

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27～29年度 総合 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 11

2. *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 19

3. 微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集・解析

豊福 肇

山口大学共同獣医学部 25

4. 高等植物ときのこ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 53

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 59

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 65

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 71

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 27～29 年度 総合 総括研究報告書

研究代表者 近藤 一成 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部

研究要旨

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い、健康被害防止に役立てる。

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から、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、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。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。リステリアの血清型別及び PFGE 解析により、これまで散発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、散発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、原因食品の推定ができると考えられる。

自然毒関連では、有毒植物による食中毒が、スイセン（死者 1 名）、バイケイソウ、イヌサフラン（死者 5 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、国内クサウラベニタケの系統分類を行い、日本特有の新規クサウラベニタケ近縁種 3 種であることを明らかにした。野外で実行可能な有毒きのこ判別手法開発として、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。

研究分担者	泉谷 秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	豊 福 肇	山口大学共同獣医学部
	紺野 勝弘	富山大学和漢医薬学総合研究所
	菅野 洋平	北海道立衛生研究所

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。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 MLVA 法を用いた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、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命率が高い。集団事例については、欧米ではほぼ毎年発生しているが、日本国内では集団事例は国内産ナチュラルチーズの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。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して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、イヌサフラ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。特に、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

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、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

各分担報告書に記載

C. 研究結果と考察

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、それらに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検討し、入力項目を最適化するため、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

2015、2016、2017年に国立感染症研究所に送付、解析された*Shigella sonnei*はそれぞれ119、55、70株であった。うち、輸入例は134株で、主な渡航先は東南アジア66株、南アジア33株、中央・東アジア、アフリカが各11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。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。MLVA データの主成分分析から、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。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

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。散发事例の原因の推定のために、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。

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ヌサフランは、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。特徴として、必要な機器が比較的安価であること、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、分析時間が短い(90分以内)こと、結果(電気泳動像)の解釈が容易であることが挙げられる。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

簡易判別法 PCR-RFLP 法で判別できない場合などに用いる有毒植物の確定検査法としてリアルタイム PCR 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。また、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。

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、ITS 領域と RPB2 領域を用いた系統分類を詳細に行った。その結果、国内で発生するクサウラベニタケは欧州起源 *Entoloma rhodopolium* (真のクサウラベニタケ) とは異なり既存のどの *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、以下に新たに命名した; *Entoloma latcus*、*Entoloma*

subrhodopolium、*Entoloma*

pseudorhodopolium。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。

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、擬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。

クサウラベニタケ迅速検査法 LAMP 法の検討

新たに同定した日本産クサウラベニタケ近縁種は、欧州の *Entoloma rhodopolium* とは異なる 3 種検出可能な方法を、ツキヨタケ同様に検討した。その結果、ループプライマー用いることで、食用ウラベニホテイシメジでは増幅を示さず、各 3 種のクサウラベニタケ近縁種で増幅を示す方法を構築できた。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が可能と考えられた。

D. 結論

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集解析

モデルの作成および再検討・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

患者由来株と食品由来株の相関が見られるものを多く解析することで、原因食品の特定が可能になると考えられる。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。食肉製品が国内散発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

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。

・簡易遺伝子判別法

PCR-RFLP 法を構築し、中毒事例の解析に適用した。

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、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。

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

国内で発生するクサウラベニタケと考えられるきのこは、欧州起源 *Entoloma*

rhodopolium (真のクサウラベニタケ) とは異なる3つの新種であった。これらの簡易 PCR-RFLP 法および確定リアルタイム PCR 法を構築した。中毒事例にも適用した。

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

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 27～29 年度総合分担研究報告書

サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌等の細菌学的分析

研究分担者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

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。本研究では主として赤痢菌の分子疫学解析を行った。multilocus 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* に関しては、輸入例関連株の解析から 3 つの主要なグループ、並びに地域的な関係性を解析した。薬剤耐性パターンと地域性についての解析し一定の関連性を明らかにした。ゲノム解析から示されていた系統 I、II、IIIb、IIIc と MLVA データとの相関性を明らかにした。*S. flexneri* に関しては 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、そしてデータの多面的な解析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。本研究で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

【発生情報】

感染症発生動向調査では、細菌性赤痢の発生数は 2012 年 214、2013 年 143、2014 年 158、2015 年 156、2016 年 121 と推移している。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。

赤痢菌には *S. 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 FoodNet Surveillance Report によると、赤痢菌感染者数はサルモネラ、カンピロバクターに次いで第 3 位を占める。2015 年の感染者数は 2,645 名 (10 万人あたり 5.39) であり、死亡率は 0.04% であった。

欧州においても細菌性赤痢は少なからず報告されている。ECDC Annual Epidemiological Report によれば、2014 年の細菌性赤痢の患者数上位 3 国はイギリス (1,818 名)、フランス (873 名)、ドイツ (552 名) であった。

2001-2004 年のデータとして、途上国の赤痢罹患率は 1000 人あたり 0.6-7.9 であり、上記米国の 100 倍近くとなる (PLOS Med. 3(9):e353, 2006)。

