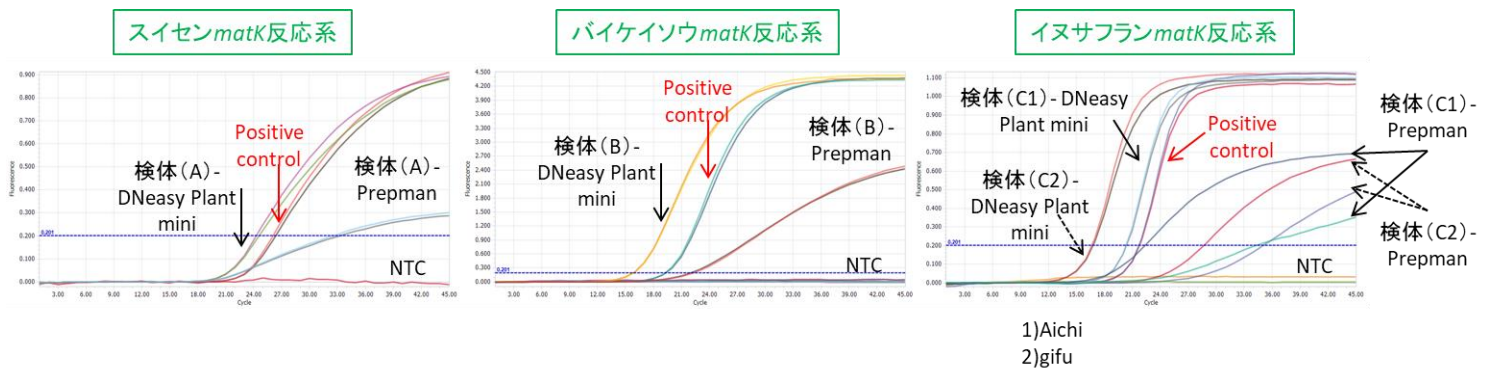


図8 誤食事故品への適用可否について

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」  
平成 29 年度分担研究報告書

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 昭和薬科大学薬用植物資源研究室  
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発生件数は、例年より若干少ないが、イヌサフランでの死亡例、およびキョウチクトウでの中毒事例が特記される。
- 2) 有毒植物の遺伝子鑑別法の実験条件を確立し、論文として発表予定(現在印刷中)。
- 3) 有毒きのこドクササコの種名鑑定法として、特異成分クリチジンを指標物質とした LC-MS による分析法を検討した。

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

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

C. 研究結果および考察

平成 29 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。

例年に比べ発生件数は少ないが、イヌサフランでの死亡例、キョウチクトウの事例は特記される。イヌサフランによる中毒は、近年ほぼ毎年のように発生している。特に、この 5 年間毎年のように死亡例があり、近年では最も死亡例の多い中毒となっている。キョウチクトウは、少なくとも過去 20 年間で中毒事例は報告されていなかった。しかし、高速道路の路側、中央分離帯、あるいは庭木として身近に豊富にあるので、注意が必要である。

D. 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。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。

また、過去 20 年以上事例のなかったキョウチクトウによる中毒も報告された。身近に豊富に見られる有毒植物なので、やはり注意が必要である。

## II. 有毒植物の遺伝子鑑別法

### 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・簡便な同定法を開発する。

### B. 研究方法

中毒発生件数の多い 4 種（バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセン）と、近年特に死亡例の多いイヌサフランの計 5 種を対象とし、迅速・簡便な DNA 分析法を構築する。これら有毒植物と識別すべき食用植物の組み合わせは次のとおりである：バイケイソウ類とギボウシ類およびギョウジャニンニク；チョウセンアサガオ類とゴボウ；トリカブトとニリンソウ；スイセンとニラ；イヌサフランとギョウジャニンニク。

有毒植物と食用植物とを識別するために PCR-RFLP 法を用いた。PCR-RFLP 法は、初めに識別したい植物の特定の DNA 領域を共通のプライマー対を用いて PCR 法で

増幅する。次にそれぞれの PCR 産物を種特異的な塩基配列を認識する制限酵素で処理し、生成する DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、DNA 切断の有無を検出する。DNA 領域としては、*rbcL* 遺伝子または *matK* 遺伝子の一部とした。両遺伝子は中程度の識別能を有することが知られているので、同一種間の個体差による影響は受けずに、比較する植物種とは明確に識別できることが期待される。実験の概要を図 1 に示す。

