

これに対して、ヒト回虫とブタ回虫の鑑別には ITS-1 領域の配列が指標とされている²⁾⁶⁾。これはヒト回虫とブタ回虫では ITS-2 領域の配列が相互に一致するから⁶⁾で、両者の分子鑑別に際してはこの点に留意する必要がある。

E. 結論

市販の輸入キムチ由来の回虫様の虫卵を出発材料として、リボソーム DNA・ITS-1

領域の配列を解読・比較し、ヒト回虫 *A. lumbricoides* と判定した。市販の輸入キムチの中には、製造過程で人体寄生性の蠕虫である回虫に汚染されているものもある事が明らかになった。

F. 文献

1. 平成 17 年 11 月 14 日付食品安全部監視安全課報道発表資料「韓国産及び中国産のキムチに関する調査状況について

図 2 キムチ由来虫卵（および人体症例由来の回虫卵）のリボソーム DNA・ITS-1 領域の塩基配列 (SP) を示す。ヒト回虫 *Ascaris lumbricoides* (Al、GenBank Accession No. AB110019)、ブタ回虫 *Ascaris suum* (As、AB110022) と比較した。ドット(.)はヒト回虫およびブタ回虫の登録配列がキムチ由来虫卵と同一であることを、ハイフオン(-)はその部分の塩基が欠失している事を示す。

```

SP 001:ATCGAGCAGAAAAAAAAA-GTCTCCGAACGTGCACATAAGTACTATTTGCGCGTATACG 059
Al 001:.....-..... 059
As 001:.....A..... 060

SP 060:TGAGCCACATAGTAAATTGCACACAAATGTGGTGATGTAATAGCAGTCGGCGGTTTCTTT 119
Al 060:..... 119
As 061:..... 120

SP 120:TTTTTT-GGCGGACAATTGCATGCGATTTGCTATGTGTTGAGGGAGAATAGGTGGCATGT 178
Al 120:.....-..... 178
As 121:.....T...C..... 180

SP 179:TGGGCTTGTTAGAAAGGCATGCCGCTAGCGCTTATTTCCCGCTATTCGTAACAACGGT 238
Al 179:..... 238
As 180:..... 240

SP 239:GTCCATTTTGGCGTCTACGCTTCACCGAGCTATCGCCTGGACCGTCGGTAGCGATGAAAG 298
Al 239:..... 298
As 241:.....A..... 300

SP 299:GTGGAGAGAAAGCTCCTCGTTTCGAGTCGAGTAGACTCAATGAGCCTCAGCTTGGAGGCC 358
Al 299:..... 358
As 301:..... 360

SP 359:GCCAAACTCAAAAAACACAATCACTTTTGAAAATCTATTCTAATGAAAGATGCTAAATT 418
Al 359:..... 418
As 361:..... 420

SP 419:TTGTTTAGTATCTTCGAATTGTAAGATGAACAAATCTTAGCGGGGATCACTCGGTTCCG 478
Al 419:.....N.....-..... 477
As 421:.....T.....T 480

SP 479:GG 480
Al 478:... 479
As 481:... 482

```

て」 (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/11/h1114-1.html>)

2. Ishiwata, K. et al. (2004): Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol. Res.*, 92, 50-52.
3. Jacobs, D.E. et al. (1997): PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop.*, 68, 191-200.
4. 太田伸生, 他 (2006): 輸入キムチから検出された寄生虫卵. *Clin. Parasitol.*, 17, 印刷中.
5. Sugiyama, H. et al. (2002): Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage. *Mol. Cell. Probes*, 16, 231-236.
6. Zhu, X. et al. (1999): Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, 29, 469-478.

G. 健康危機管理情報

なし

H. 研究発表

なし

I. 知的財産の出願

なし

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究（H17-特別-060）

分担研究報告書
食品キムチの寄生虫汚染検査法の開発

主任研究者 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
泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部

概要：平成17年度に発生した寄生虫卵等によるキムチの「汚染騒動」は中国－韓国間で勃発したものであるが、わが国においてもこれらの食品の輸入実績があることから汚染実態把握等の緊急対応が求められたところである。

当該研究では食材の寄生虫・原虫汚染に係る迅速・簡便な検査法の改良・開発を行い、手順書としてまとめた。その基本的な手順は以下の通りである。

1. キムチ（300g）を多量（5L）の界面活性剤溶液で洗浄
2. 洗浄液の遠心濃縮（連続遠心法）
3. 沈渣の部分精製（密度勾配遠心法）
4. 鏡検（厚層塗抹法）

当該方法では多量の液で検体を洗浄することで回収効率を保障し、簡易連続遠心機（30万円程度）を用いることで濃縮作業の迅速化を図っている。また、キムチの洗浄液から得た沈渣には多量の植物残渣が含まれることから、通常の顕微鏡観察では標本枚数が多くなり、観察に要する時間がきわめて長くなる恐れがある。この問題の解決には厚層塗抹法を用いることで解決した。厚層塗抹法は、グリセリンに浸漬した厚手のセロファンを多量の検体（沈渣量として80 μ L程度）の上に被せて、上から適宜圧偏し、グリセリンの浸透を待ってから（約20分）観察する方法で、本来は検便で回虫卵を観察するために開発された手法である。

