

平成25年度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）
非動物性の加工食品等における病原微生物の汚染実態に関する研究
分担研究報告書

寄生虫による汚染に関する研究

研究分担者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	荒川京子	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	荒木 潤	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	柴田勝優	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	市村静江	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	堀内朗子	日本食品衛生協会食品衛生研究所
協力研究者	生野 博	(株)ビー・エム・エル細菌検査部
協力研究者	平 健介	麻布大学生命・獣医学部

研究要旨：我が国ではかつて国民の半分以上が回虫などの土壌媒介寄生蠕虫に感染していたが、現在では感染者は激減した。しかしながら、土壌媒介寄生蠕虫による国内感染は、発生が少ないながら継続しており、しかも感染経路あるいは原因食品等については推定の域を出ない事例が多い。そこで本年度は、まず文献資料の検索等を行い、最近の本症の発生状況の詳細を調べた。次に、食品等の異物検査を実施している機関の検査データを入手解析し、寄生虫による非動物性食品の汚染状況を検索した。しかしその検査データからは、非動物性食品における寄生虫卵汚染事例は確認されず、少数ながら発生する本症の原因食品を明らかにすることができなかった。感染源となる非動物性食品の特定は必要であることから、その作業を効率的に実施するため、新たにストマッカーを用いる非動物性食品の寄生虫卵検査法の導入を検討した。次年度以降はこの検査法も活用して、食品の汚染実態調査による本症感染源の特定を進める予定にしている。

1. 非動物性食品を感染源とする寄生虫症例、特に回虫症例の発生状況に関する文献等の資料検索

A. 研究目的

消化管に寄生する回虫、鉤虫、鞭虫は食品媒介の人体寄生虫であるが、これらの寄生虫はその感染経路から土壌媒介寄生蠕虫とも呼ばれる。土壌媒介寄

生蠕虫の虫卵が感染者の糞便に混じて野菜などの非動物性食品を汚染し、更にこの汚染食品が加熱なしで喫食された場合に、人への新たな感染が起こる。我が国では特に第2次世界大戦の敗戦直後に、下肥（しごえ：ヒトの糞尿を肥料としたもの）の利用が一般的であったことから、60%もの国民が回虫に感染していた。その後、学校や職場での衛生教育・

集団検便・集団駆虫の実施，尿尿（ししょう）処理施設の整備，化学肥料の普及などの対策が功を奏して，感染者は激減した．しかしながら，土壌媒介寄生蠕虫による国内感染者の発生はゼロにはなっておらず，しかも感染経路あるいは原因食品等については推定の域を出ないものが多い．そこで，文献資料の検索等を行い，最近の本症発生状況の詳細を調べた．

B. 研究方法

検索用の文献資料として日本臨床寄生虫学会誌（1990年/第1巻～2013年/第24巻の24年間/24巻）を用いた．これを通覧して，今年度は土壌媒介寄生蠕虫の中から回虫に的を絞り，回虫感染の報告数・症例数をカウントした．また回虫症例の原因として推定・議論された感染源について，各論文から情報を抽出した．なお本誌は，日本臨床寄生虫学会の学術大会で発表された全演題が，症例報告等の形式で収録されており，我が国で見られる寄生虫疾患の発生状況をその時々で俯瞰するのに，最も適切な資料と考えられた．これに加えて，臨床検体の検査会社であるBMLに依頼し，2000年以降に全国の医療機関で診断された回虫感染の症例数について提供を受けた．

C. 研究結果

日本臨床寄生虫学会誌24巻に掲載された論文は923編で，このうち33編が国内での日本人の回虫感染事例を報告し，症例数の合計は139件であった．興味深い事に報告数・症例数は，2003年以降に激減した．しかし2012年にも1例の報告があった（表1）．

BMLの資料では，2011年に3件（日本人1件，外国人2件）の回虫症例を認めた．また同年に鉤虫では3件（日本人1件，外国人2件）の症例を，鞭

虫は3件（日本人1件，外国人2件）の症例を認めた（表1）．

D. 考察

日本臨床寄生虫学会誌に報告された症例およびBMLが診断した件数から推察すると，回虫などの土壌媒介蠕虫の感染は，少数ではあるが，最近でも継続して我が国で発生していることが伺えた．その原因として推定される感染源に関しては，下肥利用の自家菜園で栽培した無農薬野菜・有機野菜をあげる論文が目立った．生野菜を毎日嗜好して喫食していたことを原因とする報告もあった．また1報だけであるが，1年前から生姜の生食を毎日続けるように食習慣が変化し，これを感染の原因と推定した論文も認めた．

