

9

調査研究

(1) 報 文

- 1) 残留農薬分析における前処理方法の検討について 21
- 2) 大分県食品衛生指導基準の見直しに係る生野菜サラダ類の基礎的細菌実態調査 27
- 3) 大分県における急性呼吸器感染症からのウイルス検出状況（2012～2013年） 33

残留農薬分析における前処理方法の検討について

橋口 祥子、林 由美^{※1}、衛藤 加奈子、岡本 盛義、高橋 尚敬、二宮 健、長谷川 昭生

Study of Pretreatment Method in Pesticide Residue Analysis

Shoko Hashiguchi, Yumi Hayashi, Kanako Eto, Moriyoshi Okamoto
Naotaka Takahashi, Takeshi Ninomiya, Akio Hasegawa

Key Words : 残留農薬 pesticide residue, 前処理 pretreatment method

要 旨

当センターではガスクロマトグラフ質量分析装置（以下、「GC-MS」）および高速液体クロマトグラフ質量分析装置（以下、「LC-MS/MS」）の2種類の分析機器を用いて、厚生労働省が通知している一斉分析法に従い、約250種類の残留農薬について検査を行っている。食生活の多様化により輸入農作物や加工食品が多くなった今般、さらに多種多様な食品に含まれる数多くの農薬分析が必要となり、簡便で迅速な一斉分析法が求められる。

このことから、迅速簡易な前処理方法¹⁾であるQuEChERS法等を参考に残留農薬の抽出及び一部精製方法の検討を行った。この結果、GC-MSにおいて農薬の回収率の改善、器具準備及び前処理時間の短縮、試薬使用量の減少等に伴うコストの削減が可能になった。また、今回の検討法により、数次加工食品についても添加回収試験を行ったところ、80%~108%と非常に良好な結果が得られた。

はじめに

平成18年のポジティブリスト制度の導入に伴い、残留農薬の分析は、一度に多数の農薬を分析する一斉分析法が広まった。また、食生活の多様化に伴う輸入食品及び加工食品の増加により、多種多様な食品の分析が要求されるようになった。

当センターは、厚生労働省が示している「GC/MSによる農薬等の一斉試験法（農産物）」（以下、「現行法（GC）」）および「LC/MSによる農薬等の一斉試験法 I（農産物）」（以下、「現行法（LC）」）により、残留農薬の試験検査を行っている。検量線には、マトリックス検量線を採用しているため、食品の種類が増加に伴い、操作検体数が増大する。このため、多種多様な食品の、迅速な一斉分析法が求められている。

そこで、現在使用している試薬等を変更または追加することなく、迅速簡易かつ広範囲に適用可能な一斉分析法を、QuEChERS法を参考に検討した。

材料および方法

1 試料および試薬

試料は過去5年間で最も収去頻度が高いだいこん及び冷凍加工食品9種類を用いた。

GC-MSを用いた検査について、試薬は標準品および混合標準品として、食品分析用、残留農薬試験用を使用した。標準原液はアセトン：ヘキサン(1：1)を用いて、1000 μ g/mL若しくは500 μ g/mLに調整した。混合標準原液は、アセトン：ヘキサン(1：1)を用いて1 μ g/mLに調製した。有機溶媒については、残留農薬分析用を使用した。その他の試薬については、特級を使用した。

LC-MS/MSを用いた検査について、試薬は標準品および混合標準品として、食品分析用、残留農薬試験用、LC/MS用、HPLC用を使用した。標準原液は、メタノールを用いて、100 μ g/mLに調製した。混合標準原液は、メタノール：水(1：1)を用いて、1.0 μ g/mLに調整した。有機溶媒については、残留農薬分析用およびLC/MS用を使用した。その他の試薬については、特級を使用した。

※1 福祉保健部豊肥保健所

2 方法

2.1 装置と測定条件

測定機器はAgilent Technologies社製GC部6890N、MS部5975MSDのガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS）、およびAgilent Technologies社製1200 seriesおよび6460のタンデム型質量分析計付高速液体クロマトグラフ（LC-MS/MS）を用いた。測定に係るカラム等の測定条件は表1のとおりとした。

使用する水はすべて当センターが所有する超純水製造装置から採水した超純水を使用した。

試料の精製を目的として、GL-Sciences社製GL-Pak GC/PSAカラム（以後、「GC/PSAカラム」）、同社製GL-Pak SAXカラム（以後、「SAXカラム」）、Waters社製Sep-pak C18カラム（以後、「C18カラム」）およびMillipore社製フィルターDISMIC-13HP020 ANを使用した。

2.2 検量線の作成

検量線用標準溶液は、GC-MSで0.04、0.1、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LC-MS/MSで0.002、0.005、0.01、0.02、0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう調製した。いずれもマトリックス検量線を採用した。GC-MSについては、測定対象農薬を含有していないことを確認済みの試料の

前処理最終段階でアセトン：ヘキサン1mLを添加するところ、各検量線用標準溶液を1mL添加することにより作成した。LC-MS/MSについては、HPLC注入プログラムにより、測定対象農薬を含有していないことを確認済みの試料を、各濃度の検量線用標準溶液に等量混合する方法により作成した。