食中毒事例の原因サンプルは調理されたものが想定される。そのため、調理した植物試料に対しても DNA 分析が適用可能であるかを検討した。試料に対して模擬調理（10 分間の煮沸）を行った後、粗 DNA 抽出物を用いて PCR による植物識別用領域増幅を試みた。

### C. 研究結果

PCR-RFLP 法を利用した遺伝子鑑別法により、迅速・簡便な食中毒原因植物の同定法を開発した。食中毒事例の多い 4 種（バイケイソウ、チョウセンアサガオ、トリカブト、スイセン）、および、特に近年死亡例の多い 1 種（イヌサフラン）について、PCR-RFLP による鑑別法を構築した。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、4 件の食中毒の原因植物（バイケイソウ、チョウセンアサガオ、スイセン、イヌサフラン）について、本鑑別法が有効に適用できることを確認した。

### D. 考察

有毒植物の誤食による食中毒はウイルスや細菌の汚染による食中毒と比較して、発



生件数や患者数は少ないものの致死率が高いため、医療現場における初期対応がより重要となる。食中毒原因植物の同定は、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。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。

これらの結果を論文にまとめ、食品衛生学雑誌に投稿し、受理され、現在印刷中である。論文として発表され、手順が公開されれば、地方衛生研究所などの現場で活用され、食中毒の原因種を迅速・簡便にできるようになることが期待される。

### III. ドクササコの化学成分分析による種同定

#### A. 研究目的

ドクササコによる食中毒は、ツキヨタケ、クサウラベニタケ、カキシメジに次いで、きのこ中毒事例としては、4 番目に多い。

ドクササコの種同定は、現在のところ形態鑑別のみで、化学分析、あるいは遺伝子解析などの科学的方法はない。そこで、特異的含有成分を指標とした化学成分分析による同定法を開発する。

#### B. 研究方法

ドクササコに含まれる新規ピリジンヌクレオシド・クリチジンは、含有量が高く (180 mg/kg)、粗抽出物の LC-MS で、十分同定可能である。また、クリチジンは、ドクササコ特有の成分で、他のキノコ、植物、動物、菌類、いずれからも検出されていない。そこで、クリチジンを指標物質として、ドクササコ粗抽出物の LC-MS による検出・同定法を確立する。標準品として、ドクササコ抽出物からクロマトグラフィーで精製し、結晶化したクリチジンを用いる。

#### C. 研究結果

指標物質としてのクリチジンを、ドクササコから抽出・精製し、結晶として得た。新潟県新発田市にて採集したドクササコ 600 g をメタノールで抽出し、抽出物を水に対して透析。透析外液を活性炭カラムクロマトグラフィーにより精製し、クリチジンの結晶 22 mg を得た。構造は、質量分析により確認した。

予備試験として、汎用される逆相カラムを用いて、LC-MS による検出を試みた。4 カ所の違う場所 (新潟県小千谷市、富山県富山市、京都府京田辺市、長野県野尻湖) で採集した試料を、それぞれメタノールで抽出し、粗抽出物をそのまま LC カラムに注入したところ、いずれにおいてもクリチジンが主成分ピークとして明確に検出され

た。しかし、流出時間が早く、正確な同定には不適なので、より適切なカラム、分析条件を検討している。

#### D. 考察

ドクササコの化学成分分析法を確立することにより、ドクササコ中毒の原因を、よりの確に確定できることが期待される。

#### IV. 結論

- 1) 有毒植物による食中毒発生件数は、例年より若干少ないが、イヌサフランでの死亡例、およびキョウチクトウでの中毒事例が特記される。
- 2) 有毒植物の遺伝子鑑別法の実験条件を確立し、論文として発表予定(現在印刷中)。

