

## 食中毒解明に関わる調査・研究及びコロナウイルス検出法の検討

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部

○廣瀬 昌平

### 【はじめに】

国民が食品から被る危害として、最も身近なもののひとつが食中毒である。衛生微生物部第二室では、食品や添加物等の衛生微生物学的試験及び検査並びにこれらに必要な研究が進められている。現在、講演者は主に食中毒細菌の検査法に関する研究を進めながら、並行して地方自治体から依頼を受けて、大規模食中毒事例の原因物質の探索に従事している。一方で、新型コロナウイルスの世界的パンデミックを受けて、本ウイルスの新規検出法の開発にも携わってきた。本講演では、コロナウイルス、新興食中毒細菌 *Escherichia albertii* 及び病原大腸菌を対象としたこれまでの調査・研究内容をご紹介します。

### 【コロナウイルスの新規検出法に関する研究】

新型コロナウイルス感染症の検査法としては、リアルタイム PCR 法及びイムノクロマト法が主に用いられている。しかし、リアルタイム PCR 法では感染性を失ったウイルスの RNA を検出し、他者への感染性を有しない人も陽性判定となり、イムノクロマト法では製品によって検出感度が異なることが知られている。このため、衛生微生物部では、これら検査法の代替としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析器 (MALDI-ToF/MS) を用いた新型コロナウイルスの新規検出法の開発を目指した。ただし、新型コロナウイルスを扱う作業は実験者のリスクが高く BSL3/ABSL3 内で行う必要があるため、実験時に安全性を確保するための装備が必要で操作の煩雑さが増す。そのため、新型コロナウイルスと同じベータコロナウイルス属であり BSL2 で扱えるウシコロナウイルスを用いて、ウイルスの精製条件の検討、MALDI-ToF/MS での検出のための標的ペプチドの決定及び検

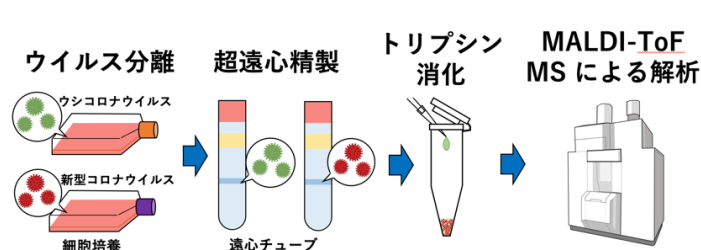


図 1 コロナウイルスの精製及び MALDI-ToF/MS による検出法

出法の感度の確認を行った。まず、ウシコロナウイルスを HRT-18G 細胞に接種して分離後、超遠心でウイルスを精製した (図 1)。精製ウイルスのコピー数をリアルタイム PCR にて算出した。MALDI サンプルプレート 1well につき精製ウイルスを  $10^6$ - $10^8$  コピー/well になるよう希釈し、トリプシン消化してウイルスタンパク質をペプチド化した後に MALDI-ToF/MS で検出を試みた。その結果、ウシコロナウイルス N タンパク質由来のシグナル強度の強い 4 つのペプチド ( $m/z$ 744、1092、1504 及び 2217) が確認されたことから、これらを MALDI-ToF/MS での検出のための標的ペプチドとした。  $m/z$  744 及び  $m/z$

出法の感度の確認を行った。まず、ウシコロナウイルスを HRT-18G 細胞に接種して分離後、超遠心でウイルスを精製した (図 1)。精製ウイルスのコピー数をリアルタイム PCR にて算出した。MALDI サンプルプレート 1well につき精製ウイルスを  $10^6$ - $10^8$  コピー/well