先進国では食品から分離されることはほとんどないが、途上国では 10% 前後の分離率となる報告もあった。

【赤痢菌分子疫学解析-1】

これまでに当部で解析された赤痢菌は延べ約 1,800 株に上る。*S. sonnei* 輸入例で推定感染地域が示されているものは約 750 あり、MLVA でクラスター解析を行うと、大小あるが、概ね地域ごとクラスターを形成した。主な地域は東南アジア、南アジア、東アジア、アフリカ、中南米、欧州、西アジア、中央アジアの順であった。MLVA の 3 遺伝子座違いをまとめてグループ化したものを図 1 に示す。大きく 3 つのグループが観察され、それぞれ、東南アジア、南アジアが優勢のグループ、東南アジア・東アジア・アフリカの株から成るグループとなった。

ゲノム解析から示された系統 I から IV を識別する 6 か所の SNPs を簡易的に調べる SNaPshot 法を開発した。約 300 株のデータを取得し、上記 MLVA グループと比較した結果、各グループが系統 II、IIIb、IIIc に相当することが示唆された。

そこで、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 に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 2)。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。また、上記マトリクスを使うことで MLVA データから系統を推定できることが示唆された。

上記系統 IIIb のクラスターには東南アジアの株も含まれるが多くは 2013 年以後のカンボジアからの株であった。2012 年以前の同国の株は IIIc のクラスターに含まれ、

カンボジアにおける流行株のシフトが示唆された。

【赤痢菌薬剤耐性】

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 3)。

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、セフォタキシム (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 4)。

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、2) 及び国内例の年別について整理した。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) CPFEX 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。前者は広域散发例の発生によって、後者は飲食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。

【赤痢菌分子疫学解析-2】

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 5)。

【輸入食品由来株の解析】

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

- 1 Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, Do QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2016 Apr;144(6):1241-7.
- 2 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.
- 3 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

学会発表

- 1 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
- 2 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