興味深い事に，回虫の報告数・症例数は2003年以降に大きく減少した．2000年に農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（いわゆる「日本農林規格」，以下JAS法）が改正された．その結果，有機農産物に関する基準が整備され，下水処理汚泥や人糞を肥料として使用することが原則禁止された．また，家畜・家禽の排泄物についても，肥料としての利用は発酵・乾燥・焼成したものに限定された．この法改正により，市場で流通する有機野菜の寄生虫卵汚染が激減し，その結果，症例数が大きく減少したと考えられた．その一方で，少数ながら感染者の発生が継続している背景として，自家菜園での下肥使用が引き続き行われ，その結果，野菜の寄生虫卵汚染は継続している可能性が推測された．この推測を検証するには，実際に下肥を利用した自家菜園の野菜を検査し，寄生虫卵の汚染を証明する必要がある．この作業をどの地域でいつ実施するか，検討を進める予定である．

表1. 日本臨床寄生虫学会誌とBMLで報告された土壤媒介寄生蠕虫症の事例数

年	巻	日本臨床寄生虫学会誌			BML		
		文献 総数	回虫症 文献数	回虫症 症例数	回虫症 症例数	鉤虫症 症例数	鞭虫症 症例数
1990	1	59	2	3	-	-	-
1991	2	44	3	5	-	-	-
1992	3	56	3	3	-	-	-
1993	4	69	3	3	-	-	-
1994	5	64	2	2	-	-	-
1995	6	59	3	3	-	-	-
1996	7	33	1	1	-	-	-
1997	8	39	0	0	-	-	-
1998	9	35	4	55	-	-	-
1999	10	41	1	1	-	-	-
2000	11	36	0	0	19(6)	15(5)	10(13)
2001	12	42	8	60	27(17)	0(25)	7(17)
2002	13	31	0	0	31(10)	1(32)	6(23)
2003	14	26	2	2	22(4)	1(8)	5(12)
2004	15	26	0	0	19(3)	1(8)	3(10)
2005	16	26	0	0	19(1)	0(9)	5(4)
2006	17	31	0	0	17(1)	-	4
2007	18	19	0	0	12(1)	-	5(2)
2008	19	39	0	0	11(4)	1(4)	7(3)
2009	20	29	0	0	3(2)	2	7(1)
2010	21	33	0	0	7(2)	1(1)	5(2)
2011	22	21	0	0	1(2)	1	7
2012	23	32	1	1	-	-	-
2013	24	33	0	0	-	-	-
合計		923	33	139	188(53)	23(92)	71(87)

BMLの症例数: 日本人(外国人)

E. 結論

回虫症を始めとする土壤媒介寄生蠕虫症が、現在でも日本国内で発生しているとの結論が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. **Sugiyama H.** Foodborne parasitic helminthiasis in Japan: an update. 中国畜産獣医学会家畜寄生虫学分会第12次学術検討会. Zhengzhou, China. November, 2013 (Symposium).

2. 非動物性食品の寄生虫汚染実態調査

A. 研究目的

回虫症を始めとする土壤媒介寄生蠕虫症が、現在でも日本国内で発生していることから、回虫など食品媒介寄生虫の虫卵による非動物性食品の汚染が継続している可能性が推測された。そこで、食品等の異物検査を実施している機関の検査データを手解析し、汚染実態を調べた。

B. 研究方法

公益財団法人・目黒寄生虫館では、食品等から検出された異物の検査依頼および鑑定依頼を引き受けてきた。検査の依頼者は食料品製造に携わる企業や食品検査機関の他、学校などの教育機関、地方公共団体、更に一般市民となっている。この異物の検査・鑑定依頼に対する検査の記録（1990年～2008年の19年間）を再整理し、非動物性食品における寄生虫の汚染実態を調べた。

まず依頼検体をその種類から、非動物性食品、動物性食品、人体・動物および環境由来の3つに大別した。次に非動物性食品および動物性食品と判定された検体を、公益財団法人日本適合性認定協会（JAB）の食品分類表を活用した朝倉ら（2013）の分類に従い、10のカテゴリーに振り分け、異物の検査・鑑定依頼が多い食品群を明示した。更に非動物性食品から検出された異物を、人体寄生虫とそれ以外に2分し、寄生虫種別の検体数を求めた。

C. 研究結果

目黒寄生虫館は1990年～2008年の19年間に、合計2,657検体の検査・鑑定依頼を受けていた（表2）。このうち非動物食品が175検体（5.9%）、また動物性食品は1,820検体（68.5%）、人体・動物および環境由来は662検体（24.9%）であった。非動物性食品に関する検査・鑑定依頼の件数は最も少なかったが、この中で最も件数の多い検体は、野菜・果実等で83検体（非動物性食品の47.4%、朝

倉らの区分2)，次いで海藻の44検体（25.1%，区分），更に穀類・いも・豆の32検体（18.3%，区分1）の順であった。

この非動物性食品のうち，人体への感染性を持つ寄生虫が検出された検体数は11件で，非動物性食品の検体のうち6.3%を占めるに過ぎなかった。また検出された寄生虫は総てアニサキス（*Anisakis* 属線虫および *Pseudoterranova* 属線虫）であった。その内訳をみると，*Anisakis* 属線虫が検出された検体は各1検体ずつで，米飯（弁当，区分1），マーガリン（区分8），粉末調味料（区分10）であった。*Pseudoterranova* 属線虫が検出された検体は，豆腐（2検体，以下は1検体ずつ），米飯（ふりかけご飯），パン（以上が区分1），ほうれん草，キムチ，白滝（以上が区分2），ワカメ（炊き込み用製品，未区分）であった。