2.3 試料溶液の調製

現行法に従い、フードプロセッサーにより細切、均一化した試料10.0gを50mL遠沈管に量りとり、抽出用アセトニトリル10mLを添加し、2分間ホモジナイズした。その後、M. Anastassiadesらが提唱したQuEChERS法を参考に、塩化ナトリウム1.0g、クエン酸三ナトリウム二水和物1.0g、クエン酸水素二ナトリウムセスキ水和物0.5g、無水硫酸マグネシウム4.0gを加え、1分間激しく振とうし、3000rpm、5分で遠心分離を行った。上澄み液を分取し、適宜固相カートリッジカラムによる精製を行い、濃縮後、GC-MSにおいてはアセトン：ヘキサン（1：1）を添加、LC-MS/MSにおいてはメタノール：水（1：1）を添加、溶解したものを試験溶液とした。（図1参照）

表1 GC-MSおよびLC-MS/MSの測定条件

GC-MS条件	
カラム	Agilent J&W GC Columns HP-5MS (0.250mm i.d. ×30m、膜厚0.25 μm)
昇温条件	50°C(1min)→25°C/min(0min)→10°C/min→300°C(10min)
注入口温度	250°C
注入量	2 μL (パルスドスプリットレス)
キャリアーガス	He (コンスタントフローモード)
MSイオン源温度	230°C
イオン化法	Electron Ionization(ED)法
イオン化電圧	70eV
四重極温度	150°C
測定モード	ScanおよびSelective Ion Monitoring(SIM)モード
LC-MS/MS条件	
カラム	L-column ODS (2.1mm i.d. ×150mm、5 μm 、財団法人化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
移動相	A液 0.05%ギ酸水溶液 B液 0.05%ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント条件	B液：25%(1min)→95%(12min)→95%(13min)→25%(0.2min)→25%(4.8min)
注入量	4 μL
流量	0.2mL/min
イオン化法	ESI+
測定法	MRM
キャピラリー電圧	3500V

