

厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業

『 野菜などの農水産物からの汚染微生物などの
検出方法に関する調査研究 』

平成 12 年度及び3 年間（平成 10－12 年度）の研究報告書

主任研究者 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌部

目次

1. 平成 12 年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版	1
主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所	
2. 平成 12 年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書	
野菜等の農水産物からの汚染微生物の検出方法に関する調査研究	5
主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所	
3. 平成 12 年度分担研究報告書	
(I) 野菜等食品からのクリプトスポリジウム等原虫類嚢子の検出法に関する研究	11
分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所	
協力研究者 八木田健司 国立感染症研究所	
(II) 野菜等の農水産物からの汚染微生物の検出方法に関する調査研究	
細菌の検出方法に関する研究	26
分担研究者 島田 俊雄 国立感染症研究所	
1) 市販生野菜から分離され CT-SMAC 培地上で腸管出血性大腸菌 O157 とコロニー形態の類似する細菌群の検索・同定と新たな O157 選択分離培地の考案	28
協力研究者 大澤 朗 神戸大学大学院自然科学研究科	
2) レタスに実験的に接種されたサルモネラの回収方法の検討および市販野菜におけるサルモネラの汚染状況	42
協力研究者 金子 賢一 東京農工大学農学部	
3) 生野菜と果物からの腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラの検出に関する研究	51
協力研究者 宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所	
4) 生食用野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 の検出に関する研究	57
協力研究者 藤沢 倫彦、山井 志朗 神奈川県衛生研究所	
5) 堆肥有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究	77
協力研究者 上田 成子 女子栄養大学	
6) 有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子について	88
協力研究者 上田 成子 女子栄養大学	
7) PCR 法による食品および糞便中の病原性 <i>Yersinia enterocolitica</i> 検出に関する研究 ..	90
協力研究者 上田 成子 女子栄養大学	
(III) 新しいノーウォーク様ウイルス検出 EIA の開発	111
分担研究者 武田 直和 国立感染症研究所	
協力研究者 名取 克郎 国立感染症研究所	
田中 智之 堺市衛生研究所	
鎌田公仁夫 デンカ生研株式会社	

(IV) 小麦中残留マラチオンの酵素分解物の検索	117
分担研究者 外海 泰秀 国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所	
4. 平成 10-12 年度厚生科学研究費補助金総合研究報告書概要版	128
主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所	
5. 平成 10-12 年度厚生科学研究費補助金総合研究報告書	
野菜等の農水産物からの汚染微生物の検出方法に関する調査研究	132
主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所	
6. 平成 10-12 年度分担研究者総合報告書	
(I) 野菜等の農水産物からの汚染微生物等の検出方法に関する調査研究	
細菌の検出方法に関する研究	138
分担研究者 島田 俊雄 国立感染症研究所	
協力研究者 大沢 朗 神戸大学大学院自然科学研究科	
金子 賢一 東京農工大学農学部	
宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所	
上田 成子 女子栄養大学	
藤沢 倫彦、山井 志朗 神奈川県衛生研究所	
堂ヶ崎知格 麻布大学環境保健学部	
(II) ノーウォーク様ウイルスの遺伝学的多様性の解析とウイルス検出法の開発	141
分担研究者 武田 直和 国立感染症研究所	
協力研究者 名取 克郎、染谷 雄一 国立感染症研究所	
田中 智之 堺市衛生研究所	
栄 賢司、小林 慎一 愛知県衛生研究所	
篠崎 邦子、岡田 峰幸 千葉県衛生研究所	
石古 博昭、橋本 修 三菱化学	
鎌田公仁夫 デンカ生研株式会社	
(III) 輸入農産物の試験方法に関する研究	
- 平成 10 年度から 12 年度までの 3 年間の総括	146
分担研究者 外海 泰秀 国立医薬品食品衛生研究所・大阪支所	

平成12年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要板

研究費の名称＝厚生科学研究費補助金

研究事業名＝厚生科学特別研究事業

研究課題名＝野菜などの農水産物からの汚染微生物などの検出方法に関する調査研究（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額＝17,400,000

研究期間（西暦）＝1998－2000

研究年度（西暦）＝2000

主任研究者＝渡辺治雄（国感染症研究所）

分担研究者＝遠藤卓郎（国立感染症研究所）、島田俊雄（国立感染症研究所）、
武田直和（国立感染症研究所）、外海泰秀（国立医薬品食品衛生研究所）

研究目的

最近、野菜、果実、カキ等の農水産物の微生物あるいは農薬汚染等に起因する食中毒の発生が増加し、社会的に問題になってきている。細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌等、原虫関連ではクリプトスポリジウム、サイクロスポラ等、ウイルスではノーウォーク様ウイルス等および輸入小麦中における残留農薬による汚染がその対象となっている。当該食中毒の予防への対策および発生時における的確なる対処を行う為には、これらの農水産物の汚染状況を把握することが必要であるが、現在のところそれらの食材から正確に該当する微生物及び農薬を検出する方法論が確立されていない。本研究を行うことにより、野菜や果実等からの病原体の標準的な検出方法を確立するとともに、必要な対策を検討するための基礎資料を作成する。

研究方法

1. 細菌の検出：野菜，果実等の検体をストマッカーやミキサー処理をした場合，pH の酸性化や，乳化された検体成分中の抗菌作用物質の存在等のため，細菌の検出率の低下が考えられる。又，自然界には損傷菌として存在している可能性もあり，より検出率の低下が予想される。これらを解決するため，検体の処理の仕方，検体の前培養に用いる培地の種類等の基礎的検討を行い最適条件の確立を目指す。又，菌の存在をスクリーニングする方法として，免疫磁器ビーズ法を用いての菌の濃縮法，PCR等の分子遺伝学的技術の検討を行う。