- 3) 有毒きのこドクササコの種名鑑定法として、特異成分クリチジンを指標物質とした LC-MS による分析法を検討した。

#### V. 健康危害情報

特になし

#### VI. 研究発表

##### 論文発表

篠崎淳一，数馬恒平，佐竹元吉，近藤一成，紺野勝弘：食中毒事例の多い有毒植物の PCR-RFLP 法による鑑別，食品衛生学雑誌，2018（印刷中）

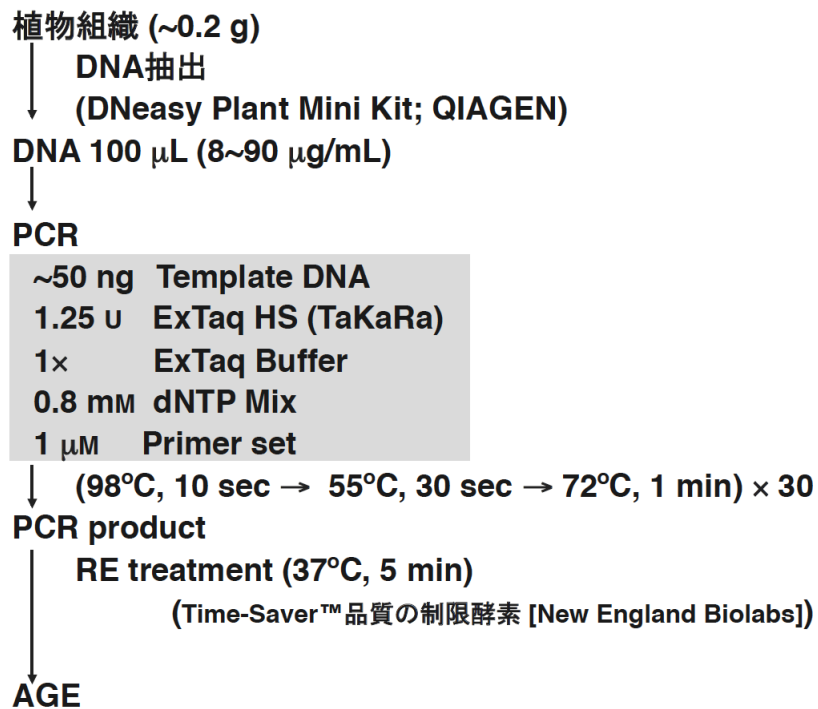
#### VII. 知的所有権取得状況

特になし

表 1. 平成 29 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
4 月 12 日	青森県	スイセン	5	5	0
5 月 16 日	長野県	スイセン	14	14	0
5 月 16 日	北海道	イヌサフラン	3	3	1
5 月 30 日	長野県	スイセン	2	2	0
6 月 14 日	埼玉県	バイケイソウ	2	2	0
7 月 1 日	愛知県	ジャガイモ	30	22	0
7 月 14 日	広島県	ジャガイモ	17	15	0
11 月 29 日	香川県	キョウチクトウ	2	2	0

図 1. PCR-RFLP 法の実験概要



厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」  
平成 29 年度分担研究報告書

## 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  
研究協力者 鈴木智宏 北海道立衛生研究所  
研究協力者 青塚圭二 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。食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、新たに設計した専用のループプライマーを併用することで、検出感度が 10 倍程度向上し、増幅時間を 60 分から 40 分に短縮することが可能となった。また、複数のきのこ試料に微量に混合したツキヨタケも検出できたことから、多種類のきのこの中から微量ツキヨタケの有無の確認法としても活用できる。クサウラベニタケにおいては、新たに設計したプライマーにより、可食きのこのウラベニホテイシメジを含む食用きのこでは増幅を示さず、国内でクサウラベニタケとされていた 3 品種のきのこに対して特異的に増幅を示す LAMP 法を開発した。

本法は、形態判別に頼らない有毒きのこ判別法であり、きのこ採取現場でも実施可能な喫食前検査として食中毒発生予防につながると期待される。

### 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している。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 月に集中しており、採取されたきのこの多くは、専門家の鑑定を受けずにそのまま自宅に持ち帰り、喫食されて食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食中毒事例について過去 10 年以上のデータを解析すると、ツキヨタケとクサウラベニタケの 2 つのきのこが多くを占める。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で、その鑑定能

力には大きな個人差があること、形態をとどめていない細分化されたものや調理された場合、さらには、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。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、遺伝子の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きのこ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。シイタケ、ヒラタケ、ムキタケなどの食用きのこは国内産（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、山形県、島根県、鳥取県、富山県、新潟県で採取した。ウラベニホテイシメジは、福島県、茨城県、鳥取県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。

### (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。

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。増幅反応には、リアルタイム濁度測定装置 LA-320C（栄研化学）、もしくは温調機能付き吸光度計 MyAbscope（カネカ）を用いた。