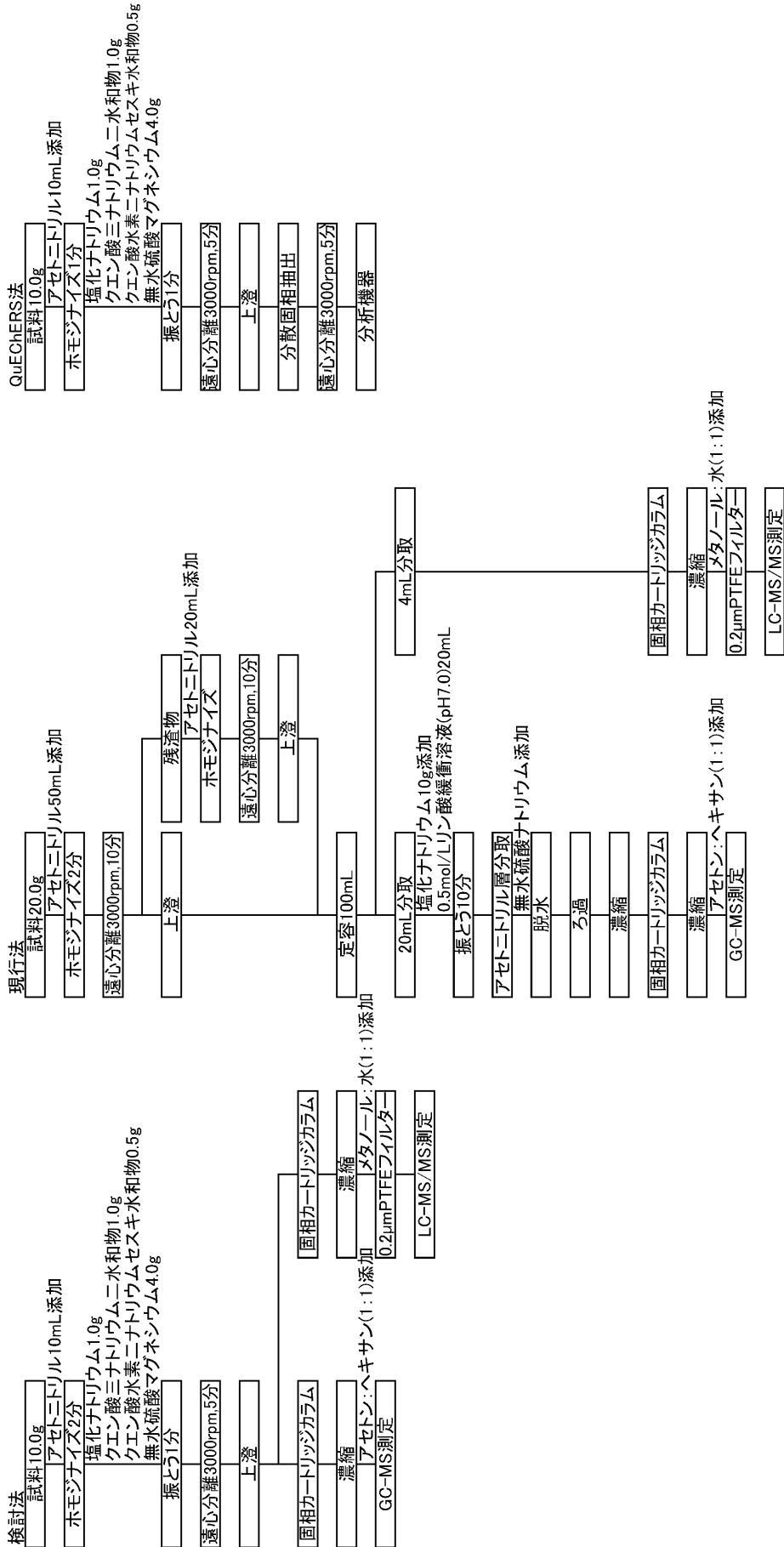


図1 各前処理のフローの比較

結果と考察

1 結果

1.1 LC/MS/MSの移動相の検討

現行法では5mmol/L酢酸アンモニウム水溶液および5mmol/L酢酸アンモニウム-アセトニトリル溶液によるグラジエント分析を行っていた。移動相として、0.05%ギ酸水溶液およびアセトニトリルを使用する頻度が多いことから、安定化の時間を短縮する目的で、0.05%ギ酸水溶液および0.05%ギ酸-アセトニトリル溶液で検討を行った。0.05%ギ酸水溶液および0.05%ギ酸-アセトニトリル溶液を移動相として使用したものについて、同等あるいは同等以上の添加回収試験の結果が確認されたので、以降この移動相で分析を行った。

1.2 抽出および一部精製操作の検討

QuEChERS法を参考にして、前処理方法の検討を行った。QuEChERS法の分散固相抽出を、現行法で使用している固相カートリッジカラムを用いた精製方法に変更したものを、検討法とし、添加回収試験を実施し、現行法と比較を行った。(図2)

この結果、GC-MSによる検討法は現行法に比べ、添加回収結果が良好な農薬成分が増加し、前処理時間の短縮、試薬及び溶媒の削減、使用器具の削減等、非常に良好な結果が得られた。

LC-MS/MSによる検討法は、現行法に比べて添加回収結果が良好な農薬成分の増加、使用溶媒の削減等、良好な結果が得られた。

このことから、以降この方法で抽出および一部精製操作を行うこととした。

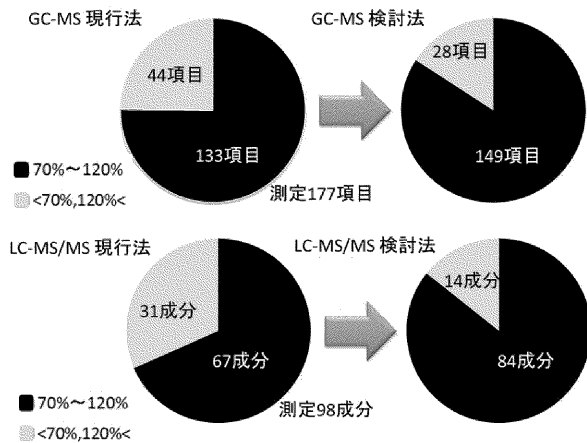


図2 現行法および検討法の添加回収率比較

1.3 カートリッジカラムによる精製の検討

GC/PSAカラムの試料溶液負荷量 (GC: 2mLまたは4mL, LC: 1mLまたは2mL) 及び溶出溶液量 (GC-MS: 5、10、20、25mL, LC-MS/MS: 5、10、15、20mL) を検討した。(図3、図4-1、図4-2)

GC-MSについて、GC/PSAカラムへの試料溶液アプライ量は2mLと4mLで比較を行った。

結果、回収率の差はあまり見られなかったが、ピークの形状が4mLの方が良好であった。また、溶出溶液量は5ml及び10mlの回収率に比べて、20mL及び25mLの回収率は良好であった。溶出溶液量20mLと25mLについては、差が見られなかった。

従って、検討法では使用溶媒削減のため、溶出溶液量は20mlとした。

LC-MS/MSについて、GC/PSAカラムへの試料溶液アプライ量は1mLと2mLで比較を行った。

結果2mLで良好であった。また、溶出溶液量は5mL及び10mLの回収率に比べて、15mL及び20mLの回収率は良好であった。溶出溶液量15mLと20mLについては、差が見られなかった。しかし、回収率が改善される可能性のある成分が、溶出溶液量20mLの方が多かったことから、溶出溶液量は20mlとした。