クリプトスポリジウム等原虫類の検査は上記の回虫卵検査用の標本作成の過程で得られる上清を用い、蛍光染色することで併せて行うことができる。

A. 研究目的

キムチ等の食材からの回虫等の寄生虫卵ならびに原虫（オーシスト）の迅速検出方法の構築を行い、手順書としてまとめた。また、回虫卵を用いた回収試験を行った。

B. 成果：検査法手順書

1. 材料、実験器具、試薬等の準備

<材 料>

- 1) キムチ: 市販パック入り(400~600g)のものを使用した。
- 2) 虫卵: 添加試験用の寄生虫としてブタ回虫卵を使用した。ブタ回虫卵は感染ブタの糞便よりシヨ糖浮遊法で精製し、0.1%Tween80 溶液で約 10 個/40 μ l および 100 個/40 μ l の濃度に調整した。

<実験器具類>

- 1) 連続遠心機(KOKUSAN 社製、型式:H-112)
- 2) 定量送液ポンプ(EYELA 社製、型式:RP-1000)
- 3) 顕微鏡(一般の生物顕微鏡で可)
- 4) 5L ビーカー(最低 3 個を使用する。ポリプロピレン製)
- 5) 送水チューブ(TYGON チューブ、SAINT-GOBAIN 社製、規格 R-3603)
- 6) 2×2 mm および 1×1 mm 金属メッシュ(径 20cm)
- 7) 50ml 遠心管(ポリプロピレン製)
- 8) 300ml サンプルカップ(プラスチック製)
- 9) 10ml ピペット(プラスチック製)
- 10) 10ml ピペット用ゴム球
- 11) 2ml スポイト(プラスチック製)
- 12) 洗浄瓶(プラスチック製)
- 13) ビニール袋(厚手のもの、240mmX170mm、0.08mm 厚)
- 14) 竹ぐし(長さ 15-20cm)
- 15) ガーゼ(30cmX30cm)
- 16) セロファン紙(28mmX26mm、20~24 μ m 厚)
- 17) スライドグラス

<試薬類>

- 1) 10%ローレス 12 溶液: Laureth12(ポリオキシエチレンラウリルエーテル(日本エマルジョン社)50gを蒸留水で溶解し 500ml に調整。
- 2) 0.1%Tween80 溶液: Tween80(SIGMA)を蒸留水で 10%に希釈した溶液を保存溶液とし、使用時に蒸留水で 100 倍希釈し 0.1%に調整。
- 3) 比重 1.20 のシヨ糖溶液: シヨ糖 500gを蒸留水で溶解し 1L に調整する(蒸留水 650ml)
- 4) 比重 1.10 のシヨ糖溶液: シヨ糖 250gを蒸留水で溶解し 1L に調整。または、比重 1.20 のシヨ糖液に等量の蒸留水を加え完全に混合
- 5) 6%フェノール溶液: フェノール(結晶)を秤量し、6g を蒸留水で溶解し 100ml に調整。
- 6) 3%マラカイトグリーン溶液: 色素粉末 3g を蒸留水で溶解し 100ml に調整する。

2. キムチからの寄生虫・原虫類の検査手順の検討

虫卵等の検出には以下の基本操作の効率的な組み合わせが必要と考えられる。

	目的	作業内容	必要器材等
1	分離	食材を多量の洗浄液で洗浄し、葉菜類の表面に付着している虫卵等を剥離	界面活性剤を含む洗浄液 攪拌装置(超音波洗浄器??)
2	濃縮	多量の洗浄液からの粒子の回収	遠心沈殿機
3	精製	固有の比重を利用して目的とする虫卵等を分離・精製する	遠心沈殿法 / 浮遊法
4	検出	顕微鏡下で虫卵の確認	一般染色 / 特異染色

当該研究では、一義的に回虫卵を検出対象として上記目的に適した工程を適宜選択し、回虫卵を用いた添加回収実験により効率を検証した。具体的には、これまでの研究実績等を踏まえて選択した下記の各処理方法を連結して試験方法として検討した。なお、当該検査法において、検査の迅速・簡便化に最も寄与する処理工程は連続遠心沈殿法と厚層塗抹法の導入と考えられる。

	目的	選択処理・器材等
1	分離	検査対象がキムチであることから、回収作業では多量の夾雑物の発生が予想される。そこで、300g の試料量に対して5L 程度の界面活性剤を添加した洗浄液の使用が必要と判断される。また、界面活性剤には Tween 80 ならびに米国 FDA の推奨するローレス 12 を選択した。 当該研究では実験の都合上から食材の洗浄を攪拌に留めたが、マニュアルには安全を見越して超音波洗浄装置による洗浄を推奨・紹介した。
2	濃縮	5L を超える液量の洗浄液から迅速に懸濁粒子を回収するために、連続遠心機を選択した。また、遠心機への連続的な送液用ポンプとしてペリスタル型定量送液ポンプを採用した。
3	精製	キムチ洗浄液に含まれる多量の懸濁物質は後の顕微鏡観察に大きく影響することから、密度勾配遠心法を適用して夾雑物の排除に努めた。しかしながら、本方法では野菜くずを起源とした多量の夾雑物の混入は防げないものと考えられる。
4	検出	多量の夾雑物と共に回収される虫卵の顕微鏡観察方法として検便用に関連された厚層塗抹法の適用を検討した。

