

表 1 施設 A の *Listeria monocytogenes* 検出検体

No.	採取場所	検体名	1回目調査		2回目調査	
			定量試験 (菌数)	分離株の 血清型	定量試験 (菌数)	分離株の 血清型
1	冷蔵庫	冷蔵室床たまり水	90 CFU/mL	1/2a, 1/2b	<10 CFU/mL	1/2a
2	包装室	作業台のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a, 1/2b	陰性	
3	包装室	計量容器のふきとり	<10 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	陰性	
4	包装室	製品充填機のふきとり	40 CFU/100cm ²	1/2a	陰性	
5	包装室	製品充填機のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a		
6	包装室	製品充填機のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a	陰性	
7	包装室	充填後の廃液	60 CFU/mL	1/2a, 1/2b, 3a	陰性	
8	包装室	充填機の下ふきとり	60 CFU/100cm ²	1/2a, 1/2b, 3a		
9	包装室	作業台の下ふきとり	陰性		35 CFU/100cm ²	3b
10	製品	最終製品(みぶな)			50 CFU/g	1/2a, 1/2b, 3a

* 算出限界はふきとり水で 100 cm²中 10 CFU(2 回目調査は 5CFU)、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 10 CFU である。

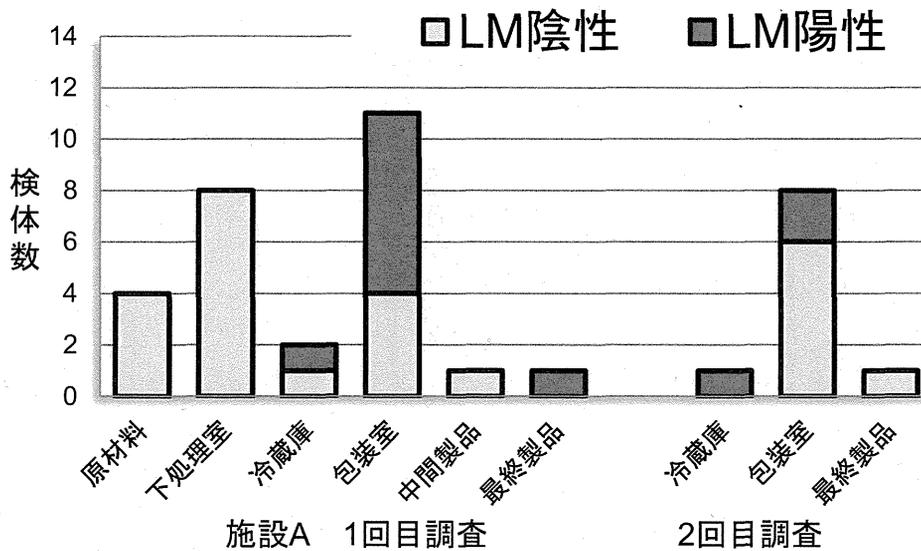


図 2 施設 A の製造環境調査

表 2 施設 B の *Listeria monocytogenes* 検出検体

No.	採取場所	検体名	1回目調査		2回目調査		3回目調査
			定量試験 (菌数)	分離株の 血清型	定量試験 (菌数)	分離株の 血清型	定性試験
1	冷蔵庫	冷蔵室床のふきとり	30 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	<10 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	陰性
2	冷蔵庫	下漬容器外側面のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a	陰性		陰性
3	包装室	作業台のふきとり	<10 CFU/100cm ²	3a			
4	包装室	下漬時使用器具のふきとり	10 CFU/100cm ²	3a	陰性		陰性
5	包装室	製品充填機のふきとり	10 CFU/100cm ²	1/2a			
6	包装室	製品充填機のふきとり	180 CFU/100cm ²	1/2a	<10 CFU/100cm ²	3a	陰性
7	包装室	製品充填機のふきとり	50 CFU/100cm ²	1/2a, 3a	陰性		陰性
8	包装室	製品充填機のふきとり	760 CFU/100cm ²	1/2a, 3a			
9	包装室	充填機の下の水	40 CFU/mL	1/2a, 3a	30 CFU/mL	1/2a	陰性
10	中間製品	計量前の塩漬茄子	<10 CFU/g	3a	陰性		陰性
11	製品	最終製品(茄子)	<10 CFU/g	1/2a			

* 算出限界はふきとり水で 100 cm²中 10 CFU、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 10 CFU である。