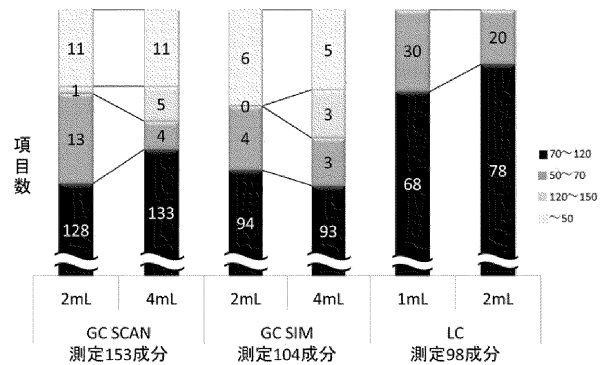


図3 試料溶液アプライ量の検討

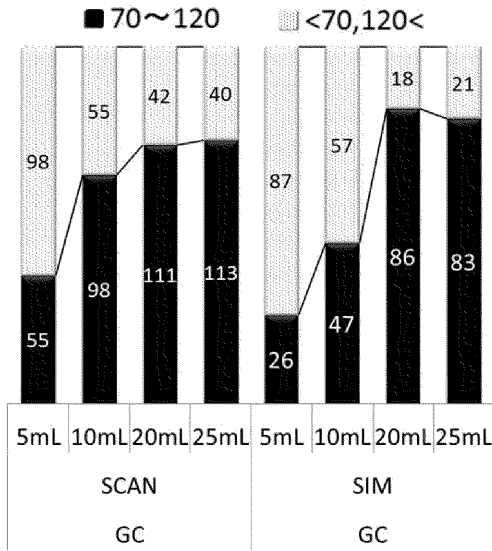


図4-1 GC-MSにおける溶出溶液量の検討

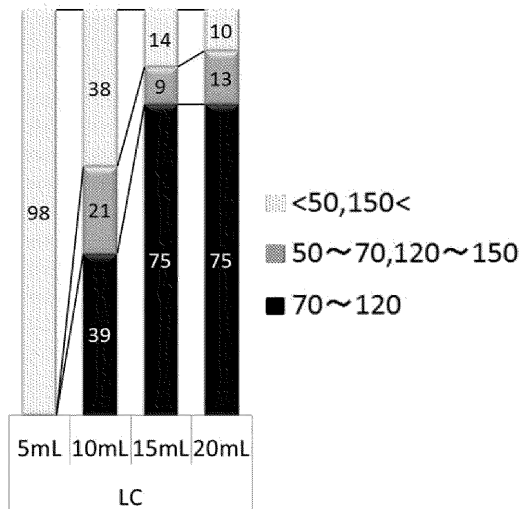


図4-2 LC-MS/MSにおける溶出溶液量の検討

1.4 夾雑が少ない試料を用いた検討

試料として、過去5年間で最も収去頻度の多いだいこんを用いて、検体数5の並行試験を現行法と検討法で実施し、結果書に記載可能な項目数の比較を行った。結果、検査項目246項目中、現行法183項目、検討法210項目であった。一方、LC-MS/MSにおいて、重要項目であるチアベンダゾール、メタミドホス、アセフェートについて、回収率が低下した。時間の短縮および溶媒等のコスト削減について、LC-MS/MSを用いた検討法では顕著な結果が得られなかったことから、以降GC-MSについてのみ検討を行うこととした。

1.5 数次加工食品を用いた検討

当センターでは、平成26年1月に発生した冷凍食品のマラチオン混入事件を受けて、平成25年3月26日付事務連絡「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について」（以後、「事務連絡法」）に準じて有症状冷凍食品のマラチオンの検査を行った。これに伴い、新たな試薬の購入や事務連絡法の検討等に多大な時間を要した。これに対し、検討法は汎用性を兼ね備えており、加工食品についても一部操作を加えることにより検査が可能である。

(図5) 今回依頼のあった9種類の冷凍食品について、試料濃度0.05 μ g/gとなるように添加回収試験を行った。その結果、回収率は80%~108%となり、事務連絡法で目標とされている回収率の50~200%に比べ、非常に良好な結果であった。(図6)

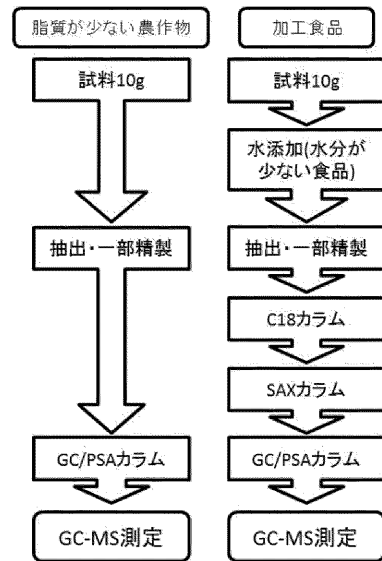


図5 農作物(だいこん)と加工食品の操作比較(抽出および精製)

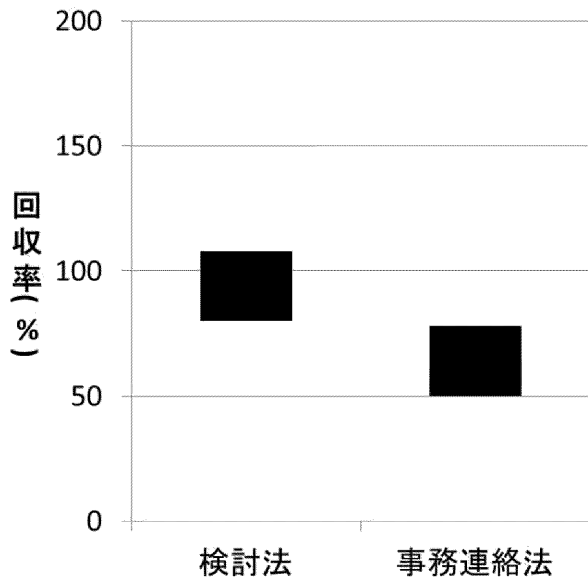


図6 検討法と事務連絡法の加工食品(9種類)添加回収率の比較

参 考 文 献

- 1) 林由美ら：LC/MS/MSによる動物用医薬品の簡易一斉分析法検討，大分県衛生環境研究センター年報, 40, 39 - 45 (2012)