総論

- 1 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

図 1. *S. sonnei* 輸入例株 MLVA 解析。緑、東南アジア；赤、南アジア；紫、東アジア；黄、アフリカ。

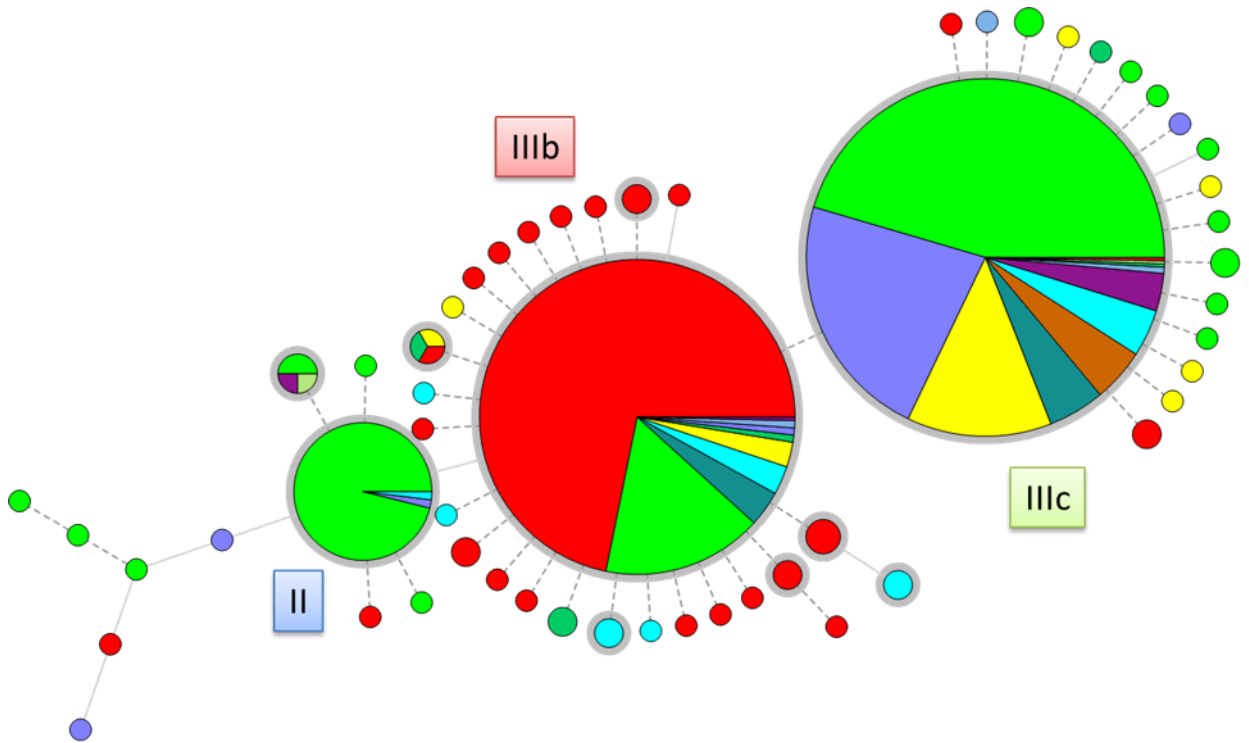


図 2. *S. sonnei* MLVA データ主成分判別分析

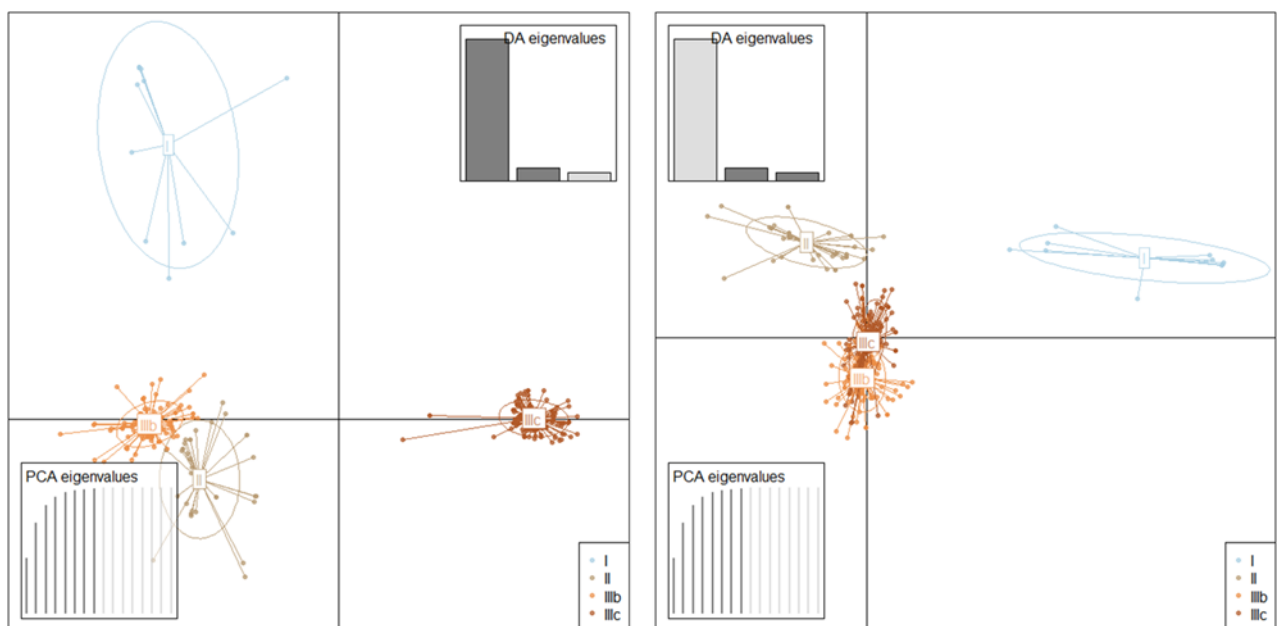