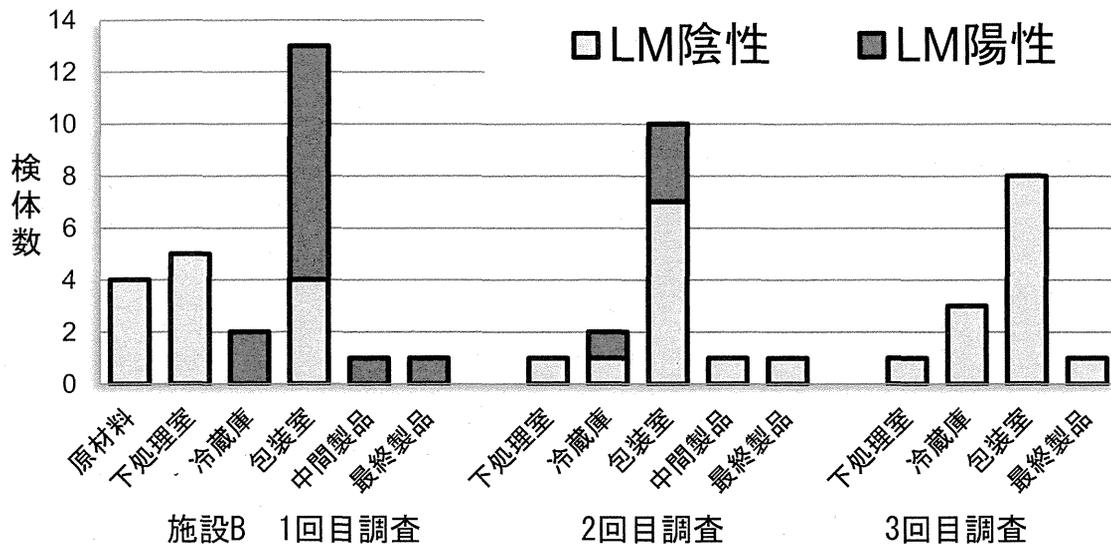


図 3 施設 B の製造環境調査

表 3 施設 C の *Listeria monocytogenes* 検出検体

No.	採取場所	検体名	定量試験 (菌数)	分離株の 血清型
1	下処理室	まな板のふきとり	98 CFU/100cm ²	1/2a
2	下処理室	床の水	<1 CFU/mL	1/2a
3	冷蔵庫	冷蔵室床たまり水	<1 CFU/mL	3a
4	冷蔵庫	冷蔵室床のふきとり	1.1×10^6 CFU/100cm ²	1/2a, 3a
5	冷蔵庫	冷蔵室床たまり水	78 CFU/mL	1/2a, 3a
6	包装室	製品充填機たまり水	<1 CFU/mL	1/2a
7	包装室	製品充填機のふきとり	1.1×10^3 CFU/100cm ²	1/2a
8	製品	最終製品(白菜)	<10 CFU/g	1/2a

* 算出限界はふきとり水で 100 cm²中 1 CFU、食品検体で 1g 中 10 CFU、液状検体で 1 mL 中 1 CFU である。

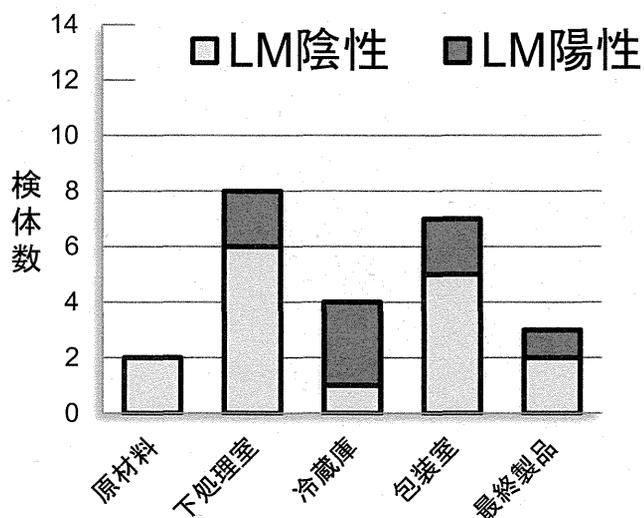


図 4 施設 C の製造環境調査

表 4 分離株の遺伝子型別(PFGE profile)

施設	採取場所(検体数)	分離株の血清型	PEGE profile	
			Asc I	Apa I
A	2013 年度製品(2),包装室(6),最終製品(1)	1/2a	A	/ a
	包装室(3),最終製品(1)	3a		
	冷蔵庫(1)	1/2a	A	/ a1
	2013 年度製品(3),包装室(2),最終製品(1)	1/2b	B	/ b
	2013 年度製品(1), 包装室(1)	1/2b	B2	/ b
	冷蔵庫(1)	1/2b	B1	/ b
B	2013 年度製品(3),冷蔵庫(3),包装室(7),最終製品(1)	1/2a	C	/ c
	冷蔵庫(2),包装室(5),中間製品(1)	3a		
C	下処理室(2),冷蔵庫(2),包装室(2),最終製品(1)	1/2a	A	/ a1
	冷蔵庫(3)	3a		

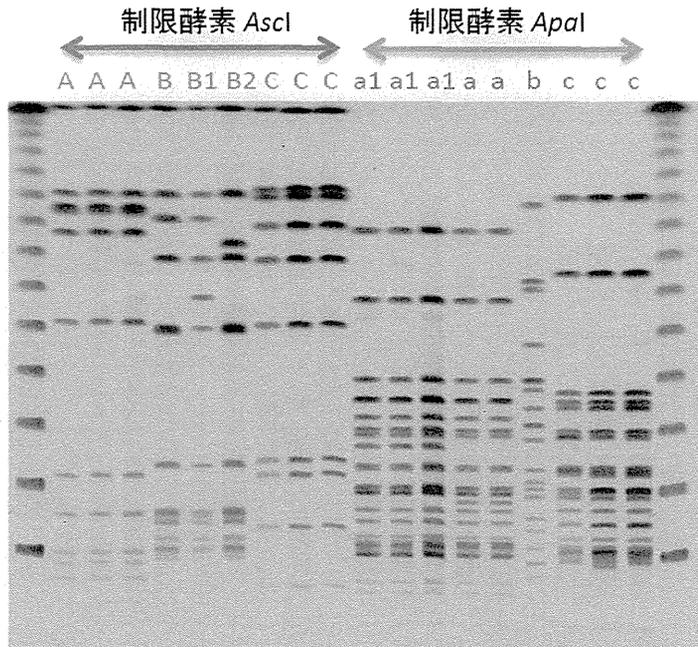


図 5 *Listeria monocytogenes* の PFGE profile

No.	Sampling date	Serotype	Dupont ID	Ribogroup	Source	RiboPrint™ Pattern				
						1 kbp	5	10	15	50
1	May/21/2013	1/2b	DUP-1052	A	Final product (Mibuna)					
3	Aug/19/2013	1/2b	DUP-1052		Final product (Mibuna)					
17	Feb/03/2014	1/2b	DUP-1052		Final product (Mibuna)					
31	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		Bottom of packaging device					
35	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		bucket for excessive liquid seasoning					
36	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		bucket for excessive liquid seasoning					
40	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052		bench on which measuring cup stands					
46	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1052	Final product (Mibuna)						
8	Oct/07/2013	1/2a	DUP-20226	B	Final product (Mibuna)					
7	Oct/07/2013	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
9	Oct/07/2013	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
16	Feb/03/2014	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
24	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
25	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
26	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
28	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Packaging device					
30	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Bottom of packaging device					
32	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Bottom of packaging device					
33	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bucket for excessive liquid seasoning					
37	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bucket for excessive liquid seasoning					
38	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bench on which measuring cup stands					
39	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		bench on which measuring cup stands					
42	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Measuring cup					
43	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
45	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226		Final product (Mibuna)					
27	Jun/16/2014	1/2a	DUP-20226	Packaging device (opener)						
44	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	Final product (Mibuna)						
29	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	Bottom of packaging device						
41	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	Measuring cup						
34	Jun/16/2014	3a	DUP-20226	bucket for excessive liquid seasoning						
11	Oct/07/2013	1/2b	DUP-18596	C	Final product (Mibuna)					
12	Oct/07/2013	1/2b	DUP-18596		Final product (Mibuna)					
10	Oct/07/2013	1/2b	DUP-18596		Final product (Mibuna)					
21	Jun/16/2014	1/2a	DUP-1045	D	Sloppy floor in cold room					
23	Jun/16/2014	1/2a	DUP-1045		Sloppy floor in cold room					
22	Jun/16/2014	1/2b	DUP-1043	E	Sloppy floor in cold room					