なお，食品媒介寄生蠕虫の「虫卵」を目的に検査依頼された検体として，キムチ14検体，乾燥ネギ1検体（いずれも区分2）を認めたが，これらは総

表2. 目黒寄生虫館の異物の検査・鑑定依頼

項目・ 区分(大分類)	件数	人体寄生性	
		<i>Anisakis</i>	<i>Pseudo- terranova</i>
非動物性食品	175	3	8
1 穀類, いも, 豆	32	1	4
2 野菜, 果実等	83	-	3
3きのこ	2	-	-
8 菓子, 糖, 油脂	3	1	-
9 嗜好飲料	9	-	-
10 調味料	2	1	-
* 海藻	44	-	1
動物性食品	1820	235	229
4 魚介類	1712	226	192
5 肉類	100	8	37
6 卵	8	1	-
7 乳類	0	-	-
その他	662	-	-
計	2657	238	237

て寄生虫卵陰性であった。

D. 考察

目黒寄生虫館が実施した異物の検査・鑑定の記録（19年間）を検索したが，日本国内で発生を続ける回虫症など土壌媒介寄生蠕虫症の有力な感染源を見出すことはできなかった。非動物性食品へのアニサキスの汚染例が見られたが，これは食品の処理・調理の過程における交差汚染が原因と考えられた。

東京都健康安全研究センターでは，市場に流通する野菜の寄生虫汚染を継続的に調査している。最近公表された直近（2008年5月～2013年1月）の検査成績（村田ら，2013）では，国産野菜54検体，輸入野菜274検体について検査したと記している。その結果，国内野菜は総て陰性であったが，輸入野菜のショウガ（根菜類，中国産）1検体からブタ回虫の含子虫卵（運動性あり）が検出された。この成績は，特にJAS法改正以降，国内の土壌媒介寄生蠕虫症の感染源として，海外の流行地から輸入される野菜が重要であると示唆するものと考えられた。生姜を長期間生食し続けた回虫症例も報告されていることから，特に根菜類には注意が必要と考えられた。ただし，植物検疫法で土の輸入が禁止されていることから，根菜類は輸入時に十分洗浄されていると聞く。従って，たとえ寄生虫卵による汚染があっても，その程度は極めて軽微なものと考えられた。

E. 結論

回虫症を始めとする土壌媒介寄生蠕虫症の感染源は，国内の非動物性食品ではなく，海外の流行地から輸入される野菜（特に根菜類）ではないかとの示唆を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表および学会発表共になし。

3 .非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法と問題点に関する文献的検討

A. 研究目的

野菜等を汚染する寄生虫卵の検出法については、我が国では 1950 年代に盛んに検討されていた。しかし最近では、食品衛生検査指針記載の方法により検査が実施されることが多く、食品等の検査機関において、試験法を再検討した上で検査を実施することは殆どないと考えられる。例外的に、キムチを汚染する寄生虫卵の検出法が検討されている^[2]。この検討が行なわれた平成 17 年には、輸入キムチの寄生虫卵汚染の問題が発生した。その際、厚労省から発出された通知による試験法との関連で、検出法の検討が積極的に実施され、それらの方法による検出感度が明らかにされたという経緯がある。

非動物性食品を汚染する寄生虫卵を迅速・簡便に検出するには、従来の方法を改良し、また新たな方法を開発する必要もあると考えられた。その前提として、検査方法に関する国内外の文献を改めて収集し、内容を検討・整理した。

B. 研究方法

野菜を汚染する寄生虫卵の検出法について、PubMed 等で文献の検索と収集を行った。得られた文献を取捨選択し、文末に掲げた報告について、詳しい検討を行なった。以下の「結果」および「考察」では、これらの文献を引用しながら記述を進めた。なお引用文献は、右肩に示した。

C. 研究結果

食品衛生検査指針^[1]および平成 17 年度厚労科研「輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究」総括・分担報告書^[2]も引用文献として採用した。これらの文献資料を一覧すると、食品汚染の寄生虫卵を検出するプロセスは、汚染食品からの虫卵の分離回

収操作と、回収虫卵の検出操作の 2 つから構築されることに気付く。

まず、野菜・果物や漬物・キムチ等の汚染食品から虫卵を分離するという操作については、いずれも水あるいは界面活性剤等を用いてサンプルの表面をブラシなどで洗う^[1,3-7]、振り洗いする^[8,9]、超音波を利用する^[11,12]などの手法がとられていた。しかし中には、単に水で洗うという記述のみのものもあり^[13]、洗浄のプロセスについての詳細な記述と更に比較考察をした成績はなかった。一方、洗浄液については村田らがその組成について比較検討を行い^[9]、界面活性剤と消泡剤の併用が回収率の向上に寄与することを示した。