图 3. *S. sonnei* 药剂耐性分布 1 (2011-2015 年)。

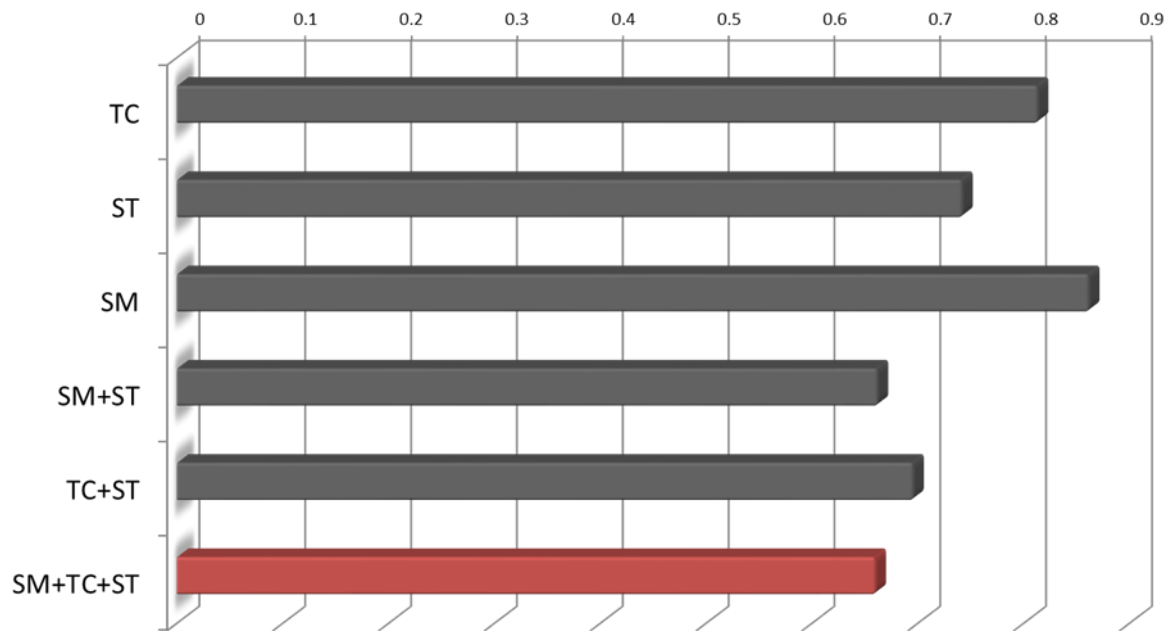


图 4. *S. sonnei* 药剂耐性分布 2 (2011-2015 年)。

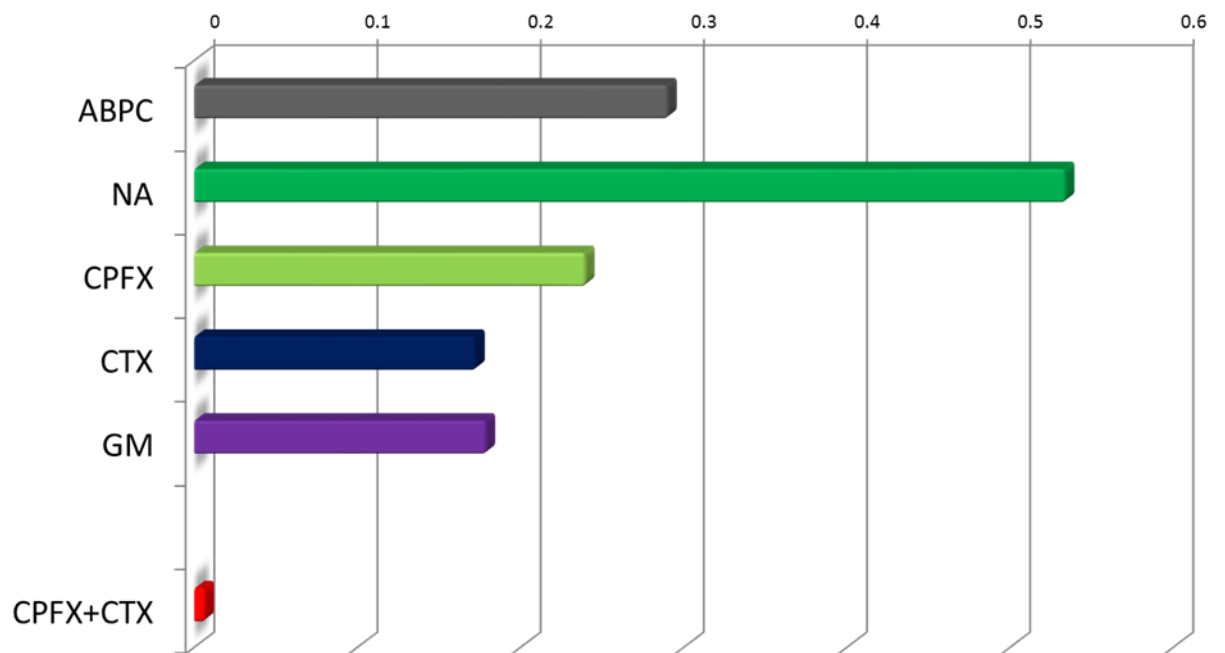
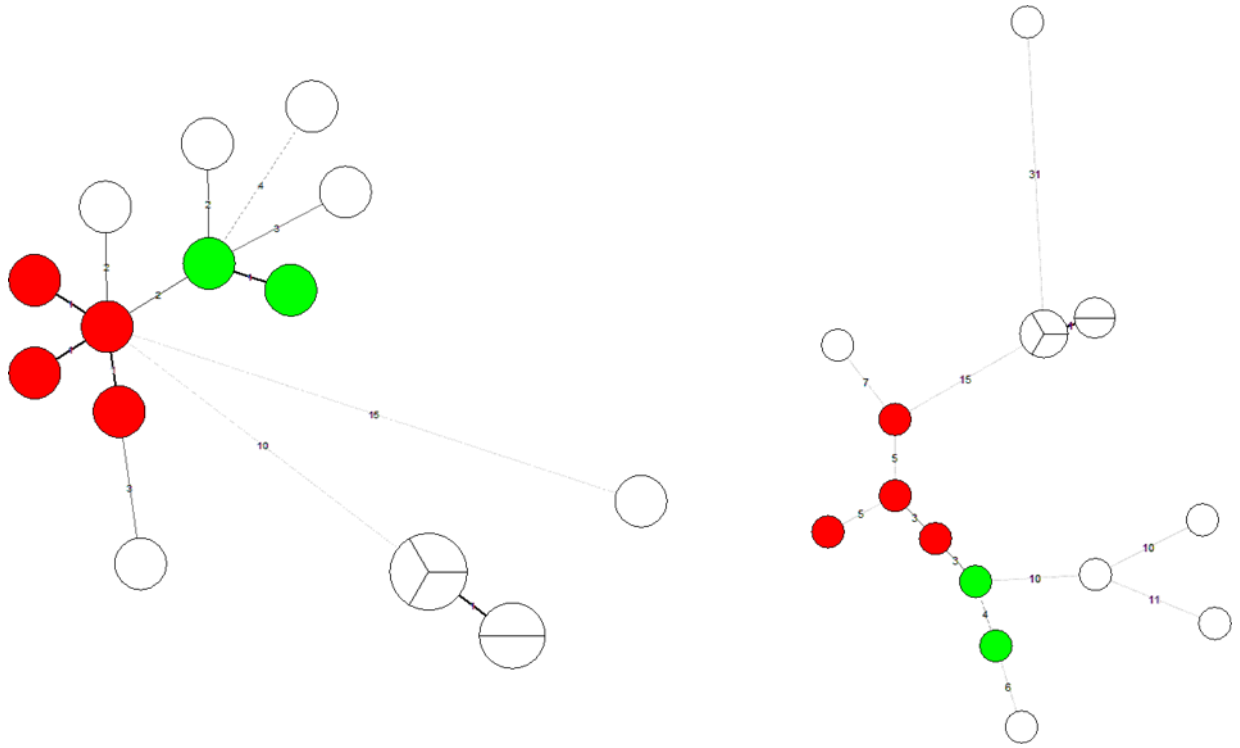