図 6 施設 A 由来株のリボプリンター解析

No.	Sampling date	Source	Serotype	Dupont ID	Ribogroup	RiboPrint™ Pattern				
						1 kbp	5	10	15	50
4	2013.8.19	Final product (egg plant)	1/2a	DUP-20237	A					
6	2013.10.7	Final product (egg plant)	1/2a	DUP-20237	A					
14	2013.10.15	Final product (Napa cabbage)	1/2a	DUP-20237	A					
47	2014.06.30	Scale device	3a	DUP-20237	A					
48	2014.06.30	Conveyor on packaging device	1/2a	DUP-16619	A					
49	2014.06.30	Pickle-tub cover of pre-pickled tank	3a	DUP-16619	A					
50	2014.06.30	Filling nozzle of liquid filling device	1/2a	DUP-16619	A					
52	2014.06.30	salt-soaked egg plant	3a	DUP-20237	A					
53	2014.06.30	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	1/2a	DUP-20237	A					
54	2014.06.30	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	3a	DUP-16619	A					
55	2014.06.30	Outer surface of pre-pickling tank in cold room	1/2a	DUP-16619	A					
56	2014.06.30	Post-packaging conveyor	1/2a	DUP-16619	A					
57	2014.06.30	Post-packaging conveyor	3a	DUP-16619	A					
58	2014.06.30	Final product (egg plant)	1/2a	DUP-20237	A					
59	2014.06.30	Slopping floor close to packaging machine	1/2a	DUP-16619	A					
60	2014.06.30	Slopping floor close to packaging machine	3a	DUP-16619	A					
61	2014.06.30	Packaging device (sealing after liquid filling)	1/2a	DUP-20237	A					
62	2014.06.30	Packaging device (sealing after liquid filling)	3a	DUP-16619	A					
63	2014.08.18	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	3a	DUP-20237	A					
64	2014.08.18	Floor close to Pre-pickling tank in cold room	1/2a	DUP-16619	A					
65	2014.08.18	Filling nozzle of liquid filling device	3a	DUP-16619	A					
66	2014.08.18	Post-packaging conveyor	1/2a	DUP-16619	A					
67	2014.08.18	Sloppy floor close to packaging machine	1/2a	DUP-16619	A					

図 7 施設 B 由来株のリボプリンター解析

No.	Sampling date	Serotype	Dupont ID	Ribogroup	Source	RiboPrint™ Pattern
						1 kbp 5 10 15 50
68	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Chopping board	
69	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Chopping board	
70	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Chopping board	
71	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Floor close to vacuum-packaging device	
72	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	A	Floor close to vacuum-packaging device	
73	Jul/24/2014	3a	DUP-16619	A	Floor inside cold chamber	
74	Jul/24/2014	3a	DUP-16619	A	Floor inside cold chamber	
75	Jul/24/2014	3a	DUP-16619	A	Floor inside cold chamber	
76	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Barrel inside cold chamber	
77	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Barrel inside cold chamber	
78	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Barrel inside cold chamber	
79	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Barrel inside cold chamber	
80	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Barrel inside cold chamber	
81	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
82	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
83	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
84	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
85	Jul/24/2014	3a	DUP-20237	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
86	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Stagnant water on the bottom of cold chamber	
87	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
88	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
89	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
90	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
91	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Filling device	
92	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Final product (Napa cabbage)	
93	Jul/24/2014	1/2a	DUP-1045	B	Final product (Napa cabbage)	

図 8 施設 C 由来株のリボプリンター解析

平成 26 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

浅漬け製造工程における菌叢変動に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
協力研究者	榊田和彌	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
協力研究者	倉園久生	国立大学法人帯広畜産大学	畜産学部 共同獣医学課程
協力研究者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨：昨年度末に、浅漬け製造施設においてパイロットスタディを実施し、中間製品および施設ふき取り検体などを採取して、製造工程を通じた指標菌の動態に関する知見を得た。本年度は同検体を構成する菌叢を明らかにすることで、個々の工程が顕す病原細菌の制御効果に関する考察を行なうこととした。白菜の浅漬け製造ラインより採取した原材料、中間製品（塩漬け後および殺菌後）、最終製品より各 2 検体を 16s rRNA pyrosequencing 解析に供した。結果として、各検体の構成菌叢は著しい変動を顕し、特に塩漬け工程での腸内細菌科菌群の著減を認めた。その後の殺菌工程後検体では更にその構成比率は低減を示したことから、同 2 工程の導入が、供試製造工程において微生物制御に有効に機能していると考えられた。市販白菜（原材料）を異なる塩濃度で 2 日間漬け込んだところ、10% 食塩を用いた場合に有意な大腸菌群数の低下が認められたが、0, 2% 食塩での漬け込みにより同指標菌数は明らかな低下を示さなかった。漬け込み工程における食塩濃度に依存して、*Pseudomonas* 属菌の比率は大きく変動を示した。

A. 研究目的

2012 年 8 月に白菜の浅漬けを原因食品とする腸管出血性大腸菌 O157 集団食中毒事例では、患者 169 人、死者 8 人を数え、社会的な問題となった他、非動物性食品における微生物危害性が改めて認識されたところである。こうした事態を受けて、厚生労働省では、同年 12 月に漬物の衛生規範を改正し、原材料の次亜塩素酸による殺菌または加熱を盛り込むと共に、製造工程に