次いで、食品から洗い落とした溶液中の虫卵の検出法については、虫卵を比重液に浮遊させて顕微鏡下に観察する浮遊法、あるいは虫卵をより効率的に沈査に集めて顕微鏡下に観察する沈殿法、のいずれかの手法が採用されていた。笛木らは、野菜や土壌の検査では回収沈渣の量が多いため、浮遊法でより効率よく検査ができるとした^[1]。また、村田は野菜・果実、有機肥料、栽培土壌及び砂場などの寄生虫卵検査法として浮遊法を採用し^[6]、更にキムチの検査法でも浮遊法を採用した^[9]。食品衛生検査指針でも浮遊法が採用されている^[2]。一方で、国の内外の報告では、Klapec^[10]が浮遊法を採用している他は、おおむね沈殿法が用いられていた。

浮遊法と沈殿法との比較検討は、キムチおよび犬の糞便をサンプルとしたものがあり、キムチの検査法では沈殿法の検出感度が高いと結論されていた^[7]。一方で犬の糞便については、沈殿法の検出感度が高いとする論文^[14]と、浮遊法の検出感度が高いとする論文^[15]の両方を認めた。

D. 考察

野菜等に付着した回虫卵の調査結果は、我が国において 1950 年代初頭まで活発に報告されてきたが、

その後はほとんど見受けられなくなった。過去の報告の中でも、検査法に関する詳細な記述があるものは少なく、多くは検査結果を記すに留まっていた。この中で、食品からの寄生虫卵分離法について洗浄液の組成を検討した村田らの成績^[9]は注目された。

回収された虫卵の検出法については、食品衛生検査指針において浮遊法が採用されており、これは食品関係の検査室での汎用性が考慮された結果と考えられた。浮遊法をもとにした土壌等の検査法が検討され、またキムチの寄生虫卵汚染の検査法に浮遊法が選択された^[9]のも、この流れを汲むものである。一方で、キムチの寄生虫卵汚染問題が生じた際の検討では、沈殿法の検出感度が高いという興味深い結果が示された^[2]。相反する結論が得られているが、その理由は説明されておらず、いずれの検出法の感度が高いのか、今後の詳細な比較検討が必要である。

E. 結論

野菜等から寄生虫卵を検出する方法について文献調査を行ったところ、食品からの虫卵分離にはブラシ等による洗浄を記すものが多く、検出法については沈殿法を記すものが多かった。しかしながら、いずれの分離法・検出法が、より高い検出感度に繋がるのかについては、今後の検討による比較と確定が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表および学会発表共になし。

参考文献

1.日本食品衛生協会 (2004): 野菜・果実に付着した寄生虫卵の検出法. P.538-539. 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針微生物編, 日本食品衛生協会.

2. 遠藤卓郎ら (2006): 輸入食品の寄生虫汚染制御に関する緊急研究. p.分担研究報告 3-1-2. 遠藤卓郎編, 平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金(厚生労働科学特別研究事業)総括・分担研究報告書, 国立感染症研究所, 東京.
3. 笛木賢司 (1950): 野菜, 土壌の中に存する蛔虫卵の浮遊検査法について. 医学と生物学, 16, 58-60.
4. 清水重矢 (1952): 武蔵野市に販売される苺に付着する寄生蠕虫卵について. 医学と生物学, 24, 200-202.
5. Rude, R.A., Jackson, G.J., Bier, J.W., Sawyer, T.K. and Risty, N.G. (1984): J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 613-615.
6. 村田以和夫 (1997): 野菜・果実, 有機肥料, 栽培土壌及び砂場からの寄生虫卵検査手法. p.171-177. 藤田紘一郎・村田以和夫編, 食品寄生虫ハンドブック, 第 1 版, サイエンスフォーラム, 東京.
7. 杉山 広・川中正憲 (2013): 回虫. p.348-352. 渡邊治雄ほか編, 食中毒予防必携, 第 3 版, 日本食品衛生協会, 東京.
8. 今園義盛 (1953): 蛔虫感染経路に関する研究. 最新医学, 8, 718-729.
9. 村田理恵, 鈴木淳, 柳川義勢, 村田以和夫 (2002): イヌ回虫卵添加キムチからの効率的な虫卵検査法の検討. 東京衛研年報, 53, 10-13.
10. Jeffrey, W.B., George, J.J., Ann M.A. and Richard, A. R. (2001): BAM: Parasitic Animals in Foods, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 19, Parasitic Animals in Foods. us food and drug administration, Silver Spring.
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071468.htm>
11. Robertson, L.J. and Gjerde, B.J. (2000): Isolation and enumeration of Giardia cysts, cryptosporidium oocysts, and Ascaris eggs from fruits and vegetables. Food Prot., 63, 775-778.
12. Kłapeć, T. and Borecka, A. (2012): Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. Ann. Agric. Environ Med., 19, 421-425.
13. Morishima, Y., Sugiyama, H., Arakawa, K. and Kawanaka, M. (2007): Intestinal helminths of dogs in northern Japan. Vet. Rec., 160, 700-701.
14. Katagiri, S. and Oliveira-Sequeira, T.C. (2010): Comparison of three concentration methods for the

recovery of canine intestinal parasites from stool samples. Exp. Parasitol., 126, 214-216.