## C. 研究結果

### 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、一定温度での反応によって標的遺伝子を増幅・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。これまで検討してきたプライマーセットに、2 本のループプライマーを新たに設計して追加利用することで、その効果を検討した。

その結果、ループプライマーを追加して利用することにより、検出限界が 105 copy から 104 copy へと 10 倍程度向上し、また各

濃度で 10 分から 20 分程度増幅の開始時間が早まった (図 1)。この結果より、反応時間に 60 分を要していたが、40 分でこれまでと同様の増幅結果が得られることが確認でき、さらなる判定の迅速化が可能となった。

今回、ループプライマーを追加利用することによって、検出感度が向上したことから、これまで増幅を示さなかった食用きのこに対して非特異的な反応の有無を確認した (図 2)。その結果、ループプライマーを利用しても非特異的な増幅を示さず、高いツキヨタケ選択性を維持していることを確認した。

続いて、食用きのこ混合試料に 2.5%～50%の割合でツキヨタケを含む混入試料を調製し LAMP 法を実施した結果、2.5%までの全てのツキヨタケを含む試料で増幅を確認できた (図 3)。これは、マトリックスとして含まれる多種類のきのこの中から微量のツキヨタケを判別できるということを示しているため、本法は、実際に現場で大量に採取したきのこの中からも微量のツキヨタケの有無を判定できるということである。

ツキヨタケの LAMP 法を屋外で利用することを想定して、バッテリー駆動が可能なポータブル LAMP 装置として温調機能付き吸光度計 MyAbscope を用いた (図 4)。その結果、これまでと同様の増幅を示し、本法は屋外でも実施可能であると考えられた。

MyAbscope は、簡易 DNA 抽出に必要な加熱ユニットもあるため、屋外での DNA 抽出から LAMP 法による判別まで 1 台で実施可能であることが確認でき、きのこ採取現場でのツキヨタケ判別にむけて大きく前進した。

## 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。

昨年度にクサウラベニタケ検出用に作製したプライマー (Kusa1-3) をもとに、新たにループプライマーを設計し、追加利用することで、可食きのこのウラベニホテイシメジでは増幅を示さず、各種クサウラベニタケで増幅を示すプライマーセットとなった (図 5)。

さらに、作製したクサウラベニタケ検出用 LAMP 法プライマーセットにより、食用きのこの非特異的な反応の有無を確認した結果、非特異的な増幅を示さず、高いクサウラベニタケ選択性を有していることを確認した (図 6)。

本法は、ウラベニホテイシメジと誤認して、食中毒を引き起こす国産クサウラベニタケ各種を迅速簡便に見分ける方法である。今後は検出限界を明らかにし、適正な測定条件を確立することで、クサウラベニタケの喫食前診断の実現に向けて検討を重ねていく。

## **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

ループプライマーを新たに追加したツキヨタケ検出用 LAMP 法は、検出感度および増幅開始速度ともに向上が認められ、シイ

タケ、ヒラタケ、ムキタケを含む多数の食用きのこ交差せずにツキヨタケだけを検出可能であった。また、複数のきのこ混合試料中にわずかに混入したツキヨタケも検出できたことから、多種類のきのこの中から微量のツキヨタケの有無を確認する方法としても活用できる。さらに、ポータブル LAMP 装置の利用により、DNA 抽出から LAMP 法によるツキヨタケの判定まで屋外で実施可能であった。本研究の成果をツキヨタケの喫食前診断に活用することで、ツキヨタケによる食中毒の発生の低減に向けて大いに役立つと期待される。

#### 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を対象とした LAMP 法も、新たに設計したループプライマーの利用で各種クサウラベニタケを選択的に検出可能になった。本法は、同じ *Entoloma* 属で形態的にも非常に似ている国産クサウラベニタケとウラベニホテイシメジを、迅速簡便に見分けることができる方法であることから、クサウラベニタケの喫食前診断の実用化へ向けて大きく前進したと考えられる。

#### **E. 健康危害情報**

なし

#### **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、

食品衛生学雑誌、Vol.58, No.3, p113-123, 2017

##### 2. 学会発表

- 1) 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、青塚圭二、佐藤正幸、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコ迅速判別法の構築、第 54 回 全国衛生化学技術協議会年会、奈良、2017 年 11 月
- 2) 菅野陽平、青塚圭二、坂田こずえ、中村公亮、鈴木智宏、近藤一成：LAMP 法を用いた有毒キノコの迅速判別法の構築 ―国内産クサウラベニタケ判別法の開発について―、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、兵庫、2017 年 12 月