1504 のペプチドは  $10^6$  コピー/well まで (図 2)、 $m/z$ 1092 及び  $m/z$ 2217 のペプチドは  $10^7$

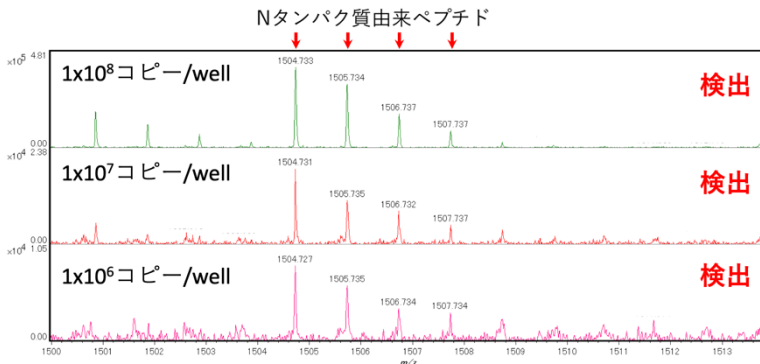


図 2 ウシコロナウイルス N タンパク質由来ペプチドの検出

コピー/well まで検出された。そのため、本検出法で  $10^6$  コピー/well のウシコロナウイルスを検出可能であると考えられた。本結果をもとに新型コロナウイルスの精製・検出法を検討し、MALDI-ToF/MS を用いた新型コロナウイルスの新規検出法を開発した<sup>1</sup>。

<sup>1</sup>Yoshinari T<sup>#</sup>, Hayashi S<sup>#</sup>, Hirose S<sup>#</sup>, *et al.*, Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry analysis for the direct detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. *Anal Chem.* 2022, 94(10): 4218-4226 (#: Equal contribution).

【*E. albertii* 食中毒における原因食品の解明に関する調査・研究】

*E. albertii* は、病原大腸菌と類似した病原因子を保有しており新興食中毒細菌として知られている。既に日本では 2003 年以降に本菌による食中毒が発生しており、2020 年 7 月にも滋賀県大津市で食中毒事例が発生した。大津市保健所の調査によって患者便及び検食 (混合品) から *E. albertii* が分離されたが、個別の検食からは分離されず、当該保健所から国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に原因食品調査が依頼された。衛生微生物部で、検体として個別検食 (9 食品) の冷凍保管品、個別検食の緩衝ペプトン水 (BPW) 培養液、検食 (混合品) の BPW 培養液、分離株として患者便からの *E. albertii* 分離株及び検食 (混合品) からの *E. albertii* 分離株を受け入れ、試験に供試した。まず、個別検食の冷凍保管品

表 1 各検体の *Escherichia albertii* 検査結果

検体名	BPW 培養液 Real-time PCR	二次増菌		分離コロニー		
		mEC Real-time PCR 分離培養	CT-mEC Real-time PCR 分離培養	Real-time PCR	Real-time PCR	
春雨中華 サラダ	+ (34)*	+ (34)*	-	+ (21)*	乳糖・白糖 非分解 コロニー	+
その他の 個別検食	-	NA	NA	NA	NA	NA
検食 (混合品)	+ (23)*	NA	NA	NA	NA	NA

\* +: 陽性 (Ct値) -: 陰性 NA:非検査

を大腸菌の増菌に広く用いられる modified EC 培地 (mEC) で増菌培養し、本菌特異的リアルタイム PCR に供試したが、すべて陰性であった。そのため、個別検食の冷凍保管品中の *E. albertii* は死滅していると考えられた。次に、大津市保健所から受け入れた個別検食の BPW 培養液を本菌特異的リアルタイム PCR に供試した結果、春雨中華サラダの BPW 培養液が *E.*

*albertii*陽性となった(表1)。そのため、春雨中華サラダのBPW培養液をmECで二次増菌培養したが、本菌は分離されなかった。そこで、他の培地での増菌を試みることにした。大阪市保健所では、患者便からセフィキシム及び亜テルル酸カリウム添加の分離平板培地を用いて*E. albertii*を分離したと報告された。そこで、セフィキシム及び亜テルル酸カリウムを添加したmEC(CT-mEC)を作製してBPW培養液の二次増菌培養を試み、その後本菌特異的リアルタイムPCRに供試した。その結果、CT-mECでの二次増菌培養液のCt値