4. 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法：従来法とストマッカー法（仮称）との比較検討

A. 研究目的

文献等の検索結果から、現在、我が国で流通する非動物性食品の寄生虫卵汚染は、その程度が相当に低いものと伺われた。従って、汚染実態の調査を行うには、多数の検体を処理できる効率的な検査法の確立が求められる。食品衛生検査指針を見ると、食品から虫卵を分離するに当たっては、検体の表面を歯ブラシなどで丁寧に洗うとも記述されており、このような作業が検査時間・検査効率を左右する要因になるとも聞く。食品細菌の検査分野では、ストマッカーが機材として広く利用され、検体に付着する菌体の分離に威力を発揮している。しかし寄生虫の検査分野では、ストマッカーの利用を試みた成績は見当たらない。そこで、ストマッカー法（仮称）の性能を明らかにするための検討を行い、食品衛生検査指針にある従来法と比較した。

B. 研究方法

本検討は、ストマッカーの使用に精通している日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託した（試験検査成績書は本報告書の末尾に添付したので参照されたい）。試験にはブタ回虫を用いることとし、屠畜場に依頼して自然感染ブタから検出されたブタ回虫を感染研で入手した。虫卵を付着させる野菜には白菜を選び、試験のつど雌成虫の膣と子宮（遠位端役 1cm）からタンパク虫卵が完成した虫卵を回収して、模擬検体（虫卵添加検体）を調製した。また試験条件設定のために予備試験を実施し、ストマッカー一袋に入れる模擬検体の重量や洗浄液量、虫卵の検出法、試験に用いる虫卵数等を設定した。予備試験で得られた条件を基に本試験を実施し、従来法とストマッカー法の性能を比較した。

C. 研究結果

予備試験の結果から、1回のストマッカー法に用いる模擬検体の白菜は 50g、洗浄液量は 250ml、添加するブタ回虫卵数は 1,000 個とし、浮遊法ではなく沈殿法で虫卵を検出して虫卵数を数えた。本試験では 5 回の実験を繰り返して回収虫卵数を求めたが、従来法では 467.2 ± 100.2 （平均 \pm 標準偏差）、ストマッカー法では 375.8 ± 89.4 となった。得られた値で t 検定を行い、有意水準 5% で平均値に有意差は無いとの結果を得た。

D. 考察

本委託研究の結果から、ストマッカー法は従来法と同等の性能を持つことが明らかとなった。この方法はストマッカーが必要ではあるが、食品衛生の検査の現場では、食品細菌の検査が最も一般的であることから、ストマッカーは標準的な装備となっている。試験担当者も作業に精通しており、検査に必要な時間が短縮できることから、有望な方法と考えられる。従って、今後予定している非動物性食品の寄生虫卵汚染に実態調査では、本法も活用して多数の検体を処理し、我が国で流行が続く回虫などの土壌媒介寄生蠕虫症の感染源を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

ストマッカーを利用した非動物性食品からの寄生虫卵検出法を構築し、虫卵検出率が従来法と同等であることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表および学会発表共になし。

試験検査成績書

回虫卵検査法としてのストマッカー利用の是非 について判断するための試験

国立感染症研究所
寄生動物部 依頼

公益社団法人日本食品衛生協会
食品衛生研究所

表題	回虫卵検査法としてのストマッカー利用の是非について判断するための試験
受付番号	第 AA13-13-05803 号 (受付日 : 2013 年 11 月 27 日)
試験依頼者	国立感染症研究所 寄生動物部 東京都新宿区戸山 1-23-1
被験物質	ブタ回虫
試験項目	ストマッカーを用いた寄生虫卵回収法に関するバリデーション実験
試験開始日	2013 年 11 月 27 日
試験終了日	2014 年 2 月 27 日
資料保管場所	公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所
保管期間	試験終了後 5 年間
試験施設	公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所 東京都町田市忠生 2-5-47
試験検査区分責任者	秋葉 達也
試験検査員	堀内 朗子、平田 史子、松本 奈保子、 丸山 弓美、奥津 敬右、吉田 建介
試験検査部門責任者	公益社団法人 日本食品衛生協会 食品衛生研究所 所長 桑崎 俊昭 印 2014 年 2 月 27 日

試験目的

本試験は国立感染症研究所の依頼により、寄生虫卵汚染食品からの虫卵回収法としてストマッカー法の導入の可否について判断するため、食品衛生検査指針に記載の従来法と比較検討した。