図 5. *S. flexneri* 3a MLVA-MST。左が従前の、右が 17 遺伝子座を追加したもの。色つきは single locus variant が変化した場所を表す。線上の数値は異なる遺伝子座の数を表す。



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 27～29 年度総合分担研究報告書

***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はグラム陽性芽胞非形成桿菌の *Listeria monocytogenes*（リステリア）を原因菌としており、人へは汚染食品を媒介して感染することが知られている。本菌は自然界に広く分布しており、食品原料からもしばしば分離される。また、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、ソフトチーズ、食肉製品及び野菜果物等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。また、リステリア症に限らず、発生時期や発生場所がまとまっていない **Diffuse Outbreak**（散在的集団事例）の発見には、患者由来菌株の分子疫学的解析が必須である。

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得られ、リステリア症の原因食品が推定される例も見いだされた。

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

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°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。一方、集団事例については、欧米ではほぼ毎年発生しており、そのいくつかは輸入食品に関連している。米国での近年の主な集団事例には、2014年から2015年にかけて発生したキャラメル掛けりんごを原因食品とする事例が、2015年から2016年にかけてパック詰めサラダを原因とする事例が発生したが、これらはカナダでも同じ食品による患者の発生が見られた。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)では、日本国内においても輸入された関連製品の回収とモニタリング検査の実施が行われた(生食監発0530第2号)。欧州では、イタ

リアで2015年から2016年にかけて、原因食品が同定されていないものの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、年間約200例と推定されている。現在までに日本国内では集団事例はほとんど確認されておらず、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が、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おり、高齢化や潜在的糖尿病患者数の増加により、リステリア症のハイリスク群該当者が増えるため、国内患者数が増加していくことが懸念される。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等を用いた *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（平成 29 年度報告書 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リア症集団事例に関する情報収集

諸外国において、2015 年から 2017 年に発生した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. 研究結果および考察

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 解析の結果を平成 29 年度報告書 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 (平成 29 年度報告書 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 (平成 29 年度報告書 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 (平成 29 年度報告書 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

2015 年から 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 10 例の報告が見られた (表 1)。原因食品は、乳製品が 2 例、野菜果物が 3 例、食肉製品が 1 例、水産食品が 1 例であり、2 例が不明であった。集団事例の発生国は米国が 4 例 (内 1 例はカナダでも発生)、オーストラリア、南アフリカ共和国で各 1 件、ドイツとイタリアで各 1 例、EU 圏内の複数の国で 2 例あった。

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。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発事例の原因食品となっている可能性が示唆された。また、PFGE 解析において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た。更に、平成 29 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、散発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た。

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 1）。また、EU 内での輸入食品により、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。今後の課題として、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、国内全体からの情報のデータベース化が必要と思われる。また、リステリアの分子疫学解析の国際的な進展に対応して、より深度の高い情報の集積全ゲノム塩基配列解析への移行を行い、海外発生事例と比較検討のため国際的な情報の共有が必要であると思われた。

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、これまで散発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、散発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た。

F. 研究発表

学会発表

- 1 Y Shimojima, M Ida, A Nakama, Y Nishino, R Fukui, S Kuroda, M Yoshida, A Hirai, K Sadamasu and Y Okada. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Listeria*

monocytogenes isolated in Japan.
19th International Symposium on
Problems of Listeriosis (Paris),
2016.6

- 2 岡田由美子、下島優香子、吉田麻利江、
井田美樹、百瀬愛佳、平井昭彦、泉谷
秀昌. 日本国内で分離された *Listeria*
monocytogenes の分子疫学的解析. 第
90回日本細菌学会 (仙台)、2017.3

G. 知的所有権取得状況

なし

表 1. 2015-2017 年度に海外で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	2015.8-9	ソフトチーズ	24	1
米国、カナダ	2015.5~2016.2	包装済みサラダ (アメリカ産)	33	1 (+3)
米国	2013.9~2016.7	冷凍野菜	9	1
ドイツ	2012.11~2016	1工場の複数製品 (食肉製品等) の疑い	66	3
イタリア	2015.1~2016	不明	11	1
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