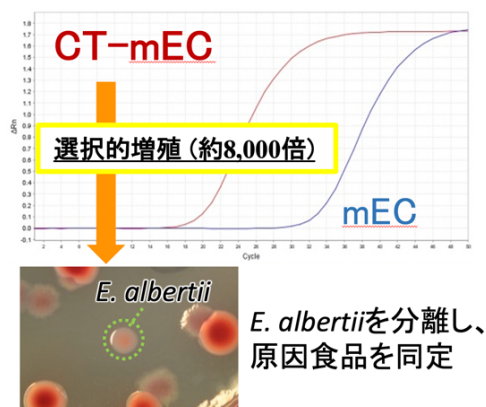


図3 セフィキシム及び亜テルル酸カリウム添加mEC(CT-mEC)中における*Escherichia albertii*の選択的増殖

はmECでの二次増菌培養液と比較して小さく、*E. albertii*がCT-mEC中でより増殖したと考えられた(図3)。このため、CT-mECの二次増菌培養液から分離を試みたところ、多数の*E. albertii*が分離された。分離株をO抗原遺伝子型別及びRandom amplified polymorphic DNA PCRによる型別に供試し、検食(混合品)由来株、患者便由来株及び春雨中華サラダ由来株が同一型であることを示した。なお、CT-mEC中では、本分離株だけでなく衛生微生物部が保有する全ての*E. albertii*菌株の増殖が抑制されず、増菌培養の際に*E. albertii*と競合する食品夾雑菌の増殖が抑制されることを明らかにし、CT-mECが*E. albertii*の選択増菌培地として有用であることを報告した<sup>2</sup>。

<sup>2</sup>Hirose S, et al., The development and evaluation of a selective enrichment for the detection of *Escherichia albertii* in food. *Foodborne Path. Dis.* 2022, 19(10):704-712.

#### 【大規模食中毒の原因物質に関する調査・研究】

2021年6月に富山市で学校給食を原因とした患者数1,800人以上の大規模食中毒が発生した。富山市保健所の調査から原因食品として牛乳が特定されたが、牛乳から主な食中毒細菌やウイルスは検出されなかったため、当該保健所から国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に原因物質調査が依頼された。そこで、食中毒の発生した学校等で保管されていた検食の牛乳(食中毒発生に関与していない6月14日提供の牛乳及び食中毒発生に関与する6月15日提供の牛乳ならびに6月16日提供の牛乳)について、衛生微生物部各室の協力のもと食中毒の原因となる毒素や細菌の調査を行った。検体の牛乳から毒素型食中毒の原因物質であるブドウ球菌エンテロトキシン、セレウス菌エンテロトキシン、ウエルシュ菌エンテロトキシン及びセレウス菌嘔吐毒(セレウリド)は検出されなかった。また、サルモネラ属菌、*Listeria monocytogenes*、*E. albertii*及び既知の病原大腸菌は検出されなかった。しか

し、食中毒発生に關与する 15 日及び 16 日提供の牛乳では、病原大腸菌用選択分離培地上に特徴のある大腸菌コロニーが多数生育した。それらの大腸菌を釣菌して分離し血清型別を行ったところ、血清型は OUT (O 血清型別不能) :H18 であり、O 抗原遺伝子型別 O-genotyping では OgGp9 であることが判明した。さらに、富山市保健所での調査時の患者検便検体の大腸菌分離用培地上のコロニーを調査した結果、多くの患者検体で牛乳から分離された株と同じ OUT (OgGp9) :H18 が培地上に優勢な大腸菌として分離され、病因物質が大腸菌 OUT (OgGp9) :H18 である可能性が考えられた。そのため、食中毒発生に關与する提供日の牛乳に加え、14 日提供牛乳及び 17 日提供予定の牛乳について OUT (OgGp9) :H18 の汚染率を調査した。その結果、6 月 15 日提供以降の牛乳が本菌株に汚染されており、16 日提供の牛乳が最も汚染率が高いことが明らかになった<sup>3</sup> (表 2)。続いて、分離された大腸菌 OUT (OgGp9) :H18 の病原性を明らかにするため、牛乳由来株及び患者由来株をマウス及びコモンマーモセットへの投与と実験に供試した。両株は、マウスへの腹腔内投与によって腸管毒素原性大腸菌よりは低い、主に実験室で用いられる大腸菌 K-12 や大腸菌 NBRC3972 よりも

表 2 牛乳パックの大腸菌 OgGp9 汚染率

給食提供日	製造日	OgGp9陽性率
6月14日 (月)	6月11日 (金)	0%
6月15日 (火)	6月14日 (月)	約50%
6月16日 (水)	6月15日 (火)	約90%
6月17日 (木) 未提供	6月16日 (水)	約30%