試験方法および結果

1. 試験項目

ストマッカーを用いた寄生虫卵回収法の試験条件を定めるため、予備検討として下記1)～5)の試験を実施し、得られた試験条件にて本試験を実施した。

- 1) 処理量の検討 (5 頁)
- 2) 寄生虫卵添加検体 (模擬検体) 作製方法の検討 (6 頁)
- 3) 虫卵の検出・計数方法の検討 (沈殿法・浮遊法の比較) (7 頁)
- 4) 試験に用いる虫卵数の検討 (8 頁)
- 5) 従来法における検体量と検出数の検討 (8 頁)
- 6) 本試験 (9 頁)

2. 被験物質

2.1. 虫卵液

寄生虫名 : ブタ回虫
受領日 : 2013 年 11 月 26 日
提供者 : 国立感染症研究所 寄生動物部

ブタ回虫の雌成虫を切開して、膣と子宮 (遠位端約 1cm) を取り出し、5 mL ポリスチレンラウンドチューブの内壁で細断、1 mL の水で懸濁して虫卵液とした。虫卵液は試験のつど調製した。

2.2. 虫卵添加野菜 (模擬検体)

名称 : 白菜
入手法 : 試験のつど購入

購入白菜は約 4 cm 角に切り分け、各試験群に葉と茎が均等に入るよう調整した。2.1. の虫卵液を滴下乾燥させたものを、模擬検体とした。

3. 試薬

消泡剤添加 0.5% Tween80・クエン酸緩衝液 (以下、洗浄液とする): 自家調製

0.1M クエン酸溶液 (自家調製) 614.5 mL

0.2M リン酸二ナトリウム (自家調製) 385.5 mL

Tween80 (関東化学) 5 g

Antifome A (SIGMA) 150 μ L

酢酸エチル: 和光純薬

硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液 (比重 1.23 ~ 1.24): 自家調製

硫酸マグネシウム (和光純薬) 185 g

塩化ナトリウム（和光純薬） 290 g

精製水（温水） 1,000 mL

Sigmacote : SIGMA

4. 使用器具

眼科剪刀、ピンセット、5 mL ポリスチレンラウンドチューブ、マイクロピペット（チップ：200 μ L、1,000 μ L）、ステンレス製バット、業務用ストレーナー（直径 17.5cm メッシュ#16）、茶漉し（メッシュ#40）、ふるい（メッシュ#42）、円錐型液量計（液量計と略す：500 mL、1,000 mL）、歯ブラシ、遠沈管（15 mL、50 mL）、滅菌スポイト、スライドガラス、カバーガラス、ストマッカー袋、ストマッカー、アスピレーター、遠心機、顕微鏡（：Sigmacote でコーティングして使用）

5. 試験方法

5.1. 虫卵の検出と計数操作：虫卵の検出と計数は以下の方法によった。

5.1.1. 浮遊法

50 mL 遠沈管に洗浄液 50 mL を入れてよく攪拌し、2,000 回転 / 分で 5 分間遠心分離した。上清をアスピレーターで除去し、沈渣を 15 mL 遠沈管に移した。さらに硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液で遠沈管に付着した沈渣を洗い、これも遠沈管に加えた。パストゥールピペットで、硫酸マグネシウム塩化ナトリウム溶液を 15 mL 遠沈管の管口からわずかに盛り上がるくらいに静かに加えた。これを日が当たらず振動もない場所で 30 ~ 40 分間静置した。そして遠沈管の管口のメニスカス液面に、脱脂ずみのカバーガラスの中心部を接触して虫卵を付着させ、これをスライドガラスに載せて顕微鏡下に観察した。遠沈管 1 本から標本を 4 枚ずつ作製し、虫卵の検出と計数を行った。

5.1.2. 沈殿法

50 mL 遠沈管に洗浄液 50 mL を入れてよく攪拌し、2,000 回転 / 分で 5 分間遠心分離した。上清をアスピレーターで除去し、沈渣を 15 mL 遠沈管に移した。さらに水で 50 mL 遠沈管に付着した沈渣を洗い、これも 15 mL 遠沈管に加えた。遠沈管でる液を遠心分離し（1,500 \times g、5 分間室温）、上清を除去した後、各遠沈管に 8 mL の洗浄液を加えて沈渣を再浮遊し、これに酢酸エチルを 2 mL ずつ加えた。密栓して 1 分間激しく振とうした。有機溶媒の気化により内圧が高まるので、ふたをゆっくりと開けて徐々に圧を逃がし、内容液がこぼれ出るのを防いだ。再度、ふたを閉めて直ちに遠心分離し（1,500 \times g、5 分間室温）酢酸エチル層、浮遊層、水層および沈渣の 4 層に分けた。そして浮遊層を竹串で管壁から離し、沈渣を残して残りの層はデカンテーションにより除去した。管壁に残った浮遊層の一部は、綿棒などでふき取った。遠沈管の沈渣を少量の洗浄液に再浮遊し、全量について虫卵の検出と計数を行った。