微生物・ウイルス関連の食品安全情報の収集・解析

研究分担者 豊福 肇 山口大学共同獣医学部

研究要旨

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検討し、入力項目を修正、再構築を重ねて完成させた。

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

先行研究で、同様の、活用できるモデルの存在を検索したところ、農薬モニタリングのランキングで、類似モデルを発見した。農薬と微生物の違いを考え、美によるリスク及びリスク因子をモデルインプットにつ

選考モデルの枠組みは次の 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。



C. 研究結果および考察

3 要素、それぞれのデータとデータの出どころ、及びスコアを表 1～3 に示した。

ハザードについては、先進国以外の国別疫学データの入手が困難なことから、最終的に WHO の FERG 報告書 (Plos Med 12(12),e1001921) のデータをかなり用いた。

輸出国の National Food Control System（以下「NFCS」という）について、厚労省の出張報告データ、各国政府 web 講評情

報、初年度はカナダの国別ランキングデータを、2年度からは 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) のデータの活用し、さらに最終年度は民間認証数として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。

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。

また、上述した WHO の IHR の食品安全 Core Capacity (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 WHO が発表したデータを使用した。

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データを用いた。EU 以外の国については、専門家の意見で推定値を用いた。総合ではスペイン、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。

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、最終年度に 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モデルインプットに追加し、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を用いた。

以下、最終モデルの結果を示す。

表 4 に生ハム中の 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 5 にソフトチーズ中の 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。逆にスペイン、米国、英国はリスクが低かった。輸入届出数 2 位のイタリアはリスクが低下し、下位グループとほぼで、ドイツのスコアとほぼ同じ程度であった。

表 6 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 7 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、次いでフィリピンで、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、米国が低かった。届出件数の 1 番目のスイスは中程度であった。

表 8 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生ハム、ソフトチーズ、燻煙魚の順番で大きかった。フランスは生ハムでは 4 位だが、ソフトチーズでは最下位、燻煙魚も 5 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、ソフトチーズはそれぞれ 2 位、4 位（燻煙魚は届出数が少ないため対象外）、豪州はそれぞれ 3、6、3 位と安定してリスクが少ない国であった。

表 9 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 10 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

3 年間で、モデルの改良を重ねて病原菌、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 WHO IHR の食品安全コア capacity、さらには 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。WHO Core capacity は緊急時対応能力に重きをおいている可能性が考えられた。また、民間認証については、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。

最終年度は、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
- 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：これも食品ごとの汚染率は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. 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體制の現状と課題（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. 東京

G. 知的所有権取得状況

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> 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 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
BRC 認証数	BRC web より
IFS 認証機関数	IFS web より
Global GAP 認証農場数	Global GAP web より

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. 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	メ キシ コ	カナ ダ	豪 洲
Hazard												
FERG の 疾病数	H:>10 ⁸ , M:10 ⁸ -10 ⁶ . L:<10 ⁶	<i>Listeria</i> 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	<i>Listeria</i> は 0.22 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

表 4. 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
IFS 認証機関数		2	1	2	2	1	3	4	4	4	3
EU Project		1	1	3	1.5	2	2	3	1.5	1.5	1.5
小計		10	8.5	11.5	11.5	12	14	16	15.5	14.5	12.5

表 4. 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
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	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	900	765	1035	1380	1080	1134	1296	1255.5	1305	1012.5

表 5. 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 ⁸ , M:10 ⁸ -10 ⁶ . L: <10 ⁶	<i>Listeria</i> 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	<i>Listeria</i> は 0.22 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		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 5. 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 5. 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
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
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
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 6. 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 ⁸ , M:10 ⁸ - 10 ⁶ . L:<10 ⁶	<i>Listeria</i> 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	<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 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

表 6. 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 6. 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 7. 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング

			ス イ ス	英	中 国	チ リ	仏	カ ナ ダ	タイ	フ イ 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 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

表 7. 燻煙魚中の *Listeria monocytogenes* のリスクランキング (続)

		ス イス	英	中 国	チ リ	仏	カ ナ ダ	タイ	フ イ 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 7. 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 8. 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 エ ー	ス イ ス	カ ナ ダ	中	仏	タイ	フ イ 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 9. 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 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	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

表 9. 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 9. 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
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 10. 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	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

表 10. 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
IFS 認証機関数		4	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	3	3	4	4	2
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		13.5	16	14.5	15	15.5	11.5	18	19	16.5	20	14.5	13	12.5	18	14.5	9.5

表 10. 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
日本への輸出量	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	243 0	288 0	239 2.5	225 0	195 3	144 9	252 0	266 0	207 9	280 0	203 0	218 4	157 5	226 8	203 0	119 7

【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

高等植物ときのこ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 生化学部

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、形態学的な判別が困難なクサウラベニタケ、中毒事例数が常に多いツキヨタケについて、国内より広くサンプリングし、ITS 領域のほか、RPB2 領域でもシーケンス解析を行うことにより、精度を高めた分子系統樹解析を行い、海外の種と比較した。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、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 3 種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*。

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、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。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。