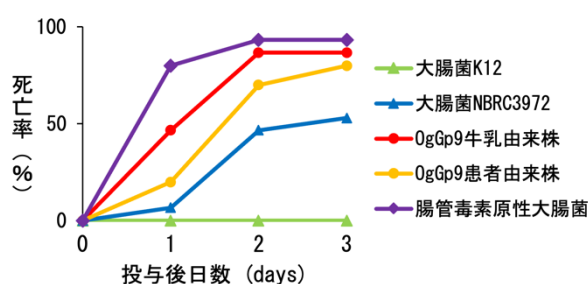


図 4 菌液腹腔内投与後のマウス死亡率

高い致死性を示し (図 4)、病原性を有していることが明らかとなった。また、コモンマーモセットへの経口投与によって、下痢の発症は観察されなかったが、投与から約 2 週間後まで糞から本菌株が検出された。そのため、本菌株が腸管への定着性を有する可能性が示された。以上から、本食中毒の原因物質を「病原大腸菌 OUT(OgGp9):H18 (疑い)」とすることが妥当と考えられた。

<sup>3</sup>廣瀬昌平ら. 富山市集団食中毒の原因食品からの原因物質調査. 病原微生物検出情報, 2022, 43(10): 235-236.

# MEMO

A series of horizontal dotted lines for writing.

## 食品・食品添加物の安全性、医薬品規制等に向けた取り組み

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部 第三室長

○西村 拓也

毒性部では、化学物質、食品、医薬品等の業務関連物質の生体影響とその毒性（有害性）評価に関連する試験研究及び実験動物の飼育管理とこれらに必要な研究を行っている。第三室では、主に食品、食品添加物、容器包装、室内空気中の有害物質に関する毒性学的試験研究を所掌とする業務を遂行している。発表者は、米国 NIH、独立行政法人医薬品医療機器総合機構を経て、本年 4 月より毒性部第三室でこれらの身近な物質の安全性に係る調査研究の取り組みを始めたところである。の中で、以下に示す研究業務内容及び今後の展望についてご紹介したい。

### 【いわゆる「培養肉」の食品衛生上の安全性に係る調査研究】

家畜や家禽から筋肉や肝細胞のような各種細胞を採取・培養し、食肉の代用品を作る細胞培養食品、いわゆる「培養肉」の研究開発が国内外で進展しており、既に海外では、2020 年にシンガポールにおいて Eat Just 社の細胞培養鶏肉を成分とするチキンナゲットが世界に先駆けて販売承認を受けた事例にみられるように家禽由来の細胞培養食品の開発が先行している状況にある。国内では市場化の目途は立っていないが、農林水産省に細胞農業研究会が発足し、培養肉普及に向けたルール作りを要望する提言がなされるなどの動きがある。

毒性部では、いわゆる「培養肉」を含む新開発食品に関するハザードやリスク、取り扱い等に関する調査研究等を実施してきており、本調査研究における現在の取り組みについて、国立衛研着任以前にプリオンに関する研究経験も踏まえつつ、ご紹介したい。

### 【既存添加物の安全性評価】

平成 7 年の食品衛生法改正の際に設定された既存添加物（平成 8 年時 489 品目、現在 357 品目収載）は、それまでの本邦における食経験をもとに使用販売が認められたものであるが、厚労省における食品添加物の安全性確保の取り組みの一環として、既存添加物の安全性についての見直し作業が進められている。具体的には、平成 8 年から「既存添加物の安全性の見直しに関する調査研究」として、国立衛研の各部諸先生方のご協力のもと、既存添加物の安全性の確認及び評価がすすめられており、現在、六十数品目についての検討を残すところとなっている。

発表者は、本調査研究に関して本年からステビア末の安全性評価として 90 日間反復投与毒性試験の実施の準備に着手している。本試験研究の概要を説明するとともに、既存添加物に特有の背景から、当該評価を遂行するにあたりいくつかの実務上の課題に直面してきており、それらの経験もご紹介したい。

### **【医薬品の規制調和に関する活動】**

医薬品の品質及び安全性確保のための評価手法等にかかる国内基盤整備と国際調和の推進は衛研のレギュラトリーサイエンスの促進にかかせない活動である。発表者は、衛研着任前に医薬品医療機器総合機構（PMDA）において、医薬品の規制調和に関する活動として小児用医薬品開発の非臨床安全性試験ガイドライン（ICH-S11 ガイドライン）の作成に携わってきたが、本年からはバイオテクノロジー応用医薬品について、医薬品の品質及び安全性確保のための評価手法等にかかる国内基盤整備と国際調和の推進のための活動に参加している。現在、これらのガイドラインには新しいモダリティの医薬品に対してどのように対応していくかという共通した課題が存在しており、その課題について紹介するとともに、当該活動に対する抱負について述べたい。

以上

# MEMO

A series of horizontal dotted lines for writing, arranged in a regular grid pattern across the page.