係る管理運営基準の策定と運営もしくは HACCP 方式の導入を指導する内容を発行している。衛生規範は周知のとおり、製造事業者の意識・意欲に依存するところがあるが、昨年度実施した浅漬け製造施設でのパイロットスタディにおいて、調査対象施設では同規範が遵守され、塩漬けと殺菌工程を通じた、指標菌の低減を確認したところである。本年度は、その結果が病原細菌の制御に資することを更に裏付ける目的で、白菜の浅漬け製造ラインにおける原材料、

中間製品および最終製品を対象として、構成菌叢を調査したので、報告する。

B. 研究方法

1. 検体

平成 26 年 2 月に神奈川県内の浅漬け製造事業者の協力を得て、同施設内で白菜の浅漬け製造ラインより採材した原材料、中間製品（塩漬け後、殺菌後）および最終製品各 2 検体を菌叢解析に供した。

2. 菌叢解析

各検体より DNA 抽出後、PCR により 16s rRNA 部分領域を増幅した。E-gel および AMPure XP を用いて、増幅断片を精製した後、各検体を等量混合してライブラリーを作成した。同ライブラリーは Ion PGM シーケンサーを用いて解析を進め、得られた配列は、CLC Genomic workbench でトリムを行い、Local blast 検索を行うことで、各検体の構成菌叢に関するデータを取得した。

3. 食塩漬け込みに伴う指標菌と菌叢変動
店頭で市販される生鮮白菜を購入し、分量の水道水で 2 回洗浄後、汚染のないように、同野菜を 25g づつに裁断した。225ml の食塩水（0, 2, 10%）に加え、15℃で 3 日間漬け込みを行った。漬け込み後の検体を、食塩水より取り出し、225ml の緩衝ペプトン水中にて懸濁させた後、同懸濁液を用いて、指標菌（一般細菌数及び大腸菌群数）の測定および菌叢解析を実施した。

C. 研究結果

1. パイロットスタディにおける白菜浅漬

けの製造工程中の菌叢変動

昨年度、採材した白菜浅漬け製造ラインでの原材料、中間製品（10%食塩水での塩漬け後、殺菌後）および最終製品検体より、各 2 検体を無作為に抽出し、菌叢解析に供した。最終的に、18361-104969 リードが得られ、77 科 194 属が検出された。以下に代表的な菌属に関する工程中の動態を記述する。

(1) *Pseudomonas* 属

Pseudomonas 属は全検体中の 28.2%と最も高い占有率を占めた（図 1）。本属の構成比率は、塩漬け工程で著しく減少したものの、殺菌後は再び上昇傾向を認め（11%）、最終製品での構成比率は焼く 5.7%であった（図 1）。

(2) *Leuconostoc* 及び *Rhizobium* 属

当該菌属は、塩漬け後、それぞれ 33.5% 及び 26.2%の構成比率を示した一方で、その他の工程ではいずれも 5%以下であった（図 1）。これらの菌属は、葉物野菜から高頻度に検出されることが知られている他、10%以上の食塩を含む、キムチ等の発酵食品からも検出されることが知られている。

(3) *Pedobacter* 属

殺菌工程後の検体からは、*Pedobacter* 属が高頻度（43.9%）に検出された（図 1）。本属は、主に植物の根部に棲息することが知られているが、ある学術報告では殺菌後のレタス表面から検出されている。本研究における成績は、殺菌工程が野菜表面に付随する細菌の多くを制御することで、白菜内部に侵入・生息していた本属菌の競合的増殖を助長したものと推測される。

(4) *Microcystis* 属

Microcystis 属は、最終製品より最も高

頻度 (39.8%) に検出された (図 1)。本属菌は、低温抵抗性を示すことが知られているため、包装後、低温下に保存される最終製品中でも一定数が保持されていると考えられる。

(5) *Escherichia* 及び *Enterobacter* 属

当該菌属の構成比率は、最終製品中でそれぞれ 0.04% および 0.02% であった (図 1)。こうした構成比率は、当該細菌の生存を直接的に示すものではなく、死菌からの影響も受ける。実際に、昨年度の成績として、大腸菌群が最終製品から分離培養されなかった結果から、これらは既に死滅しており、死菌由来核酸のわずかな混入がこうした成績へとつながったと目される。

2. 白菜由来菌叢は漬け込み過程での食塩濃度により影響を受ける

Pseudomonas 属菌の構成比率変動と塩漬け込みとの関連性が示唆されたことを受けて、生鮮白菜を原材料として 0、2、10% 食塩水中で 3 日間の漬け込み工程を再現し、同工程前後での菌叢および指標菌数に係る動態を比較することとした。

一般細菌数は食塩濃度に関わりなく、漬け込み前後で顕著な差異を示さなかったが、大腸菌数については、10% 食塩水漬け込み群においてのみ、漬け込み前検体に比べ、有意な菌数低減を認めた (図 2)。菌叢解析を通じて、10% 食塩漬け込み群では、*Pantoea* 属構成比率が顕著に減少することが認められ (図 3)、大腸菌群数変動との関連性が示唆された。パイロットスタディにおいて最も優勢な構成比率を示した *Pseudomonas* 属については、食塩濃度が高くなるにつれて、その構成比率が高まる

傾向であることが明らかとなった (図 3)。

以上の成績より、食塩濃度は漬け込み工程における原材料由来の菌叢を左右する重要な決定因子であると共に、同工程は殺菌工程とあわせて、浅漬け製造における病原微生物制御に寄与する工程であることが改めて明らかとなった。

D. 考察

葉物野菜は、その代謝・生理機構の多様性から、広範にわたる病原細菌の汚染が懸念されている。その中であって、白菜は特に外表面のみならず、内部へも汚染が懸念されるため、原材料からの病原細菌をどのように抑えるかが衛生管理上での重要な課題といえる。