C. 結果

- 1) 食品キムチの寄生虫汚染検査法の検討
- 2) 5Lビーカーに5Lの水道水を入れ10%ローレス12溶液を50ml加えて0.1%ローレス12溶液を調整した。以下、これをキムチの洗浄液として使用した。別の5Lのビーカーに2Lの洗浄液を入れた。キムチを300g秤量し、2Lの洗浄液に入れた。容器に付着した試料もすべて洗浄液(0.1%ローレス12溶液)で洗い流し、これに加えた。
- 3) 1分間ほど攪拌した後、金属メッシュ(網目:2×2mm)でろ過し、ろ液を別の5Lビーカーに受けた。メッシュ上の野菜片を元のビーカーに戻し、さらに2Lの洗浄液を加えて1分間ほど攪拌した後、同様にして2回目のろ過を行った。メッシュ上に残った野菜片をすすぎ洗いした。300gのキムチに含まれる野菜片は多量なため、3回に分けてメッシュ上ですすいだ。洗浄液は泡立ちやすいが、消泡には70%エタノールのスプレーが効果的であった。
- 4) 次に、1×1mmの金属メッシュにガーゼを1枚被せ、2)で得られたろ液をろ過した。ビーカー内の付着物や泡を残さないように2)の時と同様にして内壁を充分すすいだ。メッシュ上に残る泡はエタノールをスプレーすることで消泡し、ガーゼ上に残る残渣もよくすすいだ。
- 5) 連続遠心機の準備を行う。遠心機のローターはカップ状になっており、予めその形状に合うように底部を平らに成形した厚手のビニール袋を被せ、指先でローター内壁に密着させた。この時指先でビニール袋を傷つけないように注意するとともに、遠心器のフタより下に伸びる注水ノズル先端がビニール袋にあたらないように設置した。特に、底部が平らになるように注意した。
- 6) 連続遠心機にフタを被せ、注水ノズル、に送水チューブを接続し、チューブの中間に定量ポンプカセットを組み込んで、チューブ末端をビーカーに入れた。末端がビーカー底部に達していることを確認した。
- 7) 定量ポンプを作動させ、高速(100rpm)で、勢い良く送水しチューブ内の空気を追い出した。チューブがキムチ洗浄液で満たされたことを確認し、回転数を30rpmに下げた。遠心機を作動させ、遠心機の回転数を3,000rpmにセットした。遠心開始後はローター内に設置したビニール袋が破損していないか、1分間ほど異常音に注意した。
- 8) 連続遠心の開始後は試料水の水位が下がるので露出したビーカー内壁およびチューブの付着物をすすぎ洗いした(よそ1Lの送水毎に100mlほどの洗浄液ですすぐ)。遠心終了少し前にはビーカーを30度ほど傾けてビーカーの底部をすすぎ洗いしながら、すべての洗浄液を送水した。
- 9) 送水が完了したら定量ポンプを停止し、次いで遠心機を停止する。遠心機のフタのノズルよりチューブをはずし、続いてフタをはずした。フタ下に伸びるノズルを洗浄瓶で軽くすすいだ。ローター内に収容したビニール袋を注意しながら取出し、漏れがないか確認した。

- 10) 指先で外側からビニールをはさみ、内壁を揉み洗いして付着物を剥離させた。濃縮洗浄液が溜まっている部分(下側1/3ほど)をよく揉み解してから、回収液を300ml容量のプラスチックカップに移した。濃縮回収液を移し終えてからさらにビニール袋を揉み洗いし、洗浄液でビニール袋の内側を2回(各10mlほど)すすぎ、すすぎ液を回収した。
- 11) 回収した濃縮洗浄液を50ml遠心管4本に分注した。液量により適宜遠心管本数を増やした。プラスチックカップ内壁は少量の洗浄液ですすぎ、すすぎ液は遠心管へ移した。
- 12) 3,000rpm、10分間、室温(20℃程度)で遠心した。
- 13) 沈渣は浮遊しやすいので注意しながら10mlピペットで上清を除去した。上清を10ml残り、さらに3,000rpm、5分間、室温で遠心し沈さを固めた。
- 14) 丁寧に上清を除去し、竹ぐしを用いて沈渣を崩し、均一にした。比重1.20のショ糖溶液を加えて20mlに調整し、10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し、均一な懸濁液を得た。
- 15) 3,000rpm、10分間、室温で遠心した。
- 16) 虫卵の比重は1.16から1.20の範囲にあることから、虫卵はショ糖層表面付近に浮遊していることが想定され、ゴム球をつけた10mlピペットを用いて、ショ糖層表面から吸取るように15ml程度回収し、新しい50ml遠心管に移した。表面付近には微小なゴミが浮遊しているが、それらを回収するように工夫した。沈渣は浮遊しやすいので吸い込まないように注意した。
- 17) 15mlづつショ糖液が入った遠心管4本に0.1%Tween80溶液を加えて液量を40mlとなるように調整した。10回ほど転倒混和した後、新しい遠心管を用いて再び20mlづつ分注を行い(計8本の遠心管に20mlづつ分注したことになる)、これに再び0.1%Tween80溶液を加えて40mlにとなるように調整し、10回ほど転倒混和した。
- 18) 3,000rpm、15分間、室温で遠心した。
- 19) 数mlを残してピペットで上清を除去した。沈渣をスポイトで崩しながら均一にし、8本の遠心管の沈渣を1本にまとめた。残りの7本の遠心管には2-3mlの0.1%Tween80溶液を加えて内壁をボルテックスミキサーで攪拌・洗浄し、洗浄液を遠心管に回収する。回収液をボルテックスミキサーで充分混和した。
- 20) 3,000rpm、10分間、室温で遠心し、沈渣を得た。
- 21) 沈渣を竹串等で崩し、比重1.10のショ糖溶液を加え20mlに調整した後、10秒間ボルテックスで攪拌し、均一な懸濁液を得た。
- 22) 3,000rpm、10分間、室温で遠心した。
- 23) 操作14)と同様に、ショ糖層の表層から15ml程度を回収し、新しい50ml遠心管に移し、沈渣と上清を分けた。
- 24) 原虫検査試料(上清)
- 24-1) 回収上清に0.1%Tween80溶液を加えて40mlとなるように調整した。10回ほど転倒混和した後、新しい遠心管に20mlづつ分注し、再び0.1%Tween80溶液を加え