# 農薬の物理化学的性質に基づく食品の加工係数予測モデルの開発

国立医薬品食品衛生研究所食品部

○山崎 由貴

## 【緒言】

農産物は、生鮮食品として生で摂取されるだけでなく、その多くが加工食品として消費される。農産物中に残留する農薬は、加工食品への加工過程で残留濃度が変化する。その変化を推定する際に重要となるのが、未加工の食品における農薬の残留濃度に対する加工食品における残留濃度の割合 (加工係数; processing factor, PF) (Eq. 1) である。

$$PF = \frac{\text{Residue in processed fraction (mg/kg)}}{\text{Residue in raw agricultural commodity (mg/kg)}} \quad \dots \text{Eq. 1}$$

PF の利用目的としては、①加工食品における残留濃度から原料作物における残留濃度を推定し、原料作物が残留基準に適合しているかを評価すること、②加工食品由来の残留農薬の摂取量を推定し、残留農薬の暴露量推定を精密化することが挙げられる。PF は残留農薬のリスク管理及びリスク評価の双方において不可欠なパラメーターであり、その活用については、CODEX 委員会をはじめとして世界各国で議論がなされている。また、その重要性から、EU においては、様々な農産物とその加工食品を対象とした大規模な PF データベースの構築も試みられている。

PF は通常、加工試験により算出される。加工試験には圃場での作物栽培・農薬散布、作物の加工、作物・加工食品における残留濃度分析等が含まれ、多大な費用と時間を要する。そこで発表者らは現在、煩雑な加工試験を行うことなく、農薬の物理化学的性質に基づいて PF を予測可能な回帰モデルの構築を試みている。本発表では、PF の有用性と我が国における PF の位置付けについて述べるとともに、PF 予測モデルの開発について、その取り組みの一部を紹介したい。

## 【方法】

食品中の残留農薬のリスク評価を担う国際機関 [Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR)] が 1975-2022 年に公開した農薬の評価書及び報告書計 1,740 点を入手し、273 品目の農薬について約 45,000 件の PF データを収集した。また、物理化学的性質の異なる農薬 23 品目を農薬使用基準の 3 倍の濃度でトマトに 2 回散布し、収穫したトマトを juice 等に加工した。未加工のトマト及び各加工食品における農薬の残留濃度を LC-MS/MS で測定し、PF を算出した。農薬の物性値は、Pesticide Manual Online (British Crop Protection Council) 及び JMPR の評価書より収集した。データの解析には、Python 及び R を用いた。PF 予測モデルの構築には、正則化回帰法 Elastic net を用いた。

## 【結果・考察】

### JMPR の PF データに基づく PF 予測モデルの確立

JMPR により公開されている PF データのうち、りんご、ぶどう及びトマトの juice、wet pomace 及び dry pomace における PF と農薬の物性値の関連性について網羅的解析を行ったところ、PF と農薬の物性値の間に正又は負の相関が認められた (Fig. 1)。続いて、Elastic net により、PF を目的変数、農薬の物性値を説明変数とした回帰モデルを検討した結果、回帰式の説明力を表す決定係数  $R^2$  は 0.06-0.47 と低値を示したものの、農薬の物理化学的性質に基づいて PF 予測モデルを確立できることが示唆された。