5.2. 虫卵回収操作：従来法とストマッカー法についてそれぞれ下記の方法で実施した。

5.2.1. 従来法

野菜（あるいは模擬検体）を金属トレイに入れ、洗浄液に 5～10 分ほど浸した後、野菜の両面をトレイ内の洗浄液中で歯ブラシにより丁寧にこすって洗った。洗浄液をブラシでかき混ぜながら、ストレイナー（40 メッシュ）でろ過し、夾雑物を除去して液量計に移した。30 分間静置した後、100mL を残してアスピレーターで上清を吸引除去し、残りは 50 mL 遠沈管に移した。次いで液量計の管壁を水 50 mL で 2 回洗浄し、遠沈管に移した。遠沈管は 2,000 回転 / 分で 5 分間遠心分離した。この沈査を用いて、5.1.の方法で虫卵を検出・計数した。

5.2.2. ストマッカー法

野菜（あるいは模擬検体）と洗浄液をストマッカー袋に入れ、5～10 分ほど浸した後にストマッカーを 60 秒間作動させた後、ストレイナー（40 メッシュ）で濾しながら洗浄液全量を液量計に移した。このストマッカー袋にさらに洗浄液 100 mL を加えて再度 60 秒間ストマッカーを作動させ、この洗浄液も液量計に移した。これを 30 分間静置した後、100mL を残してアスピレーターで上清を吸引除去し、残りを 50 mL 遠沈管に移した。液量計の管壁を水 50 mL で 2 回洗って遠沈管に加え、2,000 回転 / 分で 5 分間遠心分離した。この沈査を用いて、5.1.の方法で虫卵を検出・計数した。

6. ストマッカー処理量の検討

ストマッカー袋で処理可能な検体重量と添加可能な洗浄液量について検討した。

6.1. 検体重量について

白菜（1/4個、約460g）を約5cm角に細断し、25g、50g、100g、150gをストマッカー袋に入れた。150gまでは袋に入るが、洗浄液の添加は困難であることが確認された（写真1）。



写真1. ストマッカー袋に入れた白菜（左より25g、50g、100g、150g）

6.2. 液量について

ストマッカー袋にそれぞれ水100mL、200mL、300mL、400mLを入れ、ストマッカーを60秒間作動させた。その結果、300mLまでは作動可能であったが、400mLを添加すると一部水が漏れ出てきた（写真2）。従って最大液量は300mLであることが確認された。



写真2. 水400mLを入れてストマッカー作動後の画像

6.3. 検体重量と液量の最適値の検討

上記の結果をもとに、添加白菜の重量を50g、100gの2群とし、添加液量を300mLとして（写真3）ストマッカーを60秒間作動させた。その結果、白菜100gに水300mLではストマッカーが作動しなかった。また白菜50gに水300mLでは作動した（写真4）が、作動中に異音が発生した。そこで白菜は50g、液量は250mLとした。従来法では検体100gに対して洗浄液500mLの使用とされているが、今回の量はいずれもその半分に相当した。



写真 3 . ストマッカー袋に白菜（左 50 g、右 100 g）と水 300 mL を入れた状態

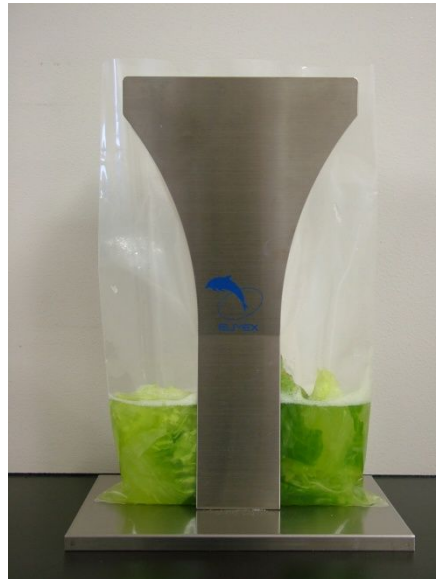


写真 4 . 白菜 50 g と水 300 mL で 60 秒間作動させた後の状態

7. 模擬検体（寄生虫卵添加検体）作製方法の検討

白菜に虫卵を添加する模擬検体の作製方法を検討した。

7.1. 虫卵液中の虫卵の計数と添加液量の決定

虫卵液 20 μ L を顕微鏡下に 3 回観察し、虫卵数を数えた。その結果、虫体 1 隻から調製された虫卵液の虫卵数は、約 6,000 個/mL ~ 50,000 個/mL の範囲にあった。そこで白菜への虫卵添加量は、虫卵液あるいはその 10 倍希釈液を用いることとし、1 検体に添加する最大液量は 1 mL 以下とすることとした。

7.2. 添加液の乾燥時間の決定

切断した白菜を約 50 g となるよう秤量し、角 2 型シャーレ上に広げて、その上に 100 倍希釈

したクリスタルバイオレット液 0.5 mL または 1 mL を少量ずつ滴下して広げ、孵卵器 32.5 で乾燥させた。その結果、乾燥時間は液量に余り影響されず、しかし白菜への接種部位により影響を受けることが分かった。すなわち、芯の部分では液を広範に添付できるために乾燥が早かった（20 分程度）が、葉の部分は液を広げることができずに乾燥が遅い（60 分程度）傾向にあった。そこで、乾燥時間は最大 90 分程度とし、白菜が過度に乾燥した場合は新たに模擬検体を作製し直すことにした（写真 5）。