て液量を 40ml に調整する. 10 回ほど転倒混和した。

24-2) 3,000rpm、10 分間、室温で遠心した。

24-3) 上清をピペットで除去し、得られた沈渣を原虫類の検査試料とした。

25) 虫卵検査試料(沈渣)

25-1) 沈渣に 0.1% Tween80 溶液を加えて液量を 20ml に調整し、ボルテックスミキサーで十分に浮遊・懸濁した。

25-2) 3,000rpm、10 分間、室温で遠心した。

25-3) 上清をピペットで除去し、回収した試料は虫卵検査用に供した。

<セロファン厚層塗沫法>

1) 厚手のセロファン(20~23 μ m 程度の厚さ)を 22×22mm に切り、1 枚ずつ浸漬液(6%フェノール溶液 500ml、グリセリン 500ml、3%マラカイトグリーン溶液 5ml)に入れ、1 昼夜以上浸漬させた。

2) あらかじめ、ピペットチップを先端から 5mm あたりで切って口径を広げておいた、200 μ l 用のピペットで沈渣試料を 80 μ l 程度とり、スライドグラス上に載せた。ピペットの先端で直径 1cm 程度の広さに試料を広げた。

3) 浸漬液中よりセロファン片を取り出し、軽く液を落としてから気泡を作らないように試料の上に被せた。セロファン片の上からゴム栓で強く圧して試料を広げた。その際、試料がセロファンの外にはみ出さないように注意した。

4) 20 分間ほど放置し、セロファン片の表面がやや乾燥したところで、100 倍の倍率で鏡検した。

回収実験

回虫卵の添加回収実験

キムチからの回虫卵の回収率を求めるため、濃度調整した虫卵浮遊液を用いて 10 個/300g キムチ、あるいは 100 個/300g キムチとなるようにキムチに滴下・混合した。回収実験は 3 回繰り返し、虫卵の回収率を求めた。

また、虫卵検査を含め、本検査法の経験のない 3 人の協力者に本検査法に沿った虫卵検出を依頼し、期待される回収率が得られるかを検討した。なお、虫卵観察には多少の経験が必要であることから、事前に虫卵陽性標本を供覧した。

1) 所要時間

本検査法の洗浄、濃縮および検出の大きな 3 つの行程について、それらに要する時間を測定しながら検査を進めた。まずキムチの洗浄から連続遠心で洗浄濃縮液を回収するまでに要

する時間はおよそ1時間、さらにシヨ糖浮遊法による虫卵精製で顕微鏡検査用試料を得るまでにおよそ2時間、の計3時間を要した。その後の顕微鏡検査に要する時間は、80 μ l程度の試料の場合、5-10分を要したことから、用いた材料から得られた虫卵検査用の沈さ量が0.4~0.8mlであったことを踏まえると1~2時間が顕微鏡検査の所要時間と考えられた。即ち、300gのキムチを洗浄して、そこにあった虫卵の数を確定するにはおよそ5時間を要した。一方、試験協力者による検査全体の所要時間は、試料を得るまでの前処理に要する時間が3~4時間、その後の顕微鏡による虫卵検出には2~3時間を要した。

2) 虫卵回収率

表-1に300gのキムチへの添加虫卵数と回収率の関係を示した。平均10個(SD=4.0、n=3)の虫卵添加条件における平均回収虫卵数は6個(SD=1.0、n=3)で、平均回収率は60%と算出された。また平均93.3個(SD=11.0、n=3)の虫卵添加条件における回収虫卵数は62.0個(SD=5.3、n=3)で、平均回収率は66.5%と算出された。セロファン厚層塗沫法では1つの標本に80 μ lもの沈渣を塗沫することが可能で、倍率100倍の顕微鏡下で虫卵の形態を十分に確認することができた。なお、観察には原法が示すように、やや試料を乾燥させ試料の厚さを均一にするとともに、十分なグリセリンにより透徹させることが要点と思われた。一方、試験協力者3人が行った検査の平均回収虫卵数は54.0個(SD=9.6、n=3)で、平均93.3個(SD=11.0、n=3)の添加虫卵数に対する回収率では57.9%と算出され、ほぼ経験者に匹敵する検出率が得られた。

D. 結論

食品キムチは香辛料、増粘剤などの多種類の添加物が含まれることから、試料量300gからの検出には多量の洗浄液を用いた方法が適しているものと判断し、そのための検出手順を考案した。本検査法は所要時間としておよそ5時間、検査に慣れればさらに短縮は可能と思われた。添加回収実験の結果はおよそ10個あるいは100個の添加実験において60%以上の回収率が得られた。未経験の試験協力者による検査でもほぼ同等の成績が得られたことから、本試験法は高い回収率が期待できる検査法と判断され、一般検査室への導入も容易であると判断された。

本検査法の特徴として、基本的にシヨ糖浮遊法に基づいて試料の精製を行っていることから、厳密な比重調整を行えば原虫類のシスト/オーシストにも適用が可能である。また、厚層塗沫法は本来糞便検査法として開発された方法であるが、食品から生ずる多量の沈渣の検査法としても極めて有用であることが判明し、検査時間の大幅な短縮につながった。