研究協力者 中村公亮 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
野口秋雄 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
坂田こずえ 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部

A. 研究目的

日本国内では植物性自然毒(高等植物ときのこと)による食中毒被害は毎年発生する。

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月に集中している。夏の終わりから秋にかけて、野生きのこが発生時期に重なり、多くの人々がきのこ採取を行い、多くの場合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。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。

高等植物では、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。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。「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、以上のことから、より簡便で迅速な有毒植物の同定法が求められている。

本研究班においては、H27~28年度は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 法を開発した。また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、RPB2 領域 (RNA polymerase II second largest subunit) の配列を解析した。そして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ことから、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した。H28~29 年度は、有毒植物の確定検査のために、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

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

(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。

(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°C で 20 分間冷却した。冷却後、粉砕機 (MULTI-BEADS SHOCKER® MB701, 安井器械) にて 2,500 rpm、30 秒間粉砕した。その後、 -80°C で 20 分間冷却し、再度粉砕機にて 2,500 rpm、30 秒間粉砕した。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。

(3) バーコーディング領域のシーケンス解析
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。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。

(4) リアルタイム PCR

スイセン、バイケイソウ、イヌサフラン、チヨウセンアサガオ、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。リアルタイム PCR 機器には LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を用い、反応は各 DNA 抽出液あたり 2 ウェル併行して行った。

(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、各有毒植物および各食用植物 (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 抽出液を用いた。

(6) PCR 効率、検出限界の算出

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。

また、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 を行い、95% 以上の陽性率を示した DNA 量を検出限界とした。

(7) 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 の検出適応について検討した。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

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。H27 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。H28 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 *E. 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 (初年度は、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 *E. rhodopolium* とは異なり、また近縁の *E. nidorosum* や *E. majaloides* と異なる種であること、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。以上の結果から、日本のクサウラベニタケ 3 種を新たに *E. latcus*、

E. subrhodopolium, *E. pseudorhodopolium* と命名して登録した。

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、*E. subrhodopolium*, *E. pseudorhodopolium* であることが確認されたが、一方で、*E. 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、*E. subrhodopolium*, *E. pseudorhodopolium* の2つのきのこであると判明し、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

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 (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。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。

設計したプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR は、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。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。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、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。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。

PCR 効率については、DNA 量の対数値と Cq 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 ($R^2 = 0.9915-0.9998$)。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。そして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、十分な感度を有していた。

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 試料液を供したところ、提供された事故品のすべてにおいて中毒原因植物を検知可能であった。また、粗抽出法である Prepman 抽出液では増幅効率がキット抽出より悪かった。

D. 結論

クサウラベニタケとその近縁種の ITS 及び RPB2 領域を用いた分子系統比較解析

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 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. Kondo, K., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Fukuda, N., Ishigaki, T., Nishimaki-Mogami, Rapid identification of poisonous *Entoloma rhodopolium* and edible *E. sarcopum* mushrooms using PCR-restriction

fragment length polymorphism and real-time PCR. 7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, Czech Republic, 2015 年 11 月.

2. 菅野陽平、坂田こずえ、野口秋雄、中村公亮、小林友子、福田のぞみ、佐藤正幸、青塚圭二、鈴木智宏、最上知子、手島玲子、近藤一成：ツキヨタケの PCR-RFLP を用いた迅速同定法の検討（第 2 法）：加熱、消化処理サンプルへの適用、第 110 回 日本食品衛生学会学術講演会、京都、2015 年 10 月
3. 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
4. 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 9 回 日本食品衛生学会学術講演会（東京）2017 年 11 月
5. 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 10 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

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 27～29 年度総合分担研究報告書

植物毒の毒性評価と毒成分分析・植物の遺伝子判別法開発

研究分担者 紺野 勝弘 富山大学和漢医薬学総合研究所

研究要旨

- I. 有毒植物による食中毒は、毎年 4 種程度の同じ原因種によるものが過半数を占め、それは、過去 20～30 年来続いてきた傾向と変わらない。これら数種に関する注意喚起、啓蒙が必要となる。死亡例が多発しているイヌサフランは、特に注意が必要である。
- II. 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）。
- III. 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。

研究協力者 佐竹 元吉 昭和薬科大学薬用植物資源研究室
篠崎 淳一 昭和薬科大学天然物化学研究室

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、現地でき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

平成 27～29 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。

38 件の発生件数のうち、スイセンとバイケイソウ類で計 20 件と、過半数を占める。これは、過去 20～30 年間と同じ傾向である。次に、イヌサフランとジャガイモを加えると、全体の約 8 割を占めることになり、毎年同じような原因で食中毒が発生していることがわかる。実際、これら 4 種は、毎年複数の中毒事例があり、特に、イヌサフランは死亡例も多い。ジャガイモの摂食者数、患者数が多いのは、小学校でクラス単位での中毒が起きることによる。

レンゲツツジ、キョウチクトウの事例は、実質的に初めて報告されたと言ってよい。

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。ジャガイモ中毒も、毎年発生している。小学校で、自ら栽培し食する時がほとんどで、その点教員が正しい知識を持つことが肝要となる。