2. 原虫の検出：食材から原虫のオーシスト等を分離・濃縮する方法として，高速連続ローター遠心機による濃縮，及び比重差を利用した浮遊分離や磁気ビーズの利用法の検討を続け，検出感度の向上を図る。その結果を用いてマニュアルの作成を行う。

3. 冬期に多いウイルス性胃腸炎の大部分がノーウォーク様ウイルスによるものであるが，ウイルスを増殖させるための適切な細胞培養系がない。そのため原因食品を特定するのが困難な場合が多い。食品から病因ウイルスを迅速かつ感度よく検出する新しい方法を確立する必要性が高い。又，患者便材料から増幅されるノーウォーク様ウイルスには多数の血清学的に異なる株が存在することがわかってきている。我が国の感染源の多くはカキであるので，カキからノーウォーク様ウイルスの遺伝子を効率よく増幅する PCR およびウイルス抗原を検出する ELISA を確立する。

4. 輸入農産物に含有している農薬の検出法について再検討を加え，その検出を妨げている諸要因について明らかにし，検出感度を上げる。

成果・考察

1. 野菜等の農水産物からの汚染細菌を効率よく検出する方法の検討；
生野菜や果物に汚染した腸管出血性大腸菌 O157 が分離されにくい原因として，オキシダーゼ陽性の *Pseudomonas* 属および *Enterobacter* 属等の細菌が混入しているため，腸管出血性大腸菌 O157 より優勢に増殖してしまったり，抗 O157 抗体免疫磁器ビーズに非特異的に結合してしまうことが明らかとなった。増菌培養時に，還元剤（チオグリコール酸ナトリウム）を添加した培地（BPW；バッファードペプトン水）を用いて嫌気培養することにより，あるいは gallic acid

含有 SDS 寒天培地にて培養させることにより *Pseudomonas* 属の細菌の増殖を抑制し、腸管出血性大腸菌 O157 を効率よく増殖させることができることが判明した。さらに、分離培地として、一般的に用いられている CT-SMAC よりも、改良した CT-SSMAC (1%サリシン及び0.01%4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド加 CT-SMAC) を用いることで、O157 の分離率を飛躍的に高めることが出来た。そこに、PCR 法や磁気ビーズ法を併用すれば、材料中に 10 個以下の菌しかいなくても検出可能であった。有機堆肥製造工程 10 日目の検体中には種々の病原性大腸菌が検出されるので、菌を殺すには十分な発酵熱が必要とされることがわかった。また各種有機肥料から vanA 型の VRE が検出された

2. ヒトカリシウィルスの解析；

ノーオーク様ウィルス (Norwalk-like virus, NLVs) の RNA ポリメラーゼの塩基配列の多様性を利用し、流行株の系統解析を行った。その結果、我が国でこれまで解析された NLVs には、Genogroup I(GI)が 13 種類、Genogroup II(GII)が 19 種類あることが分かった。多量な検体を一度に解析しやすくするため、各 genogroup に属する構造蛋白質を GI は 5 種類、GII は 7 種類、計 12 種類を用いて、抗体検出および抗原検出のための ELISA 系を確立した。この ELISA 系で陽性を示すためには、10 の 6 乗のウイルス粒子を必要とする。RT-PCR に比べ感度が低い点が問題であり、今後、さらに感度を上げるために immuno-PCR を検討している。RT-PCR を用いての調査では 30~35%のカキが NLVs の汚染をうけていることが明らかになった。また、健康人の糞便からも NLVs が検出されることから、カキ以外の食品および食品を介さないウイルス伝播がある可能性が指摘された。

3. クリプトスポリジウムやサイクロスポラの検出；

近年、クリプトスポリジウムやサイクロスポラなどといった腸管寄生性原虫類に起因する疾病への対応に迫られている。野菜、特に生食に供される葉菜類表面の汚染、あるいはイチゴ類などのようにそのまま食される果実類である。したがって、これらの食材からの原虫検査は洗浄方法と洗浄液からの (オー) シスト回収からなり、多量の試料 (洗浄液) を迅速かつ効率的に濃縮する新たな技術開発が検出率向上の鍵となる。また、調理者が感染していたためにその料理を介した感染例が報告されている。本研究ではこれらの原虫類の中でもっとも小さなクリプトスポリジウムオーシストを例に、葉菜、イチゴ、および調理

品としてポテトサラダからの検出方法を検討し、その成果を検査法マニュアルとしてまとめた。将来的には形態学的な検出法とは別に個々の原虫種において *in situ* hybridization、DNA finger-printing などの分子レベルでの同定技術の開発が重要で、集団発生時の疫学的解析の手法が必須と考えている。

4. 輸入農作物の試験方法

マラチオン分解物の同定の検討を行った。検討方法として、「①ラベル化マラチオンによる分解物の分画 GR と¹⁴C]マラチオンの反応液を経時的に取り、HPLC を用いて2条件で分取し、各画分の放射能を測定した。②非ラベル化マラチオンによる分解物の同定と経時変化 GR とマラチオンの反応液を経時的に取り、LC/MS で分解物の同定と経時変化を測定した。」の2つのステップで調査を行った。RI 実験で放射能の増加した画分は主に2つであった。そのひとつは、LC/MS の結果からβ位のカルボキシエチルエステルが加水分解したマラチオンβ-モノカルボン酸とマラチオンのメトキシ基のメチル基が外れたデスメチルマラチオンであることが判明した。

結論

野菜、果物等を汚染している微生物あるいは農薬の迅速なる検出法の開発、改良等の検討を行った。いくつかの効率よい方法の開発を手がけてきて新しい知見が得られた。

平成12年度厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

野菜等の農水産物からの汚染微生物の検出方法に関する調査研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部長