また、寄生虫卵に限った検査では、『食品キムチの寄生虫汚染検査法』の操作20)までとし、得られた試料を顕微鏡観察に供することができる。

表-1、本検査法における虫卵回収率

試験者	A.添加虫卵数 平均値 (SD)	B.回収虫卵数 平均値 (SD)	平均値からの回収率 (B/A)
分担研究者	10 個 (SD=4.0, n=3)	6 個 (SD=1.0, n=3)	60.0%
	93.3 個 (SD=11.0, n=3)	62.0 個 (SD=5.3, n=3)	66.5%
未経験 試験協力者	93.3 個 (SD=11.0, n=3)	54.0 個 (SD=9.6, n=3)	57.9%

E. 健康危機管理情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産のの出願

なし

キムチを含む数種の食品に対するクリプトスポリジウムの添加回収実験

協力研究者 古屋宏二 国立感染症研究所寄生動物部第一室

「感染症新法」の第5類に指定されているクリプトスポリジウム症の病原体 *Cryptosporidium* の主な伝播様式は飲料水などを介した水系感染であるとされている〔1〕。そのため、国は予防対策として、水道における監視体制を整備してきた〔2〕が、海外では野菜やジュース類を介した感染も報告〔3, 4〕されており、食品における監視も重視されている。食品についてのクリプトスポリジウム検査法は未だ確立されておらず、報告数も少ない〔5〕。本研究においてはクリプトスポリジウムの濃縮・分離法として免疫磁気ビーズ法を用いて、キムチを含む数種の食品に対するクリプトスポリジウム添加回収実験を行ったので、その成績について報告する。

材料および方法

1. 食品

表1に本実験に使用した4種類の市販即品とそれらの原材内容等についてまとめた。

2. クリプトスポリジウムオーシスト

2.5%重クロム酸カリウム液中に4℃保存しておいた *Cryptosporidium parvum* オーシストを蔗糖遠心沈殿浮遊法〔6〕で分離・精製し、血球計算盤を使ってオーシストの数を算出、添加回収実験に供した。

3. 食品に対するオーシストの添加と回収法

表2に食品へのオーシストの添加と回収操作についてまとめた。

各食品に対し、計2回のオーシスト添加実験を行った(表3の実験IとII)。また、オーシスト無添加の食品についても同様な実験を行った(表3の実験III)。食品洗浄液中 *C. parvum* オーシストの捕捉には、Dynal の Dynabeads (Norway) を用い、ユーザーマニュアルに従って濃縮・分離を行った。

4. 蛍光抗体法

FITC 標識抗一クリプトスポリジウムオーシスト単クローン抗体 (ケミコン社

製) を使った間接蛍光抗体法 [6] により回収オーシストを染色した。

5. オーシストの確認

Fluoview 共焦点レーザー走査型顕微鏡を使用して、免疫蛍光像とノマルスキー微分干渉像からオーシストの確認と数を計算した。

結果および考察

表 3 に *C. parvum* オーシスト添加回収実験の成績を示す。最も高い回収率を示した食品は 108.9% (平均) のなす漬 (1 回目: 125.2%、二回目: 92.6%)、次が 68.9% (平均) のキムチ (1 回目: 48.6%、二回目: 89.2%) であった。松前漬とマグロからの回収率はそれぞれ 6.3% (平均、一回目: 6.8%、二回目: 5.8%)、3.3% (平均、一回目: 2.0%、二回目: 4.6%) と低かった。

このように、オーシストの回収率は食品間で著しく異なり、野菜類との吸着は少ないが (ナス漬、キムチ)、魚肉・魚卵 (刺身用マグロ、数の子・するめ) とは強い吸着性があるように思われた。

キムチとナス漬の回収率に違いが認められたが、これら食品の主材である野菜類についても、種類や加工によってはオーシストの回収率に影響があったかもしれない。生鮮野菜類を用いた遠藤ら [5] の添加回収実験では、キャベツからの回収率はおおよそ 60%、イチゴからの回収率はおおよそ 23% であったと報告している。

食材表面の洗浄方法として、遠藤ら [5] は界面活性剤 (0.1% Laureth 12 液、0.01% Tween 80 液) による化学作用とスターラーや超音波による物理的攪拌の組み合わせによる方法を推奨している。小野ら [7] も、界面活性剤 (0.1% Laureth 12) を加えた PBS (pH 7.4) (0.1% gelatin および Antifoam B も含む) で洗浄攪拌、超音波処理する方法を採用している。本研究では界面活性剤 (0.01% Tween 80 液) の存在下で約 10 秒間上下に激しく振とう混和する簡単な方法を用いた。

洗浄液からのオーシストの濃縮・分離については、遠藤ら [5] は連続ローター遠心による沈殿法を用い良好な結果を得たが、本研究では、小野ら [7] が用いた免疫磁気ビーズ法により食品洗浄液からオーシストを濃縮・分離した。

免疫磁気ビーズ法は、精製抗体がコートされた超常磁性高分子ポリマービーズを使用して抗原を分離する方法である。Dynabeads の場合、*C. parvum* オーシストに対し 60~95% の高い回収率が期待できる (キット添付説明書)。*C. baileyi* や *C. muris* のオーシストについても交差反応により捕捉すると記されているが、非特異的反応については詳述されていない。今回、Dynabeads に非特異的に吸着する類円形のオーシスト様構造物をキムチ以外の 3 種類の食品 (ナス漬: 1 個/20 g、マグロ: 2~3 個/

15 g、松前漬：1～2個/13 g) から検出した (表 3)。

これらのオーシスト様構造物のサイズは $4\mu\text{m}$ 程であり、表面が平滑な (図 1-2 および 3) あるいは中央に凹んだ (図 1-4) 像として観察された。蛍光顕微鏡下では *C. parvum* オーシストの特異蛍光像 (図 1-1) との違いが判別できなかったが、蛍光像と微分干渉像の同時観察により容易に判別できた。本添加実験においては問題とならない検出数であった (表 3) が、実際の食品検査ではこの種の類円形構造物に対する鑑別作業が重要になると思われた。