E.結論

有毒植物による食中毒は、毎年 4 種程度の同じ原因種によるものが過半数を占め、それは、過去 20~30 年来続いてきた傾向と変わらない。これら数種に関する注意喚起、啓蒙が必要となる。死亡例が多発しているイヌサフランは、特に注意が必要である。

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

特になし

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。

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・簡便な有毒植物鑑別法を確立した。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。

E. 結論

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）。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

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）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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ペ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。

E. 結論

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。

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

特になし

表 1. 平成 27～29 年度に報告された有毒植物による中毒事例

原因種	件数	摂食者数	患者数	死者数
スイセン	13	59	57	1
バイケイソウ類	7	20	20	0
イヌサフラン	6	8	8	5
ジャガイモ	4	110	78	0
チョウセンアサガオ	2	5	5	0
ハシリドコロ	2	3	3	0
トリカブト	1	1	1	0
シュロソウ	1	2	2	0
レンゲツツジ	1	1	1	0
キョウチクトウ	1	2	2	0
計	38	211	177	6

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。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、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は交差せず、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、ツキヨタケが疑われる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、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、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。

クサウラベニタケの検出を目的とした LAMP 法においては、誤認されやすい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。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。

研究協力者 鈴木智宏 北海道立衛生研究所
青塚圭二 北海道立衛生研究所

A. 研究目的

日本国内では植物性自然毒（高等植物ときのこ）による食中毒被害が毎年発生している。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。国内での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手法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。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およびクサウラベニタケについて、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。簡易 DNA 抽出法と LAMP 法を組み合わせることで、2 時間以内の迅速な判定が可能となり、またポータブル LAMP 装置を使用することで採取現場での有毒きのこの食毒判定を実施することが可能となる。本法により、ツキヨタケおよびクサウラベニタケの喫食前診断が可能となれば、有毒きのこによる食中毒の発生件数を低減することが期待できる。

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. 研究結果および考察

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について検討を行った。

ツキヨタケと誤認されやすい食用きのこのシイタケ、ヒラタケおよびムキタケの ITS 領域の配列情報を比較し、ツキヨタケに特徴的な配列を認識する LAMP 法用プライマーセットを設計した。設計したプライマーセットを用いて LAMP 法を行った結果、一般的な食用きのこに対する非特異的な増幅は示さず、ツキヨタケ遺伝子でのみ増幅を示した。この結果から、作製したプライマーセットはツキヨタケに対して、高い選択性を有することが確認できた。

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 法を行った結果、ツキヨタケを含む食中毒検体でのみ増幅が確認された。さらに、これらツキヨタケ食中毒検体試料を加熱、人工胃液に浸漬処理した擬似加熱消化試料を対象に LAMP 法を実施した結果でも、加熱・消化処理の影響で増幅開始時間は少し遅延したものの同様に増幅を示した。これらの結果から、本法はツキヨタケの喫食前診断だけではなく、ツキヨタケが疑われる食中毒発生時の原因究明法としての利用も期待できる。

さらに、ツキヨタケ検出用 LAMP 法プライマーに 2 本のループプライマーを追加することで、検出感度が 10 倍程度向上し、増幅の開始時間も早くなったため、LAMP 法の反応時間を短縮可能であることが示された。また、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、ループプライマーを利用した 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。そのため、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考えられる。さらに、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。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。

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 つのグループに分類されることが明らかとなった。

RPB2 領域を対象として、可食きのこのウラベニホテイシメジでは増幅を示さず 3 種類の国産クサウラベニタケでのみ増幅を示すように 4 本の LAMP 法用プライマーと 2 本のループプライマーの合計 6 本のプライマーセットを設計した。本プライマーセットを用いた LAMP 法は、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に特異的に増幅を示すことが確認できた。

さらに、作製したプライマーセットの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。

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

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は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を含む検体についても同様に検出することが可能であった。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。さらにループプライマーを追加利用することで検出感度および増幅開始速度ともに向上した。ポータブル LAMP 装置の利用により、DNA 抽出（操作時間約 30 分）から LAMP 法によるツキヨタケの判定（反応時間約 60 分）まで屋外で実施でき、1 時間半程度での迅速な判定が可能となる。本研究成果は、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役立つと期待される。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を対象とした LAMP 法も、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、迅速かつ簡便に見分けることができることから、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. 研究発表

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、Vol.58, No.3, 2017

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 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

<p>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</p>	<p>F. 知的所有権取得状況</p>
<p>3 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</p>	<p>1 特許取得 なし 2 実用新案 なし 3 その他 なし</p>

研究成果の刊行に関する一覧表
(H27～29 年度総合)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版 年	ペー ジ
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
Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H.	Vibrio cholerae O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004.	<i>Epidemiol Infect.</i>	Nov 11	:1-7.	2015
			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 26554547.		
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.	<i>J Med Microbiol.</i>	65(9)	1007-12.	2016 Sep
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	<i>SCIENTIFI C REPORTS</i>	7: 14942, DOI: 10.1038/ s41598-017-144 66-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	113-1 23	2017