研究要旨：最近、野菜、果実、カキ等の農水産物の微生物あるいは農薬汚染等に起因する食中毒の発生が増加し、社会的に問題になってきている。細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌等、原虫関連ではクリプトスポリジウム、ジアルジア等、ウイルスではノーウオーク様ウイルス等および輸入小麦中における残留農薬による汚染がその対象となっている。本研究は、野菜や果実等からの病原体の標準的な検出方法を確立することを目的としている。本年度も昨年度と同様に野菜、果物等を汚染している微生物あるいは農薬の迅速なる検出法の開発、改良等の検討を行った。その結果①サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 を検出するための培地条件の検討、②ノーウオーク様ウイルスの遺伝的多様性を利用した PCR 法及び構造蛋白質を対象とした抗原並びに抗体検出のための ELISA 法の開発、③クリプトスポリジウムやサイクロスポラなどといった腸管寄生性原虫類の検出のためのマニュアルの作成、④有機リン系農薬、マラチオンの測定結果に影響を及ぼす因子についての検討、を行い、それぞれについて検査法の提示を行った。

分担研究者氏名・所属・職名

1. 遠藤卓郎（国立感染症研究所・寄生動物室 室長）
2. 島田俊雄（国立感染症研究所・腸管系細菌室長）
3. 武田直和（国立感染症研究所・ウイルス第二部腸管系ウイルス室長）
4. 外海泰秀（国立医薬品食品衛生研究所・大阪支部食品試験部）

5. 藤沢倫彦、山井志朗（神奈川県衛生研究所細菌病理）
6. 名取邦郎（国立感染症研究所・ウイルス第二部腸管系ウイルス室）
7. 田中智之（堺市衛生研究所所長）
8. 鎌田公仁夫（デンカ生研株式会社ウイルス試験製造部）
9. 八木田健司（国立感染症研究所寄生動物部）

研究協力者

1. 大澤朗（神戸大学大学院自然科学研究科）
2. 金子賢一（東京農工大学農学部）
3. 宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部）
4. 上田茂子（女子栄養大学衛生学教室）

A. 研究目的

最近、野菜、果実、カキ等の農水産物の微生物あるいは農薬汚染等に起因する食中毒の発生が増加し、社会的に問題になってきている。細菌ではサルモネラ、腸管出血性大腸菌等、原虫関連ではクリプトスポリジウム、サイクロスポラ等、ウイルス

ではヒトカリシウィルス等および輸入小麦中における残留農薬による汚染がその対象となっている。当該食中毒の予防への対策および発生時における的確なる対処を行う為には、これらの農水産物の汚染状況を把握することが必要であるが、現在のところそれらの食材から正確に該当する微生物及び農薬を検出する方法論が確立されていない。本研究を行うことにより、野菜や果実等からの病原体の標準的な検出方法を確立するとともに、必要な対策を検討するための基礎資料を作成する。

B. 研究方法

1. 細菌の検出：野菜、果実等の検体をストマッカーやミキサー処理をした場合、pHの酸性化や、乳化された検体成分中の抗菌作用物質の存在等のため、細菌の検出率の低下が考えられる。又、自然界には損傷菌として存在している可能性もあり、より検出率の低下が予想される。これらを解決するために、検体の処理の仕方、検体の前培養に用いる培地の種類等の基礎的検討を行い最適条件の確立を目指す。又、菌の存在をスクリーニングする方法として、免疫磁器ビーズ法を用いての菌の濃縮法、PCR等の分子遺伝学的技術も検討を行う。

2. 原虫の検出：食材から原虫のオーシスト等を分離・濃縮する方法として、高速連続ローター遠心機による濃縮、及び比重差を利用した浮遊分離や磁気ビーズの利用法の検討を続け、更なる検出感度の向上を図る。標本中の微量のオーシストを検出するために、in situ hybridization等の分子レベルの染色方法を検討する。また、ポリトレオニン遺伝子を用い

ての分子疫学的解析について、例数を増やし、実際に分子疫学的マーカーとして利用可能かをさらに検討する。

3. 冬期に多いウィルス性胃腸炎の大部分がヒトカリシウィルス(human calicivirus, HuCV)によるものであるが、ウィルスを増殖させるための適当な細胞培養系がない。そのため原因食品を特定するのが困難な場合が多い。食品から病因ウィルスを迅速かつ高感度で検出する新しい方法を確立する必要がある。又、患者便材料から増幅されるHuCVには多数の血清学的に異なる株が存在することがわかってきている。我が国のHuCV感染源の多くはカキであるので、カキからHuCVの遺伝子を効率よく増幅方法を確立する

C. 成果・考察

1. 細菌の検出

1) 市販生野菜から分離されCT-SMAC培地上で腸管出血性大腸菌O157とコロニー形態の類似する細菌群の検索・同定と新たなO157選択分離培地の考案：市販の生鮮野菜より大腸菌O157分離用免疫磁気ビーズによって捕捉され、CT-SMAC培地上でO157ではないが、これと同様のコロニー性状を示す細菌について、その生化学性状、薬剤感受性等を明らかにし、菌種の同定を試みた。その結果、分離された総計37株の内、12株は糖発酵性細菌、25株は糖非発酵性細菌であった。前者で同定された主な菌は*Enterobacter*属、後者では*Pseudomonas*属の菌であった。また抗O157感作および非感作ラテックスを用いての凝集テストですべての菌株が非特異的凝集を示した。他方、糖非発酵性細菌の大半