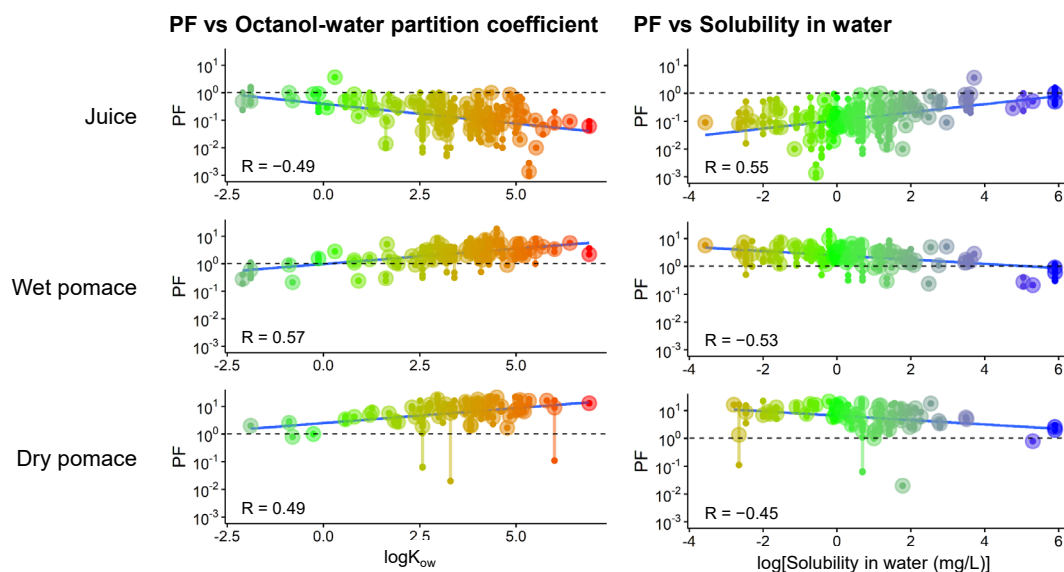


Fig. 1. りんごの加工食品における PF と水-オクタノール係数及び水への溶解度の関連性

#### トマト加工試験の PF データに基づく PF 予測モデルの確立

幅広い水-オクタノール係数及び水への溶解度を示す農薬 23 品目をトマトに散布し、juice、wet pomace 及び dry pomace に加工して PF を算出した。Juice、wet pomace 及び dry pomace における PF と農薬の物性値の関連性について検討したところ、JMPR の PF データと同様に、PF と農薬の物性値の間に有意な正又は負の相関が認められた。続いて、Elastic net により PF 予測モデルの確立を試みた結果、回帰式の決定係数  $R^2$  は最大 0.74 を示し、農薬の物理化学的性質に基づいて PF 予測モデルを確立できることが確認された。また、残留実試料を同一の加工条件下で加工することにより得られた PF データを解析に用いることで、より予測性能の高いモデルを構築できる可能性が示された。得られた PF 予測モデルの一例として、wet pomace における回帰式を Eq. 2 に示す。

$$\begin{aligned} \log PF = & 0.156 \cdot \log(\text{Octanol-water partition coefficient}) - 0.00340 \cdot \log(\text{Solubility in water}) \\ & + 0.380 \cdot \log(\text{Molecular weight}) + 0.0268 \cdot \log(\text{Henry's law constant}) \\ & - 0.00580 \cdot \log(\text{Vapor pressure}) - 0.121 \cdot \log(\text{Specific gravity}) - 0.995 \end{aligned} \quad \dots \text{Eq. 2}$$

#### 【結論】

JMPR が公表している PF データ及び本研究で行った加工試験の PF データの解析により、農薬の物理化学的性質に基づいて PF 予測モデルを確立できることが示された。本モデルを活用することにより、未だ PF が明らかでない農薬についても、煩雑な加工試験を行うことなく簡便に PF を予測できると期待される。今回の解析においては、PF データが数多く示されている代表的な農産物の加工食品を解析対象としたが、より汎用性の高いモデルを開発するためには、他の作物・加工条件等へのモデルの拡張性について検証を行う必要がある。また、諸外国で加工試験が実施されていない日本特有の加工食品について、モデルの適用可能性を検討することも重要となる。今後も PF 予測モデルのさらなる有用性評価と改良を行い、食品の安全及び食品行政における国際整合性の確保に貢献していきたい。

#### Development of a Prediction Model for Processing Factor of Pesticides

Yuki Yamasaki

Division of Food, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-44-270-6600 (ext. 1962), Fax: +81-44-270-6552

E-mail: yuki\_yamasaki@nihs.go.jp