2 まとめ

GC-MSによる残留農薬分析について、抽出法及び精製操作の検討により抽出時間の短縮、使用器具の減少、使用溶媒量の削減が可能となった。これに伴い器具への付着等による農薬の減損が押さえられ、回収率の向上にもつながったと考えられる。また、LC-MS/MSによる残留農薬分析については、わずかな時間の短縮とコストの削減を可能にしたが、一部使用頻度が高い農薬の回収率が悪くなった。このことから本検討法はGC-MSを用いた残留農薬分析について有効な方法であると考ええる。

加えて検討法は汎用性があり、今回の有症状冷凍食品の緊急性の高い検査では、マラチオンのみではあるが、当センターで常備している試薬および器具を利用できる迅速かつ簡易な方法であることが分かり、さらに回収率も良好であった。このことから、検討法は緊急性の高い農薬検査における前処理法として有用であると考ええる。

今後も様々な食品について、適用可能かを継続して確認していきたい。

大分県食品衛生指導基準の見直しに係る生野菜サラダ類の基礎的細菌実態調査

成松 浩志、佐々木 麻里、加藤 聖紀、緒方 喜久代
大分県保健所検査室、大分県食品衛生監視機動班
大分市保健所、大分県食品安全・衛生課

Microbiological Basic Research of Raw Vegetable Salads to Revise the Oita Prefectural Food Hygiene Guidelines and Standards

Hiroshi Narimatsu, Mari Sasaki, Miki Kato and Kikuyo Ogata
Examiners of Oita Prefectural Tobu, Houhi and Hokubu Public Health Center
Oita Prefectural Government, Task Force for Food Hygiene Monitoring and Guidance
Oita city public health center
Oita Prefectural Government, Food Safety and Hygiene Division

Key Words：生野菜サラダ Raw vegetable salad, 大腸菌 *Escherichia coli*,
食品衛生指導基準 Food hygiene guideline and standards,
衛生指標菌 Indicator bacteria, 特定酵素基質法 Defined Substrate method

要 旨

生野菜サラダ・カット野菜類については、県食品衛生指導基準による「大腸菌群」不適合が多く指導に苦慮していたため、大腸菌等の細菌汚染実態調査を行い、大腸菌の簡易迅速検査法を検討した。県内流通品214検体中3検体（1.4%）から大腸菌が検出された（病原性大腸菌は不検出）。大腸菌群数は、細菌数と相関したが、大腸菌との関連は認められず、ほとんどの大腸菌群は野菜常在菌と推測された。「大腸菌」の特定酵素基質法による増菌培養法は、優れた感度と特異性を示し、的確な糞便汚染探知のため大腸菌群に代わる指標として適当と考えた。

はじめに

近年、食生活の「中食」^{1,2)}化から、生食用野菜を主な材料とするサラダ等の未加熱そうざい類の消費が増加している³⁾。ここ数年、生野菜類を原因食品とする病原性大腸菌による広域的な食中毒が国内外で発生し^{4,6)}、死者も多数出ており、日常監視の強化が急務とされる。

一方、生野菜に付着している植物・環境由来の常在菌には、糞便汚染とは無関係に一定の割合で「大腸菌群」⁷⁾として検出されるものが多く、大分県食品衛生指導基準（以下、指導基準）に基づく検査で不適合の判定を受け、指導に苦慮する事例⁸⁾が少ない。このため、糞便汚染を的確に検知し、営業者への適切な指導を行うために指導基準の改正が求められている。

そこで、生野菜を使用した未加熱そうざい類の指導基準の見直しを検討するための基礎的データを得るために、大分県食品安全・衛生課の依頼によって大分県食品衛生監視機動班、東部・豊肥・北部保健

所検査室及び大分市保健所との共同調査研究で、県内に流通する生野菜サラダ類の細菌汚染実態調査を行った。

また、大腸菌検査法の簡易迅速化を検討するため、特定酵素基質法を利用した乾燥培地法（コンパクトドライ）及び増菌培養法による検査も試行したので報告する。

材料及び方法

1 検査材料

2012年5月から2013年12月の間に、生野菜を主な材料とするサラダ類や生食用のカット野菜を対象とし、大分県内の量販店や弁当店、コンビニエンス店等で収去または購入した。2012年度に214検体、2013年度は、大腸菌の簡易増菌検査法の検討のため、176検体とそれ以外のそうざいについても107検体を検査材料とした。