が嫌氣的培養条件で発育が抑制された。上記の分離菌株全てが感受性で、かつ対照の O157 菌株が全て非感受性であるような薬剤として没食子酸 (gallic acid) を見出した。この所見より、フェノール酸の一種である没食子酸を新たに添加した SDS 寒天培地を考案し、菌増殖の有無を調べた結果、対照の O157 菌株は増殖したが大半の分離菌株 (特に糖非発酵菌株) の増殖が阻止された。本培地が CT-SMAC 培地に代わる新たな O157 選択分離培地として有用であることが示された。

2) レタスに実験的に接種されたサルモネラの回収方法の検討および市販野菜におけるサルモネラの汚染状況：野菜からのサルモネラの検出方法を確立するため、硫化水素産生および非産生サルモネラを実験的に野菜に接種し、わが国の食衛法と米国で採用されている FSIS 法によるサルモネラの回収率を比較した。レタスに硫化水素産生サルモネラを少数 (10^1 - 10^2 CFU/g) 接種した場合、前増菌培地として Buffered peptone water (BPW)、選択増菌培地として Rappaport-Vassiliadis broth (RV)、選択分離培地として Double modified lysine iron agar (DMLIA) およびスルファピリジン添加 Brilliant green (BGS) を使用する方法が最も回収率が高かった。また、選択増菌培地として Tetrathionate broth を使用する方法の回収率は最も低かった。レタスに硫化水素非産生サルモネラを少数 (10^1 - 10^2 CFU /g) 接種した場合、BPW で前増菌、さらに RV で選択増菌後、BGS で選択分離する方法の回収率が最も高かった。市販の生で食べる野菜 417 例について上記の方法

により、サルモネラの検出を試みたが、すべて陰性であった。

3) 生野菜と果物からの腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラの検出に関する研究：腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラの検出法に関して、主に PCR での検出を検討した。さらに O157 の *stx*(Shiga toxin)2 産生遺伝子の一部およびそれに続く下流域に関し遺伝子配列を検討した。野菜と果物等の O157 とサルモネラの検出方法として、BPW による 24 時間培養液を用いての一括 PCR での判定により、少数菌あるいは選択培養液では発育の遅いあるいは生育できない菌でも検出できるものと考えた。

4) 生食用野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 の検出に関する研究：生食用野菜からの腸管出血性大腸菌 O157 の検出のために有用な増菌培地および分離培地の検討を試みた。増菌培地としてチオグリコール酸ナトリウム加 PBW を、分離培地として CT-SMAC を用いた組み合わせが、検出率が最も高かった。前年度報告した分離培地 CT-SSMAC と市販の CT-SMAC 上に出現する集落を比較検討した。CT-SSMA を用いると、CT-SMAC で O157 の検出の障害となる無色集落を形成する菌株の出現が、半数の検体で発育を阻止された。

5) 堆肥有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究：発酵製造過程 10 日目の検体に下痢原生大腸菌 O146:H21、原材料コーン、大豆ダストから組織侵入性大腸菌 O28ac:HUT、屠場汚泥から下痢原生大腸菌 O125:H19 および毒素原生大腸菌 O8:HUT が検出された。これらのことから、野菜、果物等に用いる堆肥の製造、生産においては十分な発酵および十分な発酵熱が必要であ

ることが強調される。

6) 有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子について: 各種有機肥料から分離された腸球菌バンコマイシン耐性遺伝子の保有について調べた。VCM (バンコマイシン) および TEIC (テイコプラニン) の高度耐性遺伝子 Van A を保有する腸球菌 (VRE) が検出された。今後、これらの菌株の生野菜、果物等への二次汚染も否定できず、生野菜、果物の VRE の実態調査が必要である。

7) PCR 法による食品および糞便中の病原性 *Yersinia enterocolitica* 検出に関する研究:

PCR 法による食品および糞便中の病原性 *Yersinia enterocolitica* 検出方法の有効性について基礎的検討を試みた。プライマーハ細胞付着性遺伝子 *ail* が最も効果的であった。病原性 *Yersinia enterocolitica* は 6 時間増菌培養後、103.5 個/ml 存在すれば PCR 法で検出可能である。

2. ノーウォーク様ウイルスの検出

1) 研究成果:

ノーウォーク様ウイルスの構造タンパク質を組み換えバキュロウイルスで発現したリコンビナントウイルス様粒子 (VLP) を用いた感度検査では、r258、r76 では 1.25ng、rNV、r124、rCV、r7、r47 は 2.5ng の検出感度であったが、rMX、rSMV は 40ng 以上必要であった。EM によるウイルス粒子検出結果と EIA との検出一致率は 63% (134/214) であった。一方、RT-PCR との一致率は 69% (367/536) にみられた。また、この 536 検体の中で、RT-PCR 陰性の検体も測定した 7 施設 369 検体についてみると 78% (287/369) の一致率を示した。RT-PCR は陽性、EIA が陰性

であったものが 151 検体 (28%)、その逆に RT-PCR が陰性、EIA で陽性になったものが 18 検体 (3%) あった。21 例 (4%) は Genogroup I、Genogroup II の両方のウイルス抗原検出プレートで陽性であった。

2) 考察:

現行のノーウォーク様ウイルスの診断方法は RT-PCR に頼り、経済性、迅速性の点でまだまだ改良すべき点が多い。何よりも一つの感染事例において原因微生物の特定には迅速性と特異性が求められるが、RT-PCR 法では前者の点で欠けていると言える。これまでの研究成果からノーウォーク様ウイルスには表面抗原の共通性が示唆されており、共通抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製とそれを用いた EIA による診断方法の確立を試みてきた。EIA による診断は、多検体が同時に測定できる、2-4 時間で測定結果が得られる迅速性を持つ、などの長所がある。これまでは単クローン抗体を固相抗体および検出抗体としたサンドイッチ EIA として開発してきたが、この方法は特異性は高く見られたが検出感度は低い欠点があった。単クローン抗体自身は、例えば #3901 は構造蛋白の C 末端に存在する Genogroup I 共通の 74 個のアミノ酸のエピトープを認識することが明らかになり、それを用いた抗体は Genogroup I を高感度で検出できることが明らかであった。一方、ポリクローン抗体をそれぞれ固相抗体、検出抗体としたサンドイッチ EIA では、検出感度は高いものの、背景反応が高く擬陽性反応の否定が難しい検体が存在していた。今回これらの 2 つの方法を総合的に検討した結果、固相抗体として Genogroup 特異的