本研究では、昨年度の研究において実施した白菜浅漬け製造ラインでの指標菌数動態成績として、塩漬け及び殺菌工程を通じた指標菌数の著減の原因を探るべく、菌叢解析を実施し、その中で特に白菜由来の細菌の制御に資する、漬け込み工程での食塩濃度に関する知見を得ることとした。

本研究において検討した浅漬け製造ラインでの菌叢動態に係る成績は、改正された衛生規範中に盛り込まれている、殺菌工程の必然性を改めて指示する結果となった。また、塩漬け工程中で用いる食塩濃度に関する知見は、その後の水洗浄工程を経て、最終食塩濃度が約 2% 前後に調節できることを考えると、衛生管理上での実効性を伴う応用制御手法と考えられ、昨今の減塩嗜好にも対応できるものと思われる。

E. 結論

漬物製造で用いられる、伝統的な塩漬け工程は、原材料における病原細菌の汚染制御に有効に機能していることが明らかとなった。また、衛生規範に盛り込まれた、次亜塩素酸を用いた殺菌工程は、大腸菌群等の病原細菌の低減に寄与していることが明らかとなり、両工程の併用は、浅漬け製品の微生物危害を予防するための応用的な制御手法と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S, Asakura H. (2015) Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. J. Food Safety. 印刷中.

2. 学会発表

高鳥浩介、朝倉宏. 農産物の生食のリスクとその制御. 第41回日本防菌防黴学会年次大会 シンポジウム.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