写真 5 . 100 倍希釈クリスタルバイオレット液を滴下した白菜
（左 2 列：滴下直後 右 2 列：90 分後 各列写真の左：0.5 mL 滴下；右：1 mL 滴下）

8. 虫卵の検出・計数方法の検討

虫卵の検出・計数を行うために、沈殿法および浮遊法についてその回収率を比較検討した。

8.1. 試験方法

洗浄液 50 mL を入れた 50 mL 遠沈管に、虫卵 1,000 個を添加し、沈殿法および浮遊法にて虫卵を検出・計数した。各試験の実施回数は 5 (n=5) とし、平均値と標準偏差を求めた。

8.2. 試験結果

添加した 1,000 個中、沈殿法では平均 696 個、浮遊法では平均 570 個の虫卵が回収された。この値について t 検定を行ったが、有意差は認められなかった ($t = 0.97$ 、 $df = 8$)。

表 1 . ブタ回虫卵の沈殿法および浮遊法による計測結果

	1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	5 回目	平均値	標準偏差
沈殿法	435	874	770	750	649	696	166
浮遊法	879	227	542	655	549	570	235

9. 試験に用いる虫卵数の検討

本試験における添加虫卵数を決定するための試験を行った。

9.1. 試験操作

模擬検体は回虫卵が 125 個/50 g、250 個/50 g、500 個/50 g、1,000 個/50 g として調製した。試験数は n=1 とした。操作はストマッカー法、虫卵の計測は沈殿法によった。

9.2. 試験結果

虫卵 125 個では 34 個（回収率：27%）、虫卵 250 個では 16 個（回収率：6%）、虫卵 500 個では 187 個（回収率：37%）、虫卵 1,000 個では 1,147 個（回収率：> 100%）が回収された。安定した虫卵回収が見込めむために、試験に用いる虫卵数は 1,000 個/50 g とした。

表 2. 試験の用いる虫卵数の設定試験

	125 個/50 g	250 個/50 g	500 個/50 g	1,000 個/50 g
計測数	34	16	187	1,147
回収率 (%)	27	6	37	115

10. 従来法における検体量と検出感度の検討

ストマッカー法で試験可能な検体重量は従来法の半量の 50 g であった。そこで従来法に検体量 50 g を適用した場合、検体量 100g との間に検出率で差が出るかどうかを検討した。

10.1. 試験方法

模擬検体は 1,000 個/50 g および 2,000 個/100 g で調製し、各々を洗浄液 250 mL および 500 mL で処理して所定の操作を行い、沈殿法で虫卵の検出・計数を行った。

10.2. 試験結果

いずれの検査重量においても約 50%の虫卵が回収され、本試験において検査重量を 50 g としても、従来法のデータに不都合が出る危険性は乏しいことが確認された。

表 3. 従来法における検体量と検出感度の検討

白菜重量	50 g	100 g
使用洗浄液量	250 mL	500 mL
虫卵添加量	1,000 個/白菜 50 g	2,000 個/白菜 100 g
回収数	579	1,061
回収率 (%)	58	50

11. 本試験

従来法とストマッカー法により虫卵の回収試験を実施し、両者の結果を比較した。模擬検体は1,000個/50gで調製し、虫卵の検出・計数は沈殿法によった。試験数は各試験法につき5検体ずつ(n=5)とした。なお、模擬検体に用いた白菜に寄生虫卵汚染がないことを確認するため、虫卵無添加の白菜を用いて各試験法で試験し、陰性対照とした。試験数はn=1とした。

11.1. 試験結果

回収虫卵数は、従来法：467.2 ± 100.2、ストマッカー法：375.8 ± 89.4となった。得られた値はF検定で等分散と判断されたことから、t検定を行ったが、P(T<=t)の両側が0.17で0.05以上となり、有意水準5%で平均値の有意差は無いと判断された。なお陰性対照からは虫卵は全く検出されなかった。

表4. 従来法とストマッカー法による寄生虫卵汚染白菜からの虫卵回収試験

	計測数				平均値	標準偏差	
従来法	447	472	376	634	407	467.2	100.2
ストマッカー法	509	339	263	379	389	375.8	89.4

結論

寄生虫卵汚染食品からの虫卵回収法としてストマッカー法の導入が可能かを、従来法と比較して検討した。その結果、ストマッカー法による試験可能な検体の最大重量は50gであり、従来法の100gの半量となるが、両者の虫卵検出数に統計的な有意差は認められなかったことから、寄生虫卵汚染食品からのストマッカー法による虫卵の検出率は従来法と同等であることが確認された。

試験検査区分責任者： 秋葉 達也 印