の高い単クローン抗体を使用し、また検出抗体には酵素標識したウサギ抗血清を使用する抗原検出系が良いとの結論に至った。この新しい単クローン・ポリクローン抗体サンドイッチ EIA によって、RT-PCR との一致率を 70% にまで向上させることが出来た。しかし、いくつかの検討課題が残されている。第一は約 3 割の RT-PCR 陽性、EIA 陰性検体の評価である。今回は多施設検査結果の集積であるため、統一的な評価は難しいし、同一施設で同一検体の測定評価が必要であるが、今回の EIA では検出できない血清型がまだ数多く存在する。これらの VLP を作製し、抗血清を準備する必要がある。第二はこれらの点を踏まえて、さらに数多くのウイルスの共通抗原を特異的に認識する単クローン抗体の作製とそれを用いた EIA の開発である。第三は今回の検査対象材料は患者便であるが、収去食物等からの検出の可能性について検討する必要がある。

3. クリプトスポリジウムやサイクロスポラなどといった腸管寄生性原虫類の検出：

近年、クリプトスポリジウムやサイクロスポラなどといった腸管寄生性原虫類に起因する疾病への対応に迫られている。交通手段や物資の輸送手段の発達がこれら感染症のグローバル化の重要な要因であることが指摘されていたが、予測を超えた速度で進行している現実と直面している。これら感染症に対する「危機管理体制」の構築・整備には食品や環境からの原虫の検出法、診断法、あるいは疫学的解析法の開発が必須で、それらの普及が急がれる。本研究ではいわゆる「糞-口感染」により伝播

するクリプトスポリジウム、サイクロスポラ、ジアルジア、赤痢アメーバなど多種類の原虫が対象となる。また、将来的にはミクロスポリジウムも重要な対象となるものと考えられる。具体的に汚染が問題となるのは野菜、特に生食に供される葉菜類表面の汚染、あるいはイチゴ類などのようにそのまま食される果実類である。したがって、これらの食材からの原虫検査は洗浄方法と洗浄液からの（オー）シスト回収からなり、多量の試料（洗浄液）を迅速かつ効率的に濃縮する新たな技術開発が検出率向上の鍵となる。また、調理者が感染していたためにその料理を介した感染例が報告されている。本研究ではこれらの原虫類の中でもっとも小さなクリプトスポリジウムオーシストを例に、葉菜、イチゴ、および調理品としてポテトサラダからの検出方法を検討し、その成果を検査法マニュアルとしてまとめた。これまでわが国には食材からの原虫類の嚢子の検査法が示されていなかったことから、本検査法マニュアルはその基礎となるべく、できるだけ簡潔な方法となるよう心がけた。将来的には形態学的な検出法とは別に個々の原虫種において *in situ* hybridization、DNA finger-printing などの分子レベルでの同定技術の開発が重要で、集団発生時の疫学的解析の手法が必須と考えている。

4. 輸入農薬の試験方法に関する研究

小麦に含まれるコリンエステラーゼ阻害活性を有する有機リン系農薬、馬拉チオンを食品衛生法に基づく告示法に従って測定した場合、その測定値が実際の存在量に比べて著しく

低く見積もられることを昨年度報告した。また、この報告の中で、原因として小麦中の酵素グルタチオンレダクターゼ（GR）の可能性を示した。しかし、その分解物についてはまだ判明しておらず、公衆衛生上の観点から、この分解物の同定は重要であると考え本年度調査を行った。調査方法として、「①ラベル化マラチオンによる分解物の分画 GR と [¹⁴C]マラチオンの反応液を経時的に取り、HPLC を用いて 2 条件で分取し、各画分の放射能を測定した。②非ラベル化マラチオンによる分解物の同定と経時変化 GR とマラチオンの反応液を経時的に取り、LC/MS で分解物の同定と経時変化を測定した。」の 2 つのステップで調査を行った。

RI 実験で放射能の増加した画分は主に 2 つであった。そのひとつは、LC/MS の結果から β 位のカルボキシエチルエステルが加水分解したマラチオン β -モノカルボン酸とマラチオンのメトキシル基のメチル基が外れたデスメチルマラチオンであることが判明した。

D. 研究発表等

各分担者報告書を参照。

野菜等食品からのクリプトスポリジウム等原虫類嚢子の検出法に関する研究

分担研究者 遠藤 卓郎 国立感染症研究所 寄生動物部
協力研究者 八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部