2 検査項目

一般生菌数（以下、細菌数）、大腸菌群数、大腸菌数（推定）、黄色ブドウ球菌、病原性大腸菌、サルモネラ、リステリア（*Listeria monocytogenes*に限る）

3 検査実施機関と検査方法

3.1 衛生環境研究センター（衛環研）

検体100gを無菌的に細切・混合し、その内25gをフィルター付き滅菌ストマッカー袋（GSIクレオス社製）に量り採り、滅菌リン酸緩衝生理食塩液等（希釈液）を225ml加え、1分間のストマッキングを行った後、フィルターを濾して得られた試料液を試料原液（10倍乳剤）として細菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌検査等に供した。

細菌数検査はコンパクトドライTC（CDTC）（日水製薬社製）を、大腸菌群数と大腸菌数検査はコンパクトドライEC（CDEC）（日水）を使用した（以下、CD法）。また、CDECで大腸菌を疑う青色コロニー（以下、推定大腸菌）が検出された場合、5~10個程度釣菌して大腸菌（*E.coli*）の分離同定試験を行った。

黄色ブドウ球菌検査は指導基準の検査法であるMSEY培地（日水）への直接塗抹法（コンラージュ法）で実施した。

サルモネラ検査は常法（SOP）で実施した。検体25gにEEM培地（栄研化学社製）225ml加えて36°Cで18時間の前培養後、その1mlをセレナイトシスチン培地（基礎培地は日水）に接種し、43°Cの水浴中で16時間の選択培養を行った培養液をDHL（栄研）、SS（栄研）、MLCB（日水）の各寒天平板培地に画線塗抹して36°Cで20~24時間分離培養した。

リステリア検査はISO-11290-1に準拠した検査法で実施した。第1段階増菌培養にはハーフフラザブイオン（シスメックス・ピオメリユ社製）を、第2段階増菌培養にはフラザブイオン（同社製）を用い、分離培地にはパルカム寒天培地（同社製）とリステリアOAA寒天培地（同社製）を用いた。

なお、2013年度はサルモネラとリステリアの検査を大分県薬剤師会検査センターに委託した。

病原性大腸菌検査は、2012年度は試料25gに225mlのTSB（BD社製）を加えて36°C18時間培養後の培養液1mlから、2013年度は、試料原液50mlに等量の2倍濃TSBを加えて混合し、36°Cで18時間培養後

の培養液1ml及び同様にして試料原液を加えたmEC培地（栄研）の42°C20時間培養後の培養液1mlから、各々プレートDNAを抽出し、PCR法で病原性関連遺伝子（VT, ST, LT, *invE*, *eae*, *aggR*）を検索した。プライマーは^{9,10}、VT検出用にmMK1_1, 2及びmMK2_1, 2、ST検出用にST-3とST-5、LT検出用にLT-3とLT-4、*invE*検出用にI-1とI-5、*eae*検出用にeae1とEA-2、*aggR*検出用にaggRks1とaggRkas2を用いた。PCR用酵素・バッファー・基質は、TaKaRa Ex-Taq Hot Start Version（TaKaRa BIO社製）を用いた。サーマルサイクラーは、DNA Engine Tetrad2 PTC-240（Bio-Rad社製）を使用し、PCR産物は電気泳動で確認した。

プレートDNAは、キレックス抽出法を用いて得た。すなわち、培養液1mlを12000rpmで5分間遠心後、上清を捨て、沈査に200μLのキレックス液〔5%W/Vの割にキレックス（Chelex 100 Resin 200-400Mesh Sodium Form、BioRad社製）を含むTE緩衝液（pH8.0）〕を加え、よく攪拌して再懸濁し、次いで沸騰水浴中で10分間加熱後、12000rpmで5分間遠心して得られた上清をプレートDNAとした。

3.2 保健所検査室（東部・豊肥・北部・大分市）

細菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌検査は2012年度時現行の指導基準の検査法（現行法）で実施した。細菌数は標準寒天培地（栄研）混釈培養法⁷、大腸菌群数はデソキシコーレイト培地（栄研）混釈培養法（以下、デソ法）⁷を用いた。

2012年度は、CDECを併用して大腸菌群数と大腸菌数の検査も行った。

2013年度は、大腸菌数（推定）の直接培養検査法として、TBX寒天培地（クロモカルトTBX寒天培地、メルクミリポア社製）混釈培養法（以下、TBX混釈法）とXM-G寒天（日水）混釈培養法（以下、XM-G混釈法）を検討した。培養温度は前者が44°C、後者が35~37°Cで、培養時間はともに24±2時間とした。

培地上に大腸菌を疑うコロニー（CDECとXM-Gは青色、TBXは青緑色コロニー）が発育した場合は衛環研にて*E.coli*の分離同定試験を行い、同時に当該検体の試料液及び分離菌株について、病原性大腸菌検査（PCR法）も実施した。