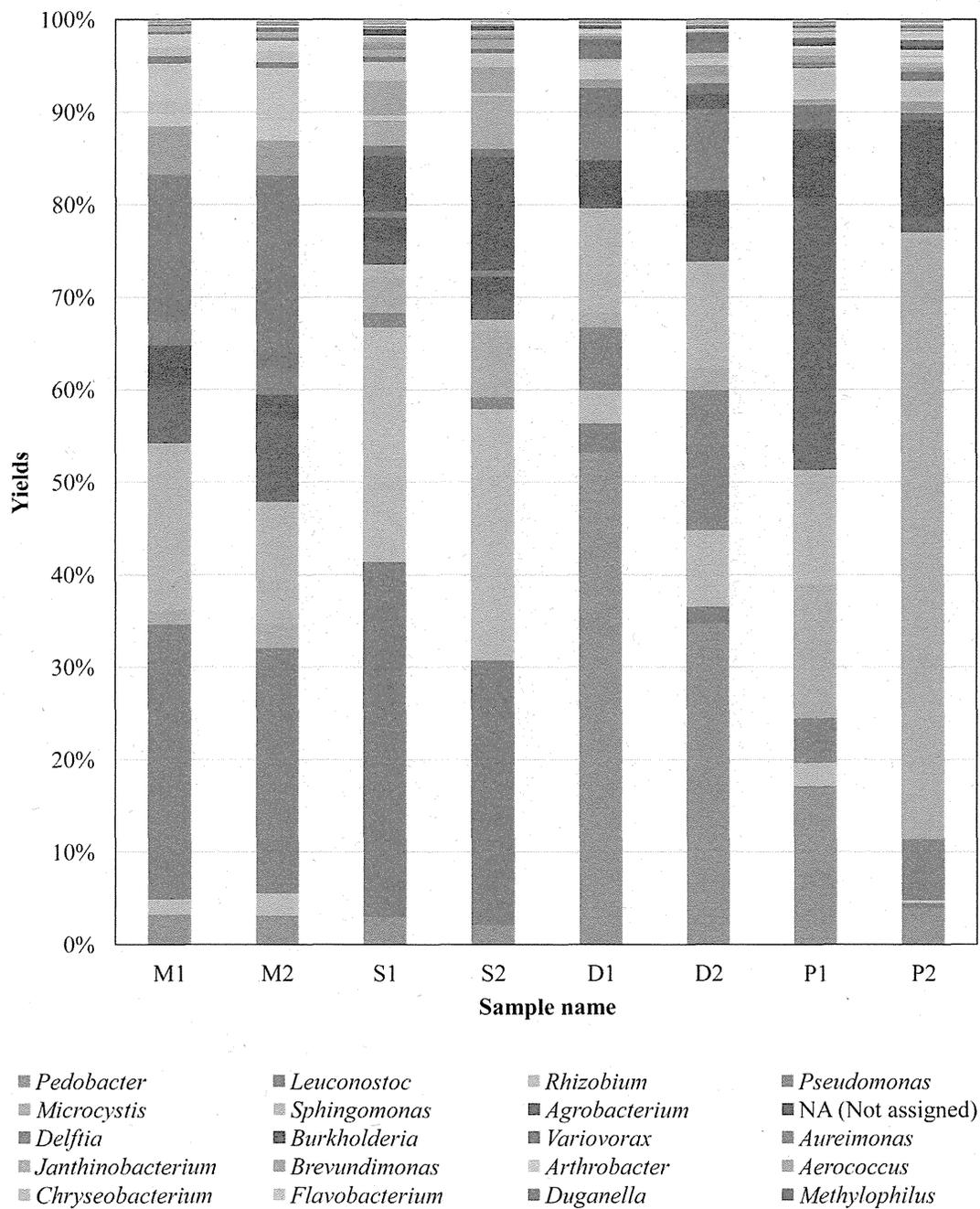


図 1. 白菜浅漬けの製造工程を通じた菌叢変動

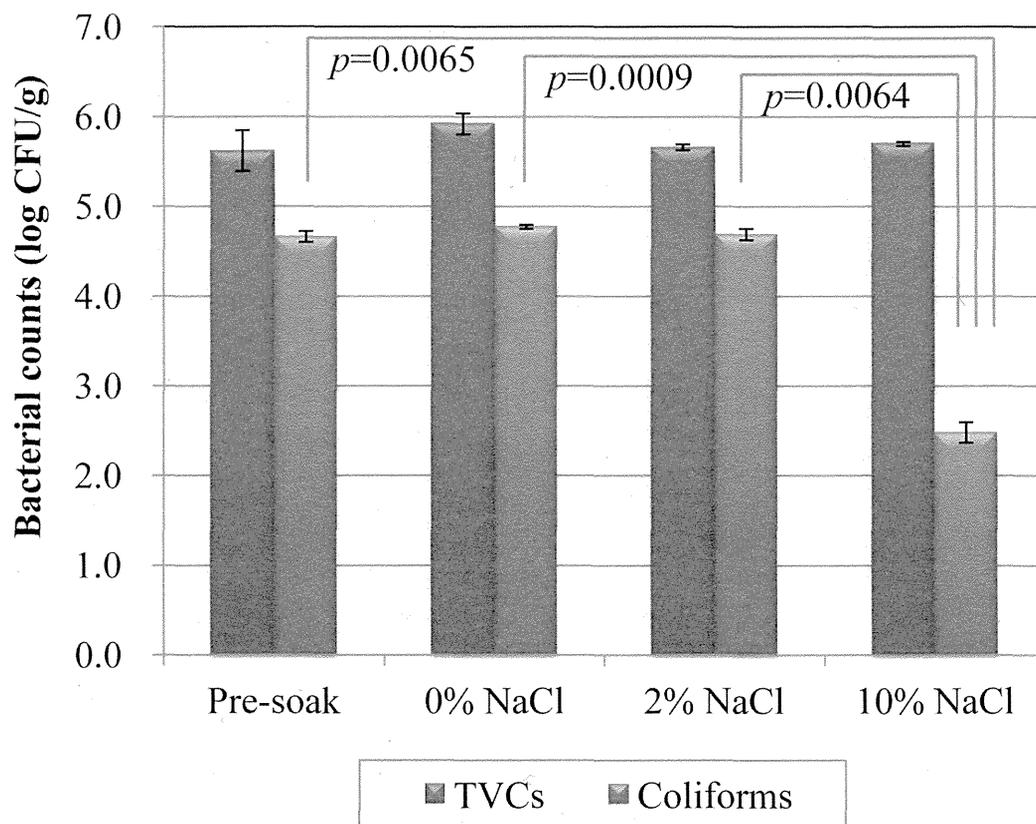


図 2. 異なる食塩濃度で漬け込みを行った際の白菜由来指標菌数の変動

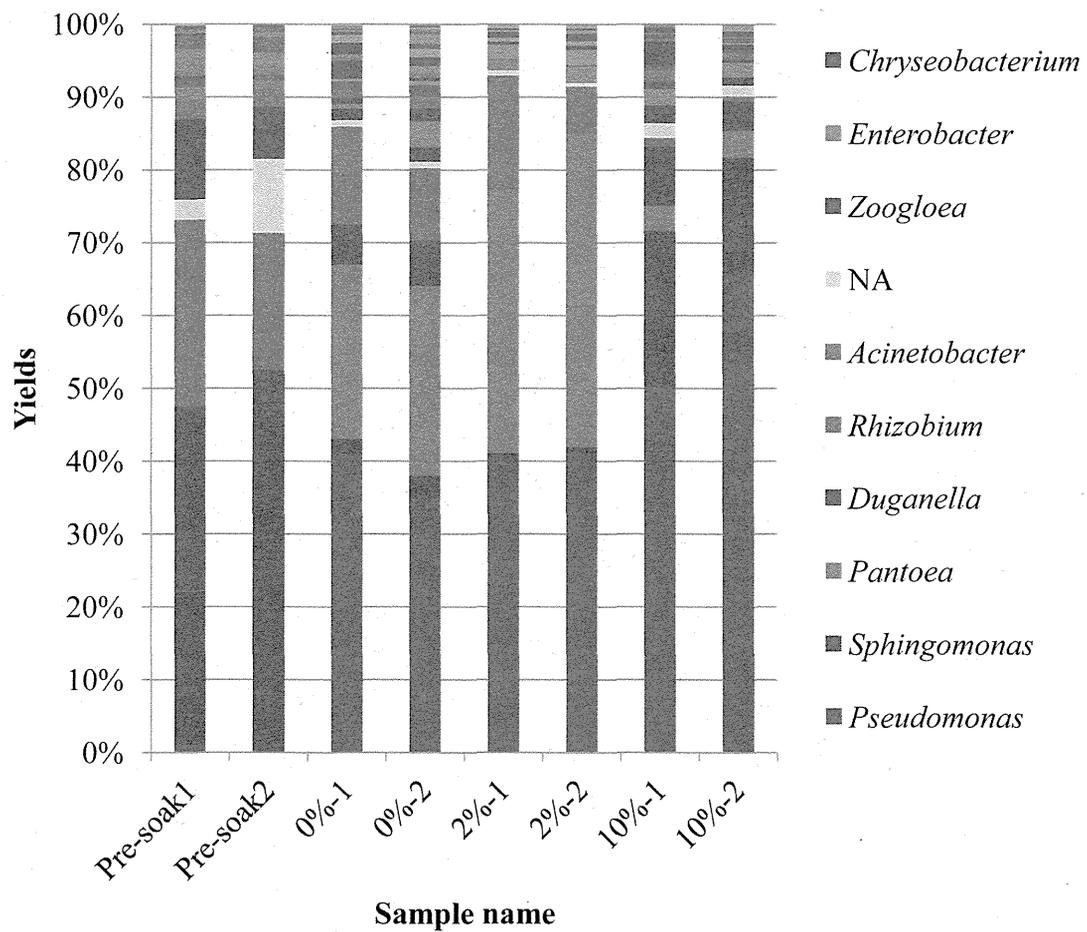


図 3. 異なる食塩濃度で漬け込みを行った際の白菜由来菌叢の変動

平成26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	柴田勝優	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	賀川千里	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

研究要旨：我が国ではかつて国民の半数以上が回虫・鉤虫・鞭虫という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、少数ながらも発生が継続しており、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、昨年度の回虫症に続いて文献資料の検索に取り組み、最近の鉤虫症と鞭虫症の発生状況の詳細を調べた。その結果、鉤虫症と鞭虫症も少数ながら実際に日本国内で発生している事実が分かった。しかし原因食品や感染経路を明らかにすることはできなかった。土壌媒介寄生蠕虫の感染源となる非動物性食品の特定は重要であることから、その作業を効率的に実施するため、今年度は超音波を用いた非動物性食品の寄生虫卵検査法を構築して検討した。その結果、本法による虫卵回収数は従来法と同等であったが、虫卵を効率的に検出できる方法であることが明らかとなった。