#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

##### 1. 特許取得

なし

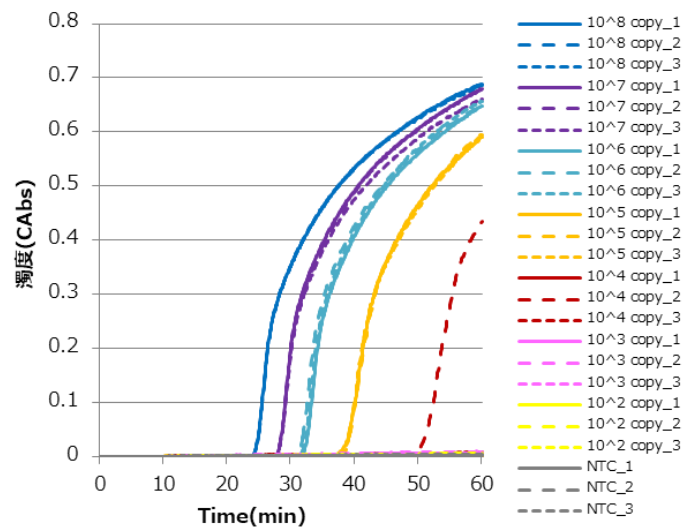
##### 2. 実用新案登録

なし

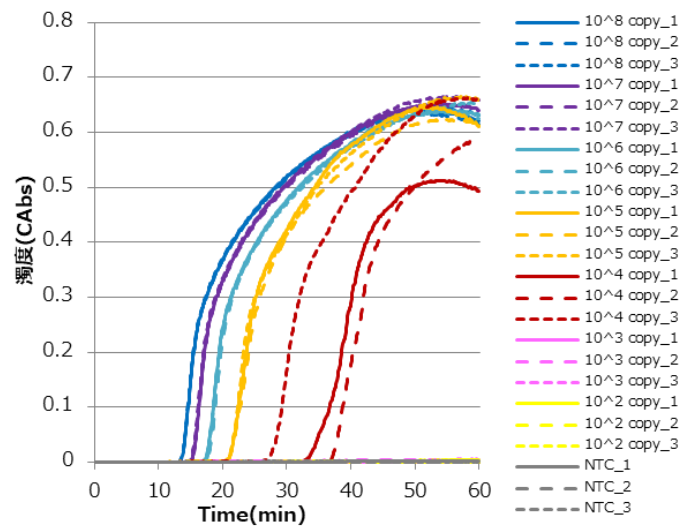
##### 3. その他

なし

### A ループプライマーなし



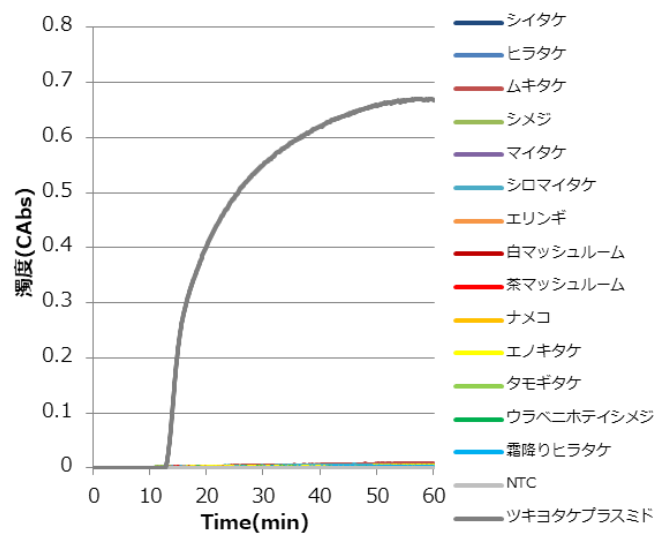
### B ループプライマー利用



**図1 ループプライマー利用によるツキヨタケ遺伝子の検出の変化**

ループプライマーの有無によりツキヨタケ検出用LAMP法の増幅の変化を確認した。ツキヨタケ陽性コントロールプラスミドの濃度を段階的に変化させ、検出限界濃度とそれぞれの増幅の開始時間を比較した。ループプライマーなし(A)に比べ、ループプライマーを利用(B)した結果、 $10^4$  copyのプラスミドまで検出可能になり、また増幅の開始時間も10分以上早くなった。