2012年度に、サルモネラとリステリア検査は、東部保健所の一部検体のみ行った。サルモネラ検査は常法（SOP）で、リステリア検査は、第2段階増菌

培養液を試験液としてシングルパスL'mono（メルクミリポア社製）を用いたイムノクロマト法によるスクリーニングを行った。

3.3 大腸菌の増菌培養法（2013年度実施、衛環研・保健所）

以下の増菌培養法（ECブルー増菌法）を試行した（図1）。

①試料原液100mlをピルビン酸添加X-GAL-MUG培地：ECブルー-100（日水）のボトル（100ml定性試験用ボトル入り滅菌培地）に加えてよく混ぜる。

②上記ECブルーをふ卵器内にて35~37°Cで24時間培養する。

③ECブルー培養液を使い捨ての滅菌パスツールピペット等で取り、その2滴（または50μL）を3ml

のラウリル硫酸加X-GAL-MUG液体培地（XMプロス、エルメックス社製）に加え、これを35~37°Cで24時間培養する。一方、ECブルー培養液に366nmの紫外線を照射し蛍光が（弱くても）認められれば、その1白金耳量を1枚のXM-G寒天平板培地（日水）に画線塗沫して、35~37°Cで24±2時間培養する。

④XMプロス培養液の1白金耳量を1枚のXM-G寒天平板培地またはTBX寒天平板培地に画線塗沫して、35~37°Cで24±2時間培養する。この際、XMプロス培養液に366nmの紫外線を照射し蛍光の有無を観察しておく。

⑤上記③または④のXM-G寒天平板培地に青色コロニー、TBX寒天平板培地に青緑色コロニーの発育が認められれば、釣菌して分離同定しE.coliであることを確認する。

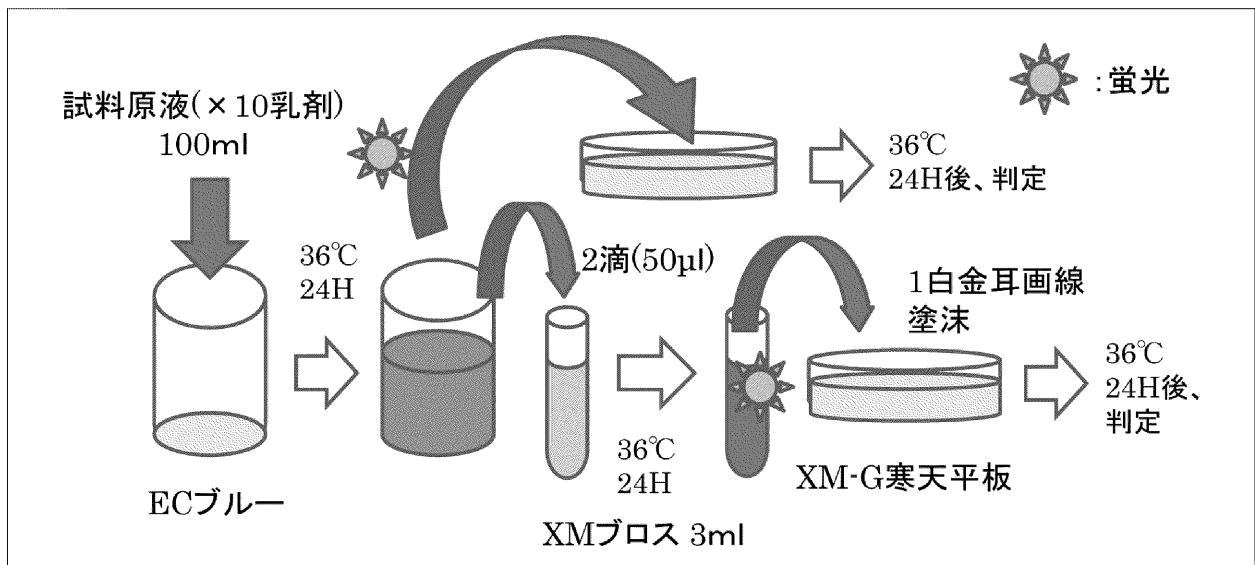


図1 大腸菌の特定酵素基質培地を用いた増菌培養法（ECブルー増菌法）

衛環研では、上記の他にmEC培地による増菌法（以下、mEC増菌法）も検討した。すなわち、2倍濃厚のmEC培地50mlに試料原液50mlを加えて混和し、42°Cで24時間培養後、培養液1白金耳量を1枚のXM-G寒天平板培地またはTBX寒天平板培地に画線塗沫して、36°Cで24±2時間培養した。これと並行して、上述の方法のECブルー培養液をmEC培養液に替えて③以降の検査も実施した。

結 果

1 細菌数、大腸菌群数

細菌数と大腸菌群数の菌数をそれぞれ常用対数（Log）に変換して、平均値±標準偏差及び中央値を求めた（単位：Log CFU/g）。保健所実施（n=

185）の現行法では、細菌数は 4.7 ± 1.4 （中央値4.8）、大腸菌群数は 2.4 ± 1.7 （2.2）であった。CD法による大腸菌群数は 3.2 ± 1.7 （3.2）であった。一方、衛環研実施（n=79）のCD法では、細菌数は 5.3 ± 1.2 （5.1）、大腸菌群数は 4.3 ± 1.4 （4.3）であった。細菌数と大腸菌群数（デソ法）には正の相関（ $R=0.66$ ）があり、大腸菌群数が細菌数の1~2Log程度低い値となる傾向があった。細菌数とCD法による大腸菌群数では、より高い相関（ $R=0.80$ ）を示し、大腸菌群数は細菌数の1-2Log低い値をとった。大腸菌群数の現行法（デソ法）とCD法にも相関があり（ $R=0.80$ ）、CD法の菌数が現行法よりも高くなる傾向がみられた。ともにCD法による細菌数と大腸菌群数との間には高い相関（ $R=0.90$ ）