1. 非動物性食品を感染源とする寄生虫症例、特に鉤虫および鞭虫症例の発生状況に関する文献資料の検索

A. 研究目的

回虫・鉤虫・鞭虫は野菜等を感染源とする食品媒介寄生虫であり、土壌媒介寄生蠕虫とも呼ばれる。我が国ではかつて国民の半数以上が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、土壌媒介寄生蠕虫の国内症例はゼロにはなっていない。そこで昨年度は回虫症に的を絞って文献資料の検索等を行い、本症の発生状況

の詳細把握に努める共に、その感染経路や原因食品について推定した。今年度は、回虫以外の土壌媒介寄生蠕虫である鉤虫および鞭虫について文献検索を行い、発生状況の詳細を調べた。

B. 研究方法

文献学的な一次資料として、日本臨床寄生虫学会誌（1990年/第1巻～2014年/第25巻の25年間/25巻）を用いた。これを通覧して、鉤虫および鞭虫感染の報告数・症例数をカウントした。また両症例の原因として推定・議論された感染源について、論文から情報の抽

表 1. 鉤虫、鞭虫の症例数：日本臨床寄生虫学会誌における報告数とビー・エム・エル (BML) での検査数

年	日本臨床寄生虫学会誌						BML	
	巻	文献 総数	鉤虫症 文献数	鉤虫症 症例数	鞭虫症 文献数	鞭虫症 症例数	鉤虫症 症例数	鞭虫症 症例数
1990	1	59	0	0	0	0	-	-
1991	2	44	1	1	0	0	-	-
1992	3	56	0	0	0	0	-	-
1993	4	69	0	0	0	0	-	-
1994	5	64	0	0	0	0	-	-
1995	6	59	0	0	0	0	-	-
1996	7	33	0	0	0	0	-	-
1997	8	39	0	0	0	0	-	-
1998	9	35	0	0	0	0	-	-
1999	10	41	0	0	0	0	-	-
2000	11	36	0	0	0	0	20 (5)	23 (13)*
2001	12	42	0	0	0	0	25 (25)	24 (17)
2002	13	31	0	0	0	0	33 (32)	29 (23)
2003	14	26	0	0	0	0	9 (8)	17 (12)
2004	15	26	0	0	0	0	9 (8)	13 (10)
2005	16	26	0	0	0	0	9 (9)	9 (4)
2006	17	31	0	0	0	0	0	4 (0)
2007	18	19	0	0	0	0	0	7 (2)
2008	19	39	0	0	0	0	5 (4)	10 (3)
2009	20	29	0	0	0	0	2 (0)	8 (1)
2010	21	33	0	0	0	0	2 (1)	7 (2)
2011	22	21	0	0	0	0	1 (0)	7 (0)
2012	23	32	0	0	0	0	2 (1)	13 (4)
2013	24	33	0	0	0	0	0	3 (0)
2014	25	27	1	1	1	1	0	9 (3)
合計		950	2	2	1	1	117 (93)	183 (94)

*：日本人（外国人）

出を試みた。さらに回虫症と同様に、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鉤虫および鞭虫の症例数について提示を受けた。

日本臨床寄生虫学会誌計 25 巻に掲載された論文は 950 編で、このうち日本で感染した鉤虫症および鞭虫症の論文数（および症例数）は、それぞれ 2 編（2 例）および 1 編（1 例）であった。

C. 研究結果

BMLの資料では、鉤虫症例はその数が2002年までは二桁であったが、2003年以降は一桁となり、2013年および2014年は症例がゼロとなった。鞭虫症例は鉤虫症例と比較してやや多いが、2005年以降はおおむね一桁でその数が推移した。

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が診断した症例から、回虫と同様に鉤虫および鞭虫の感染も、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確認された。なお、2014年に日本臨床寄生虫学会誌に報告された鉤虫症例は、鞭虫および回虫にも同時に感染していた(3種類の土壌媒介寄生蠕虫に重複して感染)。患者は84歳の女性で、無農薬野菜の栽培に従事していることが論文に記されており、自身が栽培した野菜に付着する虫卵を経口的に摂食して、継続的に感染していた可能性が示唆された。なお土壌媒介寄生蠕虫の症例数の経年推移は、BMLの資料を見る限り、虫種を問わずに相互に類似していた。従って自家菜園の下肥利用を背景とするなど、3種類の土壌媒介寄生蠕虫の感染経路や原因食品は、基本的には同様でないかと判断された。この点については今後のさらなる検証が必要と考えている。

E. 結論

土壌媒介蠕虫症として鉤虫症および鞭虫症は、少数ながら現在も日本国内で発生しているとの結論を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 杉山 広, 荒川京子, 柴田勝優, 川上 泰, 森嶋康之, 山崎 浩, 荒木 潤, 生野 博, 朝倉 宏. わが国における土壌媒介寄生虫症, 特に回虫症の発生とその汚染源の文献的および検査機関データに基づく調査. 食品衛生研究 65(4), 印刷中, 2015.

2. 学会発表 なし.

2. 非動物性食品からの寄生虫卵の検出方法: 超音波法の構築と従来法, ストマッカー法による成績との比較

A. 研究目的

現在, 我が国で流通する非動物性食品の土壌媒介寄生蠕虫卵汚染の程度は, 昨年度および今年度実施の文献調査の結果からも, 相当に低いと推定された. 従って虫卵の検出にあたっては, 多量の検体を効率的に処理する方法の開発が必要と考えられた. そこで昨年度は, 食品細菌の検査分野で汎用されるストマッカーの導入を検討し, 得られた検査結果について, 食品衛生検査指針に記載の従来法による成績と比較した. 今年度はさらに超音波法の導入を試み, 試験条件を検討するとともに, 得られた検査結果について, 従来法およびストマッカー法による成績と比較した.