現在のところ、食品に付着したクリプトスポリジウムオーシストの検査法に関する標準的な方法はなく、米国 FDA による野菜からの検出法の回収率も数%程度に過ぎないとされている [5]。本研究においては魚肉・魚卵等を含む食品からの添加オーシストの回収が非常に少ないことが判明した。キムチの場合、実験に用いた今回の材料は国内産であり、原材には魚肉等の成分は表示されていなかった。輸入キムチでは、塩から (魚介類、エビ、イワシ)、アミ塩から (エビ、イワシ)、エビ、コンブ、カニ、コンブエキス、魚介エキス、イカのごろわた・スミ、ホタテ抽出、ブタ肉などを原材に含む表示がほとんどである (スーパーマーケット調査：未報告結果)。これら輸入食品を用いたクリプトスポリジウム検査では、オーシストの食品原材料への吸着性を考慮した分離・検出方法が今後工夫・改良されるべきかもしれない。

参考文献

- [1] Smith HV, Rose JB : Parasitology Today, 6, 8 (1990)
- [2] 金子光美編：水道のクリプトスポリジウム対策，ぎょうせい，東京，1997
- [3] U. S. Department of Health and Human Services : MMWR, 45 (6), 783 (1996)
- [4] U. S. Department of Health and Human Services : MMWR, 46 (1), 4 (1997)
- [5] 遠藤卓郎編：クリプトスポリジウム等の原虫類による食品及び環境の汚染防止と感染対策に関する研究，平成9年度厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 総括研究報告書，国立感染症研究所，東京，平成10年3月，p. 分担研究報告 3-1
- [6] 国立感染症研究所レファレンス委員会他：クリプトスポリジウム症を中心とした原虫性下痢症の診断マニュアル，新日本法規出版，東京，2000，p. 1
- [7] 小野一男，木田吉人，宇賀昭二：免疫磁気ビーズ法を用いた生鮮野菜・果物類からの *Cryptosporidium parvum* の検出法，VERITAS NEWS, No. 10, (株) ベリスタス，東京，2002

表1 添加回収実験に使用した食品

食品通称名	原材	原材原産地
キムチ	白菜・大根・にら・にんじん・ねぎ・胡麻・生姜・ トマト・にんにく・漬け原材料（食塩・唐辛子・ソルビット）・ 着色料（パプリカ色素・黄4・黄5・赤106）・ 調味料（アミノ酸等）・酸味料	国内産
ナス漬 以外	長なす・小麦・漬け原材料（アミノ酸液・砂糖・ぶどう糖・ 果糖・液糖・食塩）・調味料（アミノ酸）・酸味料・ 保存料（ソルビン酸K）・香料・甘味料（ステビア）・ 着色料（青1・赤106）	長なす （中国） 国内産
刺身用 し マグロ	マグロ（角切り）	記載な
松前漬	数の子・するめ・小麦・ゼラチン・醤油・砂糖・昆布・ みりん・食塩・唐辛子・ソルビット・調味料（アミノ酸等）・ 増粘多糖類・保存料（ソルビン酸K）・着色料（赤102・ 赤106・黄4・黄5）	国内産

表2 食品への *C. parvum* オーシストの添加と回収操作

ステップ	操作内容
1	50 ml ポリプロピレン製遠心管に各食品 13~24 g を秤量
2	食品に <i>C. parvu</i> 置
4	DDT-T (0.01% m 500 オーシストを直接添加
3	室温で1時間放 Tween 80 含有滅菌蒸留・脱イオン水 ; 洗浄液) を添加、40 ml にメスアップ
5	10 秒間激しく混和後洗浄液 (W-1) を新しい遠心管に回収
6	遠心 (3,000 rpm、10 分、25°C)、上清を捨て、沈査を得る (W-1 液沈査)
7	ステップ 1 の遠心管に DDW-T を再度添加、40 ml にメスアップ
8	10 秒間激しく混和後洗浄液 (W-2) を新しい遠心管に回収
9	遠心 (3,000 rpm、10 分、25°C)、上清を捨て、沈査を得る (W-2 液沈査)
10	W-1 液沈査、W-2 液沈査に DDW-T 各 2 ml を添加、懸濁、10 ml ポリプロピレン製スピッツ管に移す
11	DDW-T 1~2 ml 程で 2 回遠心管をすすぎ、すべて SP に移す (総量およそ 8 ml)
12	SP に酢酸エチル 2 ml を添加、10 秒間激しく混和
13	3,000 rpm、10 分遠心、脂質層を含む上清を捨てる
14	ステップ 13 の沈査に DDW-T 8 ml を添加、懸濁、遠心 (3,000rpm、10 分)
15	ステップ 14 を 3 回繰り返す、沈査を洗う
16	ステップ 15 で得られた最終沈査に PBS-T (0.01% Tween 80 含有滅菌 PBS) 8 ml を加え懸濁
17	ステップ 16 の懸濁液に Dynabeads A 液 1 ml、B 液 1 ml、ビーズ 100 μ l を加え 2 時間振とう (室温)、以下の操作は Dynabeads ユーザーマニュアルに従って行う