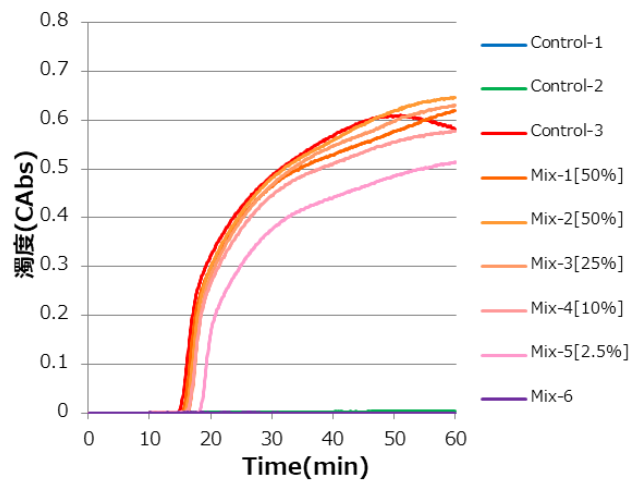
**図2 ループプライマーを利用したツキヨタケLAMP法による食用きのこの交差性の確認**

ツキヨタケが誤認されやすいシイタケ、ヒラタケ、ムキタケを含む食用きのこ(14種)を対象にループプライマーを追加利用したツキヨタケ検出用LAMP法による交差性を確認した。その結果、非特異的な増幅を示さず、ツキヨタケに対する高い特異性を有することを確認した。

### A きのご混合試料中のツキヨタケ混入率

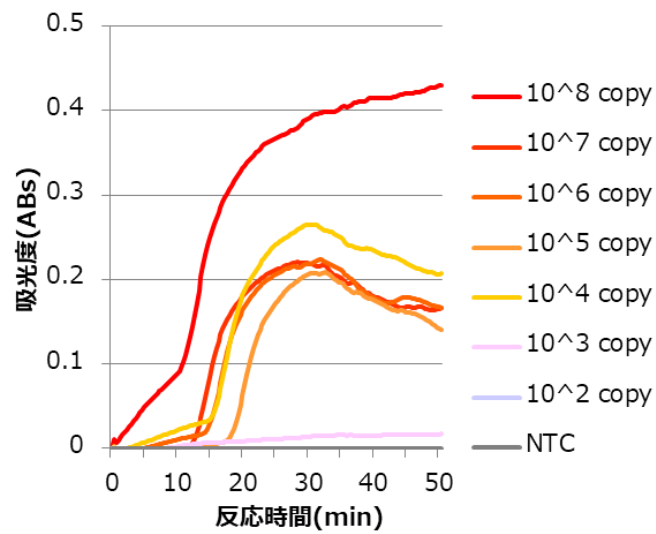
	Control-1	Control-2	Control-3	Mix-1	Mix-2	Mix-3	Mix-4	Mix-5	Mix-6
誤認キノコ (シイタケ, ヒラタケ, ムキタケ)	4000			2000		1000	1600	1900	2000
市販キノコ (シメジ, エリンギ, ナメコ, エノキ)		4000			2000	2000	2000	2000	2000
ツキヨタケ			4000	2000	2000	1000	400	100	
ツキヨタケの有無 (混入率)	-	-	+	+	+	+	+	+	-
			(100%)	(50%)	(50%)	(25%)	(10%)	(2.5%)	