研究要旨：

近年、クリプトスポリジウムやサイクロスポラなどといった腸管寄生性原虫類に起因する疾病への対応に迫られている。交通手段や物資の輸送手段の発達がこれら感染症のグローバル化の重要な要因であることが指摘されていたが、予測を超えた速度で進行している現実直面している。これら感染症に対する「危機管理体制」の構築・整備には食品や環境からの原虫の検出法、診断法、あるいは疫学的解析法の開発が必須で、それらの普及が急がれる。本研究ではいわゆる「糞-口感染」により伝播するクリプトスポリジウム、サイクロスポラ、ジアルジア、赤痢アメーバなど多種類の原虫が対象となる。また、将来的にはミクロスポリジウムも重要な対象となるものと考えられる。具体的に汚染が問題となるのは野菜、特に生食に供される葉菜類表面の汚染、あるいはイチゴ類などのようにそのまま食される果実類である。したがって、これらの食材からの原虫検査は洗浄方法と洗浄液からの（オー）シスト回収からなり、多量の試料（洗浄液）を迅速かつ効率的に濃縮する新たな技術開発が検出率向上の鍵となる。また、調理者が感染していたためにその料理を介した感染例が報告されている。本研究ではこれらの原虫類の中でもっとも小さなクリプトスポリジウムオーシストを例に、葉菜、イチゴ、および調理品としてポテトサラダからの検出方法を検討し、その成果を検査法マニュアルとしてまとめた。

これまでわが国には食材からの原虫類の嚢子の検査法が示されていなかったことから、本検査法マニュアルはその基礎となるべく、できるだけ簡潔な方法となるよう心がけた。将来的には形態学的な検出法とは別に個々の原虫種において *in situ* hybridization、DNA finger-printing などの分子レベルでの同定技術の開発が重要で、集団発生時の疫学的解析の手法が必須と考えている。

野菜等食材からの原虫類（オー）シスト検査法マニュアル

検査法の概要

水道を介したクリプトスポリジウム症、およびジアルジア症の集団感染事例が多発し、これまで水道水などからの原虫分離法が検討されてきた。一方、これらの原虫は食品が汚染されることでも伝播し、1996年以降米国で連続的に発生したサイクロスポラ症の **diffuse outbreak** がその典型例を示すように、原因食は輸入食品のラズベリーであった。野菜や果実などは栽培方法によっては動物やヒトの糞便あるいはその堆肥によって汚染されたり、調理人の手指を介して汚染されたりする可能性がある。米国のラズベリー事件では生産国（中米グアテマラ等）で汚染された農業用水の散布方法に問題があったことが指摘され、それ以降は散水時に果実に水が直接かからないよう指導がなされている。わが国は多くの食品を海外に依存しており、食品検疫の体制強化は重要課題である。その一方で、原虫分離に関する参考書は極めて稀で、著者等の知る限りでは米国 Food and Drug Administration（FDA）の編集による《**Bacteriological Analytical Manual (8th Edition)**》が唯一のものである。しかしながら、**Bacteriological Analytical Manual** においても原虫類の分離に関する記載は短く、紹介されている検査法も1%あるいはそれ以下の検出率しか期待できないもので、極めて不満足なものとなっている。本研究においてはわが国において広く用いることのできる原虫類（オー）シスト検査法マニュアルの作成を目指した。クリプトスポリジウム等による汚染は野菜等の表面への付着と調理過程での混入という2形態が想定されることから、それぞれについて検査法の検討・開発を行った。

1. 実験器具・試薬および試料

《実験器具》

1. 超音波槽（洗浄槽容量 9L、大容量が望ましい）
2. 遠心機（連続ローター）
3. 連続ローター（内容量 80ml、160ml、最大半径 58mm）
4. ペリスタリック ポンプ（定量ポンプ）
5. 吸引ポンプ
6. 蛍光顕微鏡 微分干渉装置付き
7. 吸引ビン、
8. メンブランフィルターホルダーベース（25mmΦ用 焼結ガラス製；以下、フィルターホルダー）
9. ビーカー
10. スライドグラス
11. カバーグラス（32x32mm）
12. 撥水ペン
13. プラスチック遠心管（15ml、50ml）
14. メンブランストレーナー（孔径 20_μm、粗大粒子除去用）

15. メンブランフィルター（孔径 1.0 μ m、親水性 PTFE 製、25m/m Φ ）
16. メンブランフィルター（孔径 1.0 μ m 以上、セルロースアセテート製、25m/m Φ ）
17. 吸引チューブ
18. ガーゼ
19. 茶漉し
20. スパーテル

《試薬類》

1. 10 倍濃度 PBS（リン酸緩衝生理食塩水、pH7.4）
2. PBS(pH 7.4)：精製水 900ml に 10 倍濃度 PBS 100ml を加えて混合する。pH 値を確認し、必要に応じて 0.1N 塩酸又は 0.1N 水酸化ナトリウムを用いて pH7.4 に調整する。
3. 界面活性剤添加洗浄液：POE(12) Lauryl alcohol polyether（ポリオキシエチレンラウリルエーテル(12E0)、またはそれと同等のもの）0.1% 水溶液
4. 酢酸エチル
5. 比重 1.20 ショ糖液：ショ糖 500g を 650ml の精製水に溶解
6. 比重 1.24 ショ糖液：ショ糖 620g を精製水に溶解し、1,000ml に調整
7. 蛍光抗体試薬キット（FITC 標識 抗-Cryptosporidium オーシスト単クローン抗体）
8. DAPI 染色液：メタノール 1ml に DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）2mg を溶解する。密閉容器に入れ、遮光して冷蔵庫に保管する。使用に際して DAPI 保存液 10 μ l を PBS 50ml に希釈する。本液は使用時に調製する。
9. ブロッキング試薬：10%ウシ血清アルブミン加 PBS 溶液、10%カゼイン加 PBS 溶液、または 10%ヤギ血清加 PBS 希釈溶液など。自家調製する場合はメンブランフィルター（孔径 0.45 μ m）でろ過し、小分けして冷蔵保存する。