表 3 *C. parvum* オーシスト添加回収実験の成績

食品名	実験	試料	添加オーシスト		回収オーシスト	平均回収	オーシスト様構
			g	数			
キムチ	I	24	500	243 (48.6)	68.9	0	
	II	24	500	446 (89.2)			
	III	24	0				
ナス漬	I	20	500	626 (125.2)	108.9	1	
	II	20	500	463 (92.6)			
	III	20	0				
マグロ	I	15	500	10 (2.0)	3.3	3	
	II	15	500	23 (4.6)			
	III	15	0				
松前漬	I	13	500	34 (6.8)	6.3	1	
	II	13	500	29 (5.8)			
	III	13	0				

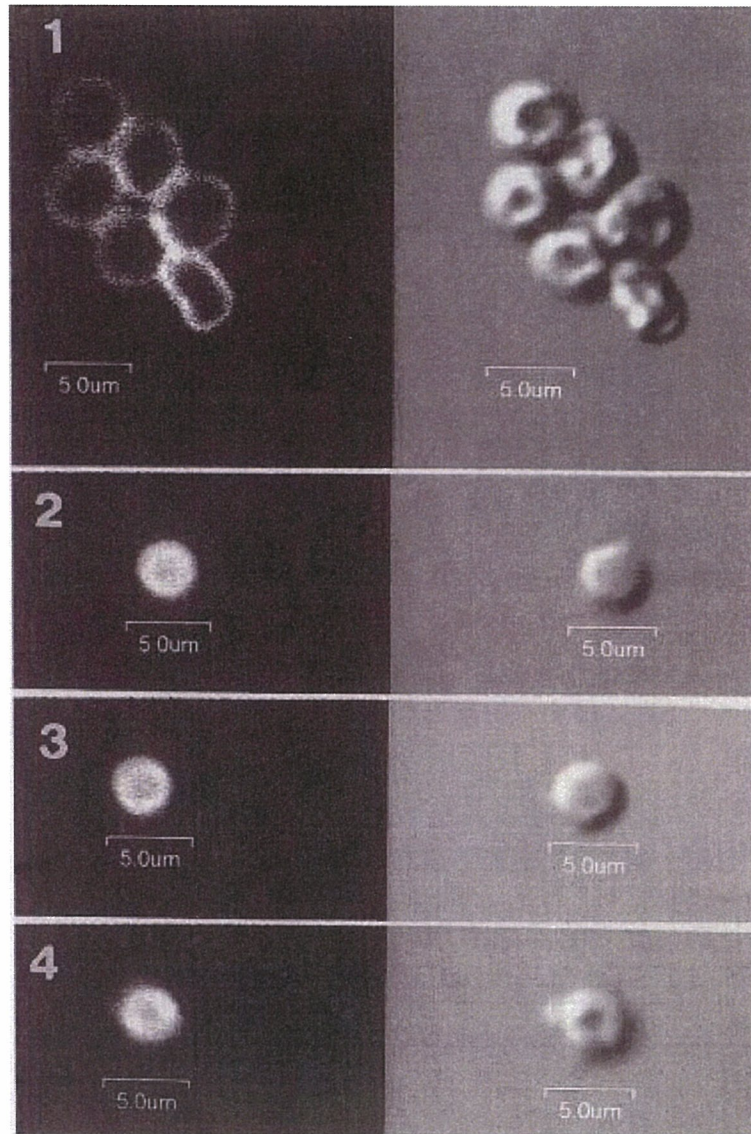


図1 免疫磁気ビーズ法により捕捉された *C. parvum* オーシスト
 およびオーシスト様構造物の免疫蛍光像（左）とノマルスキー
 微分干渉像（右）

- 1 : 添加キムチから回収された *C. parvum* オーシスト
 - 2 : 無添加ナス漬から検出されたオーシスト様構造物
 - 3 : 無添加マグロくから検出されたオーシスト様構造物
 - 4 : 無添加松前漬から検出されたオーシスト様構造物
- サイズ = μm

家畜排せつ物の堆肥化 - 基本原理と良質堆肥生産技術について -

東北大学大学院・資源動物群制御科学分野 中井 裕

堆肥化において微生物が重要な役割を担っていることは広く知られている。しかし、堆肥化過程に存在する微生物の種類や機能に関する情報は非常に限られる。この分野の研究が進んでいない原因は以下のように考えられる。

- (1) 堆肥化に関わる微生物種が多種多様であること
- (2) 堆肥化過程の多くは開放系であるため外部からの微生物の混入があること
- (3) 微生物間に共生や拮抗があり、微生物相互関係が複雑であること
- (4) 微生物が増殖する環境の物理的條件（とくに、温度、湿度、酸素濃度）が一樣でないこと
- (5) 微生物の増殖による発酵熱などにより棲息環境が時々刻々変化すること
- (6) この様な複雑な系に棲息する微生物を研究室内で培養したり解析したりする手段の確立が遅れていること
- (7) 微生物を単一の種でなく、微生物の集団すなわち「微生物群集」として、新しい観点から捉えなければならないこと

上述のように、堆肥化に関わる要因は多岐に及ぶこと、また、堆肥化の過程では不特定の環境要因が常に変動していることから具体的な解析作業は容易でない。

1. 堆肥化にかかわる生物および微生物

堆肥化にかかわる生物は極めて多様で、古細菌（アーキア）を含む細菌類から真菌（カビ）、原生動物、さらに節足動物からヒトに至る多くの種が含まれる。

堆肥化には、ミミズなどの貧毛類やヤスデなどの節足動物も関与することが知られているが、家畜排泄物の堆肥化ではこれらの生物が中心的な役割を演じることは希で、細菌類の関与が大と考えられる。

酸素の存在は原核生物の増殖に大きく影響し、原核生物は以下のように大きく分けられる。

- (1) 好気性細菌： 酸素を好む細菌であり、酸素の存在下で増殖する。
- (2) 嫌気性細菌： 酸素を嫌う細菌であり、酸素が存在しない条件下で増殖する。
酸素が存在するだけで、死滅するものもある。