### B きのご混合試料中のツキヨタケの検出



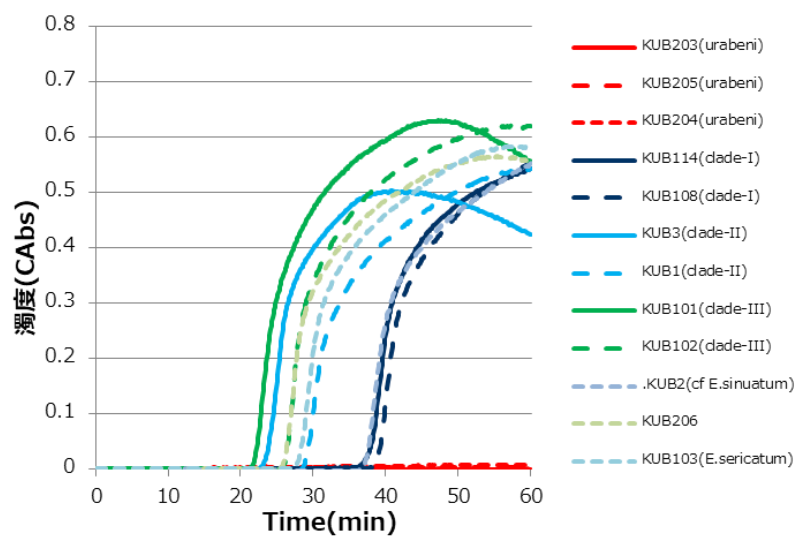
### 図3 きのご混合試料中のツキヨタケの検出

(A)食用きのご混合試料中に2.5%～50%の割合でツキヨタケを混入させたきのご混合試料を調製した。(B)きのご混合試料を対象にループプライマーを併用したツキヨタケ検出用LAMP法を実施した結果、ツキヨタケを含む試料全てで、明確な増幅を確認できた。



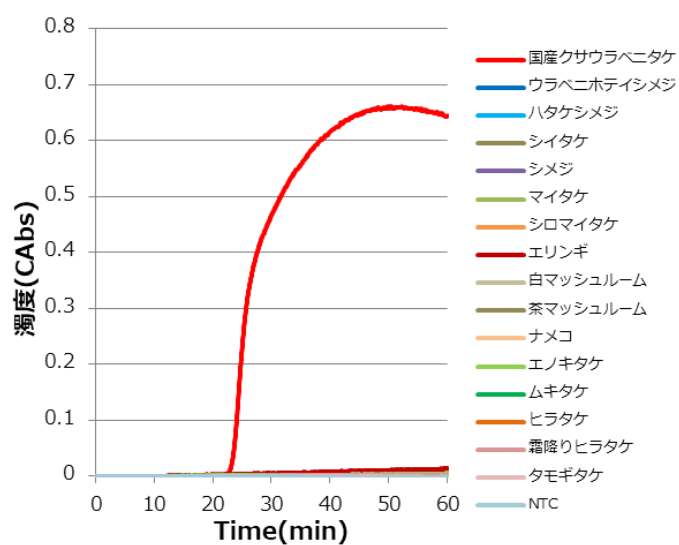
**図4 ポータブルLAMP装置によるツキヨタケの検出**

段階希釈したツキヨタケ陽性コントロールプラスミドを対象に、ポータブルLAMP装置MyAbscopeを用いてLAMP法を実施した。その結果、ループプライマーを利用することにより $10^4$  copyのプラスミドまで検出可能であり、増幅の開始時間もLA-320Cと同程度であった。



**図5 クサウラベニタケ検出用LAMP法**

クサウラベニタケ検出用に設計したループプライマーを含むプライマーでLAMP法を実施した。その結果、可食きのこのウラベニホテイシメジ(KUB203, KUB204およびKUB205)では、増幅を示さず、有毒きのこである各種クサウラベニタケで、増幅を示した。



**図6 クサウラベニタケLAMP法による食用きのこの交差性の確認**

クサウラベニタケが誤認されやすいウラボニホテイシメジおよびハタケシメジを含む食用きのこ(15種)を対象にクサウラベニタケ検出用LAMP法による交差性を確認した。その結果、非特異的な増幅を示さず、国産クサウラベニタケに対する高い特異性を有することを確認した。

研究成果の刊行に関する一覧表  
(H29 年度)

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
泉谷秀昌、森田昌知、李謙一、大西真	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	日本食品微生物学会雑誌	第 34 巻 第 2 号	90-95	2017 年
豊福肇	食品のリスク分析・評価に基づく科学的な衛生監視指導体制の現状と課題（特集 衛生監視・指導行政の現状と課題）	公衆衛生	81(8):2017.8	p.618-624	2017
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 <i>Entoloma rhodopolium</i> -related species in Japan and its identification method using PCR-RFLP	SCIENTIFIC REPORTS	7: 14942, DOI: 10.1038/s41598-017-14466-x		2017
篠崎淳一、数馬恒平、佐竹元吉、近藤一成、紺野勝弘	食中毒事例の多い有毒植物の PCR-RFLP 法による鑑別	食品衛生学雑誌	(印刷中)		2018
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	食品衛生学雑誌	Vol.58, No.3	113-123	2017