B. 研究方法

昨年度に引き続き, 日本食品衛生協会食品衛生研究所に委託して本検討を実施した(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). 被検物質には, 屠畜場から入手した自然感染ブタ由来の豚回虫を選んだ. 豚回虫卵を接種する野菜には白菜を用い, 雌成虫に由来するタンパク膜が完成した虫卵から虫卵液を調製し, 模擬検体(虫卵接種検体)の調製を行った. また予備試験を繰り返して, 超音波処理の最適時間および洗浄容器のリンス回数を設定し, 寄生虫卵の検出方法としての超音波法を構築した. その上で本試験を実施し, 従来法およびストマッカー法で得た成績と相互に比較した. なお超音波法では, 従来法と同様, 1回の検体処理量に100g以上の試料を用いることが可能であるが, ストマッカー法との比較にあたり, 白菜重量は50g, 洗浄液量は250mlとして本試験を実施し, 沈殿法により回収虫卵数を求めた. また接種する回虫卵は1,000個および200個の2条件を選択し, 各々5回の実験を繰り返して回収虫卵数を求めた. 得られた値はF検定で分散を見極め, t検定で有意差を調べた.

C. 研究結果

予備試験の結果から、超音波処理時間は5分、洗浄容器のリンス回数は2回とした。また回収虫卵数に関しては、以下の結果を得た。

(1) 接種回虫卵数を1,000個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では1129.6 ± 104.7 (平均±標準偏差)、従来法では861.2 ± 264.4、ストマッカー法では1485.6 ± 398.6であった。ストマッカー法による回収

虫卵数の平均値が、従来法のそれより有意に高い(有意水準5%)との結果を得た。その他のデータ間には、有意差を認めなかった(表2)。

(2) 接種回虫卵数を200個とした場合

回収虫卵数は、超音波法では133.0 ± 19.4、従来法では133.4 ± 34.6、ストマッカー法では154.6 ± 48.2であった。各データ間には、有意差を認めなかった(表3)。

表2. 超音波法と従来法、ストマッカー法による虫卵回収数(接種虫卵数1000個/50g)

試験法	回収虫卵数(個)					平均±SD	t検定: P(T<=t) 両側	
							超音波法	従来法
超音波法	1031	1032	1263	1210	1112	1129.6 ± 104.7	-	-
従来法	854	469	1074	777	1132	861.2 ± 264.4	0.07	-
ストマッカー法	1505	1813	1670	1640	800	1485.6 ± 398.6	0.11	0.02*

表3. 超音波法と従来法、ストマッカー法による虫卵回収数(接種虫卵数200個/50g)

試験法	回収虫卵数(個)					平均±SD	t検定: P(T<=t) 両側	
							超音波法	従来法
超音波法	160	110	131	143	121	133.0 ± 19.4	-	-
従来法	122	151	185	107	102	133.4 ± 34.6	0.983	-
ストマッカー法	71	187	181	156	178	154.6 ± 48.2	0.380	0.447

D. 考察

検体からの寄生虫卵検出については、野菜表面をブラシでこする従来法が定着している。しかし多量の検体を効率的に処理する方法の開発が必要となり、昨年度はストマッカー使用の是非を検討した。その結果、ストマッカーの使用により、検体からの虫卵分離に要する時間が短縮され、また回収虫卵数は従来法よりも有意に多くなることが明らかとなった。しかしストマッカー処理の過程で、検体である野菜由来の微細な破片が多数発生し、これが虫卵計数用の試料に混入して、顕微鏡下の虫卵計数作業に障害を与え、顕微鏡観察に予想外の長時間が必要となることが判明した。そこで微細な破片を発生させない効率的な虫卵回収の方法として、新たに超音波法を検討することになった。

超音波法に関する予備試験の結果、5分間の超音波処理で虫卵回収数は最大となること

が分かった。また洗浄容器のリンスは2回とした。この条件で本試験を実施し、超音波法、従来法およびストマッカー法による試験結果を相互に比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意な差を認めなかった。

虫卵回収数に有意な差がない場合、検査の過程における作業をいくつか選び、その優劣に応じてスコアを与え、スコア合計に基づいて各試験法の優劣を総合的に判断する手法が採用される。このような定量分析の手法を、本検討にも適用した。すなわち、回収虫卵数のほか、1回の検査に使用可能な検体重量(検体重量)、各試験法に必要な処理時間(処理時間)、虫卵計数のための顕微鏡観察時間(観察時間)の計4項目を選定し、各項目についてスコアを与えて、各試験法のスコア合計を求めた(表4)。その結果、スコアの合計は超音波法、ストマッカー法、従来法の順とな

った。すなわち、超音波法は多数の検体から最も効率的に寄生虫卵を分離できる方法であることが分かった。超音波法は従来法に代替する非動物性食品（野菜）からの寄生虫卵検査法として、推奨されるべき方法と考えられ、

今後予定している非動物性食品の寄生虫卵汚染の実態調査では、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。

表 4 超音波法と従来法、ストマッカー法のスコアによる定量分析

検査法	回収虫卵数	検体重量	処理時間	観察時間	スコア合計
超音波法	2	3	2	3	10
従来法	1	3	1	2	7
ストマッカー法	3	1	3	1	8

各項目について以下の基準により 1~3 までのスコアを与え、その合計を算出した。

回収虫卵数：数値の最も高いものを 3、最も低いものを 1、中間のものを 2 とした。

検体重量：処理可能な検体重量の最も多いものを 3 とし、最も低いものを 1 とした。

処理時間：顕微鏡観察前までの作業時間が最も短いものを 3 とし、以下同上。

観察時間：顕微鏡観察の時間が最も短いものを 3 とし、以下同上。

なお同位のものには（例：検体重量）、同じスコアを与えた。

E. 結論

超音波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、従来法およびストマッカー法で得られた結果と比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意差を認めなかった。さらにスコア定量分析を行ったところ、超音波法が最も高いスコアを得たことから、試験法として推奨されるべきものと考えられた。

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。

第 AA14-13-06367 号

2015 年 1 月 22 日

試験検査成績書

回虫卵検査法としての超音波利用の是非
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