2. 葉菜類／果実類等の試料の洗浄・濃縮方法

《葉菜類／果実類等の洗浄方法》

a 超音波洗浄（特に、イチゴ類など衝撃に弱い食材に推奨）

1. 検査材料は乾燥を防いで冷蔵庫保存する。
2. 5L の洗浄液（0.1% Laureth-12 液）を超音波洗浄槽に入れて 10 分間発振し、洗浄液の脱気を行う。
3. 検査材料（～300 g/5L）を洗浄液に入れ、試料が洗浄液中に浸るよう金網などで落とし蓋をして 30 分間超音波洗浄する。
4. 落とし蓋、試料の野菜（果実）をピンセットあるいは茶漉しなどで回収する。その際、新しい洗浄液ですすぎ、すすぎ液も回収する。
5. 洗浄槽に定量ポンプの送液チューブを挿入し、連続遠心機に送液する（後述）。

b 攪拌洗浄（キャベツ等の比較的衝撃に強い食材に適用可）

1. 5L の洗浄液を入れたポリプロピレン製 10L 用コンテナに、切取ったキャベツ葉（最大 300 g / 5L 程度）を 5～7cm 角に切断して入れる。
2. 循環ポンプを始動し、水流で勢いよく検体が攪拌されるよう水流を調節する。
3. 15 分間洗浄した後、ポンプ停止。キャベツ葉を取出し、0.5L の洗浄液で各葉全体を

すすぎ、洗浄液と合わせる（総液量：約 5.5 L）。

《遠心濃縮》

a 連続遠心法（連続ローター：内容積 80ml）

1. 連続遠心用冷却遠心機を用意し、運転温度を 20℃に設定する。連続ローターに精製水を適量（内容容積 80ml に対して 50 - 60 ml 程度）注入し、遠心機本体に装着する^{注1)}。
2. 回転数を 16,000rpm に設定し、徐々に回転数を上げて所定の回転数にまで達したら、チューブ内の洗浄を兼ねて定流ポンプで新しい洗浄液（0.1% Laureth-12 液）を注入する（45 ml/min）。
3. 連続ローターから洗浄液が排出されていることを確認したら、注入速度を 140 ml/min 程度にあげて 5 分間送液を続ける。
4. 次いで、同一条件で上述の検査材料洗浄液の全量を連続的に連続遠心機に送液する。送液が完了したら、超音波洗浄器の内側を洗浄液ですすぎ、すすぎ液の全量を遠心機に送液する。
5. 送液完了を確認してから、さらに 3 分間程度遠心を続け、その後に遠心機を停止する。
6. ローターをはずし、ローター内の液と沈渣を全量回収する。その際、洗浄液を少量加えてローター内をすすぎ、すすぎ液も回収する。
7. 回収液の全量を 50ml の遠心管に分注し、1,050g 10 分間遠心して沈渣を得る。
8. 沈渣の量に応じて適宜（沈渣量が 0.5ml に対して 10ml 程度）洗浄液に再懸濁し、シヨ糖密度勾配遠心法に供する。

注1) 砂などの付着が多い試料の場合には、連続ローターに予めシヨ糖液（比重 1.24）を注入（内容量 80ml に対し 30ml）し、連続遠心処理に密度勾配遠心法を組み合わせた方法で連続遠心する。遠心後の連続ローター内の液は上層から洗浄液上清（50ml）、シヨ糖液（30ml）、沈渣（微量）の 3 層に分離しているので、液層をなるべく乱さないように上清およびシヨ糖液（計約 70ml）を回収する。その際、沈渣を回収しないよう注意することで比重の大きな砂などの混入物を効果的に排除できる。

b 固定ローター使用の場合

通常の固定ローターを使用する場合には、作業効率を考慮して試験規模の縮小も止むを得ないものとする。遠心操作を繰り返し、沈渣を濃縮し、最終的に既知の洗浄液中に沈渣を再懸濁する（沈渣量が 0.5ml に対して 10ml 程度）。沈渣懸濁液をシヨ糖密度勾配遠心法に供する。なお、遠心での注意点は、

- (1) 洗浄液に対して試料を多量に加えないこと（試料からの滲出物で洗浄液の粘性を上昇

させないよう注意)

- (2) 1,050 g 10 分以上の遠心が必要なこと
- (3) 遠心終了後に急速な減速を避けること

などである。特に、(3) に記載したように、遠心終了後にローター回転数を急激に減速させると遠心管内で渦流が発生し、沈渣が巻き上げられるので注意が必要である。

《サラダ等、調理品からの原虫検出法》

1. 検査材料を適量（ポテトサラダ 10g）をビーカーに取り、スパーテル等で固形物をペースト状になるまで潰す。
2. 洗浄液（0.1% Tween 80 液）100ml を加え、十分に懸濁する。
3. 茶漉しにガーゼを 4 枚重ね、サラダ懸濁液をろ過する。
4. さらに 100ml の洗浄液で、ビーカー等を洗浄し、同様にろ過する。
5. ろ液を 50ml 遠心管に分注し、1,050 g 10 分間の遠心により沈渣を回収する。この時、食材中の油性成分が液層最上部に分離し、洗浄液層、沈渣の 3 層に分かれる。（クリプトスポリジウムはすべて沈渣に回収されることを確認。）
6. 沈渣 5 g づつを 15ml の遠心管に取り、5ml の洗浄液を加えて激しく攪拌する。
7. 1,050 g 10 分間の遠心により沈渣を回収する。
8. 沈渣に少量（3ml）の洗浄液を加えて十分に攪拌・懸濁し、さらに洗浄液を 5ml 追加して懸濁する。
9. 2ml の酢酸エチルを加え、密栓して激しく攪拌する。
10. ただちに 1,050 g 10 分間 遠心する。
11. 液層は上から酢酸エチル層、浮遊層、洗浄液層、沈渣の 4 液層に分離する。
12. 予め浮遊層を竹串等で管壁から離し、上部の 3 液層を捨て、遠心管内壁の付着物を綿棒で拭き取ってから沈渣を回収する。
13. 得られた沈渣に洗浄液 5 ml を加えて十分に攪拌・懸濁する。
14. ショ糖密度勾配遠心法に供する試料とする。