(3) 通性嫌気性細菌： 酸素があってもなくても増殖する。

堆肥化過程では、強制通気を行う場合が多いことから、好气的条件と思われがちであるが、酸素は好気性細菌によって容易に消費されるため、微細環境下では、無酸素状態となることも多く、通性嫌気性菌や嫌気性菌も多数棲息している。

2. 堆肥化過程における微生物の役割

微生物はいくつかの生存戦略を持っている。その中には、他の微生物に先んじて栄養分を取るものや、他の微生物が利用しにくい栄養分を利用するものがある。また、限局的に有害環境を公的化する作用を持つものや、他の微生物の増殖抑制、殺滅したりする物質（抗生物質やバクテリオシン）を産生するものが知られている。污水处理の過程においては原生動物による細菌の捕食が見られるのが一般であるが、堆肥化過程では捕食関係が認められず、また、細菌同士の捕食も一般的ではない。

優占種になるためには、栄養分のいち早い利用が重要と考えられ、堆肥化の初期段階では易分解性（いぶんかいせい）の有機物（炭水化物、脂質やタンパク質）が消費され、堆肥化の後期に至り難分解性の有機物（セルロースやリグニン）が使われている。易分解性の有機物が速やかに分解されることは堆肥の保存性や肥料成分の安定性の面で大きなメリットをもつ。すなわち、保存時の腐敗が回避されること、また、使用した際に再発酵が起きにくく、余分な発熱などが認められない利点がある。

また、植物成長阻害物質や悪臭物質も堆肥化過程で分解されることが知られており、これも大きなメリットである。

有機物の分解の結果、発酵熱が生じ、温度の上昇が起こる。温度上昇は堆肥化過程において様々な影響を及ぼす。

- (1) 水分の揮散： 水分の減少によって汚物感がなくなるとともに、運搬しやすくなる。しかし、一定の割合以下にまで水分量が低下すると合わせて微生物活性が低下することが知られている。
- (2) 悪臭の揮散： 悪臭が揮散により除去されると堆肥としては扱いやすくなるが、堆肥化施設周辺の住民などに対しては重大な問題となる。悪臭の揮散のコントロールや悪臭の捕捉や処理は重要な技術である。
- (3) 植物および動物・ヒトに対する病原菌の殺滅： 肥料としての利用を考えた場合、植物病原菌の殺滅は非常に重要である。また、戻し堆肥として敷料として

利用することもあるため、家畜に対する病原菌の除去も重要である。取扱者の安全性を確保するために、人獣共通感染症の病原体の殺滅にも配慮する必要がある。

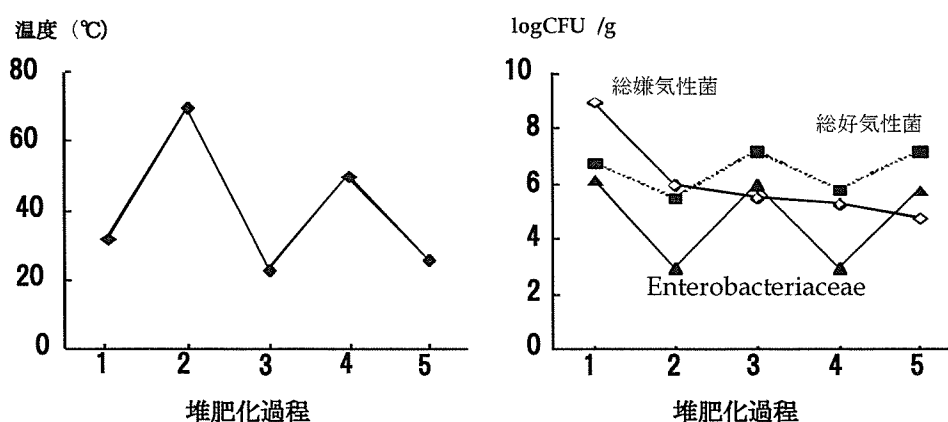
- (4) 動物およびヒトに対する寄生虫卵の殺滅： 上記の病原菌同様に殺滅する必要がある。幸いにして、一般的に病原菌や寄生虫は熱に弱いため、堆肥化過程の微生物呼吸による発熱により、殺滅されることが多い。
- (5) 雑草の種子の殺滅： 輸入粗飼料も多く使用されていることから、とくに外来の雑草種子の殺滅は重要である。

3. 堆肥過程の微生物群集の変化

(a) 培養法による微生物群集の観察

堆肥施設における温度変化や微生物群集の変化について以下に例示する。図1に養豚場の横型のスクープ方式の堆肥処理における温度変化と微生物群集の変化を示す。スクープ方式とは投入した糞を水分調整資材と混合しながら攪拌機を用いて前進させ

図1 スクープ式堆肥化過程における温度と細菌数の変



て発酵を進ませる連続発酵方式で、試料の下部からの通気を行っている。この装置では1次発酵終了後に尿汚水を散布することから発酵温度の上昇が2回見られる。

嫌気性菌は堆肥化の進行に伴って暫時減少する。一方、好気性菌とEnterobacteriaceae (腸内細菌科)は発酵に伴う2回の温度上昇時に減少し、品温低下後に再び増加している。図1に示した値は培養を37°Cで行った時のもので、もっぱら中温付近(30°Cから37°C程度)で増殖する中温菌の菌数変化が示されている。この堆肥化過程の最高温度は55°C程度であったため、多くの中温菌は死滅するものと判断さ