3. ショ糖密度勾配遠心法

1. 15ml 遠心管に上述の方法で作成した沈渣懸濁液 5ml を取り、管底から比重 1.2 のショ糖液 3ml を注入し 2 液を重層する。
2. 1,050g で 10 分間 遠心し、比重の異なった 2 つの液層の界面付近を新しい遠心管に回収する。

3. 次いで、上部の洗浄液層を回収し、次いでショ糖液層を管底から 1ml 程度残して回収する。
4. 回収液をメンブランストレーナー（孔径 20_μm）でろ過し、液量を測定・記録する。
5. ろ液の一部あるいは全量を蛍光抗体染色に供する。

4. 蛍光抗体染色

蛍光抗体試薬（直接及び間接蛍光抗体法試薬が市販されている）を用い、クリプトスポリジウムを特異的に染色する。核酸染色剤の DAPI を併用すると核が染め出されて効果的なことがある。ちなみに、クリプトスポリジウム、ジアルジアに対する蛍光抗体試薬は市販されており、購入可能である（検査試薬として未承認のため、保険適用外）。また、サイクロスポラ、イソスポラのオーシストは自家蛍光を発することから、同じく蛍光顕微鏡（UV 励起）による観察が可能である。赤痢アメーバのシストについては DAPI 染色により、シスト内の核（4 核）が蛍光顕微鏡下（UV 励起）で明瞭に観察できる。

《染色方法》（親水性 PTFE フィルター使用の場合）

1. PTFE 製フィルターの中央に撥水ペンで直径約 15mm 程度の円を描き、予め用意した PBS を満たしたシャーレに浮かべる（裏面から濡らす）。
2. 別に用意したセルロースアセテート製フィルターを PBS に漬け、水面に浮いている PTFE フィルターを重ねてすくい取る（セルロースアセテート製フィルターを支持膜として使用）。
3. フィルターホルダーを吸引ビンにセットし吸引ポンプと連結して弱く吸引しながら、ホルダー上部を PBS で洗浄したのち、円を描いた面を上にして支持膜ごとフィルター（2 枚重ねのフィルター）をベース上に載せる。吸引を停止し、少量のブロッキング試薬を PTFE フィルターの円内全面に行き渡るように滴下する。
4. 吸引を停止し、速やかに染色操作に移る。
5. 必要に応じて弱く吸引しながら、適量の試料を PTFE フィルターに少量ずつ円内全面に行き渡るように滴下・上層する。
6. 次いで、少量のブロッキング試薬を円内全面に行き渡るように滴下し、残ったブロッキング試薬を吸引除去する。
7. 支持膜ごとフィルターをスライドグラス上に移し、遮光湿箱に入れる。
8. 少量の直接蛍光抗体試薬をフィルターの円内全面に行き渡るように滴下し、室温で所定の時間（20 - 30 分間）反応させる。
9. 反応終了 5 分前に DAPI 液 100_μl を加える（省略可）。

10. 反応後、支持膜ごとフィルターをフィルターホルダーに戻し、弱く吸引しながら、PBS 約 10ml を用いて円内全面をゆっくりとろ過洗浄する。
11. PTFE フィルターを支持膜からはがして、皺にならないようにスライドグラス上に移し、水溶性の封入剤（Fluoprep、bioMérieux 社など）を滴下し、カバーグラスをかけて、四隅をネイルエナメル等で封じる。

5. 顕微鏡観察

クリプトスポリジウムのオーシスト、およびジアルジアシストに対する蛍光抗体試薬は市販されている。また、イソスポラおよびサイクロスポラのオーシストは UV 励起下でネオン青の自家蛍光を発することから、特段の蛍光抗体染色を施すことなくで観察に供すればよい。また、赤痢アメーバのシストは DAPI 染色により核（4 核）が明瞭に観察できる。以下に、クリプトスポリジウムのオーシストを例にとって説明する。

クリプトスポリジウムのオーシストは類円形で、その長径は約 5 μ m であるが、測定状況によって 3.5~6.5 μ m の範囲に入る。オーシスト壁は薄く平滑で、その 1ヶ所に縫合線と呼ばれる亀裂様構造を有するが観察はできない。内部には 4 個の三日月型をしたスポロゾイト、残体とその他の顆粒を含む。標本によっては変形して紙風船が押しつぶされた形状を呈することがある。また、縫合線が開口し、内部構造が消失していることもある。B 励起下での FITC の特異蛍光は緑色である。オーシストが示す蛍光は一樣ではなく、辺縁（シスト壁）の蛍光が強く、それに比して中央部は弱い。観察の方向によっては縫合線が確認できることがある。オーシストの内部が赤色または強い黄色を呈することはない。DAPI 染色を併用した場合、UV 励起下で観察する。DAPI の特異蛍光は青色である。オーシスト内にスポロゾイトの核が 4 個青色に染って見える場合がある。

《 観察手順 》

1. FITC の特異蛍光を観察するためには B 励起を選択し、20 倍の対物レンズを用いて特異蛍光（緑色）を示す 5 μ m 程度の粒子を探す。粒子が検出されたらその都度倍率を上げて観察する。
2. 必要に応じて 40 ~100 倍の対物レンズを用い、B 励起、UV 励起で観察し、上記の特徴を確認する。なお、蛍光の減衰を考慮して、蛍光顕微鏡観察は手際よく行う必要がある。
3. 次いで、微分干渉装置を用いて粒子のサイズを測定し、染色性や微細構造等を詳細に観察する。標本の状態によって観察できる微細構造は限られることが多い。