が認められた。

保健所検査室分(185検体)の結果において現行指導基準(未加熱そうざい)で判定すると、適合65検体(35.1%)、要注意49検体(26.5%)、不良71検体(38.4%)だった(表1)。細菌数だけで見た場合、100CFU万/g以下に全体の85%(157/185)が収まっていた。[衛環研のCDTC法のデータでは同範囲に76%(60/79)]

表1 現行指導基準による判定(保健所検査室検査分)

		細菌数(標準寒天培地混釈培養法)		
		≤10 ⁵	≤10 ⁶	>10 ⁶
大腸菌群数 (デソ法)	<10 ²	65	16	2
	≤10 ³	22	11	4
	>10 ³	17	26	22

注:網掛け部分は要注意(薄い)と不良(濃い)ランク

2 大腸菌(2012年度)

CDECで推定大腸菌は214検体中16検体(7.5%)で検出され、内15検体について大腸菌(*Escherichia coli*)の分離同定試験を行ったところ、その20%にあたる3検体(全214検体中では1.4%)から*E.coli*(病原因子非保有)が分離されたが、大腸菌群数や推定大腸菌数の多少と*E.coli*の検出とは無関係だった。なお、CDEC上で青色コロニーを形成したが、*E.coli*ではなかった菌の内、属・種が推定できたものは、*Buttiauxella agrestis*、*Buttiauxella sp.*、*Pantoea sp.*、*Leclercia adecarboxylata*、*Kluyvera cryocrescens*、*Kluyvera intermedia*、*Enterobacter sp.*などであった。

3 サルモネラ、リステリア及び病原性大腸菌(2012~2013年度)

検査した生野菜サラダ・カット野菜類のいずれの検体からも検出されなかった。検出数/検体数:サルモネラ(0/115)、リステリア(0/115)、病原性大腸菌(0/97)

4 黄色ブドウ球菌(2012年度)

212検体中2検体(スパゲティサラダ、ホウレン草サラダ)から検出された(検出率0.9%:2/212)。

5 大腸菌(*E.coli*)の直接培養法及び増菌培養法の比較検討(2013年度)

生野菜サラダ・カット野菜類176検体及びその他のそうざい107検体について、直接培養法(以下、直接法)及び増菌培養法(以下、増菌法)を比較した(表2)。直接法は、XM-G混釈法で7検体(7/233)、CDECで3検体(3/50)に青色コロニー(推定大腸菌)が発育し、その内、XM-G混釈法の2検体とCDECの1検体から大腸菌が検出された(3/10、30%)。なお、TBX混釈法で大腸菌が検出されたものはなかった(0/151)。一方、増菌法では8検体(8/283)が、ECブルーまたはXMプロスで蛍光を発し、その全てから大腸菌が検出された(8/8、100%)。この他に蛍光は発しなかったもののECブルー増菌液から大腸菌が検出されたものが1検体(豚肉炒め)、mEC増菌液から大腸菌が検出されたカット野菜が1検体あった。衛環研では増菌法で蛍光が認められなかった57検体について、大腸菌の分離を継続してみたが、大腸菌が検出されたのはこの2検体だけだった(3.5%、2/57)。直接法・増菌法ともに大腸菌が検出されたものは3検体あったが、直接法のみ検出はなかった。

表2 直接培養法と増菌培養法の比較

	検体数	直接分離培養		増菌分離培養	
		青色コロニーの発育が認められた検体数	左記の内、大腸菌が検出された検体数	ECブルーまたはXMプロスで蛍光を発した検体数	左記の内、大腸菌が検出された検体数
生野菜サラダ・カット野菜類等	176	9	2	5	5
その他のそうざい等	107	1	1	3	3
計	283	10	3 (30%)	8	8 (100%)

大腸菌が検出された生野菜サラダ・カット野菜類6検体とその他のそうざい4検体の計10検体についての詳細を表3に示す。大腸菌の存在の有無は大腸菌群数や推定大腸菌数と相関しておらず、大腸菌の汚染菌数は少量で、増菌法でなければ検出できない場

合が多かった（10検体中7検体が推定大腸菌数検出下限未満）。ECブルーで一次増菌してXMプロスで二次増菌後に、XM-G寒天平板で分離培養する方法（ECブルー・XMプロス・XM-G系）が最も分離率がよかった。

表3 大腸菌が検出された検体の菌数とその検査法

No.	品名	細菌数 (CFU/g)	大腸菌 群数 (CFU/g)	推定 大腸菌数 (CFU/g)	直接 培養 法	増菌培養法			
						ECブルー ↓ XM プロス XM-G等 ←	↘	mEC ↓ XM プロス XM-G等 ←	↘
E16	野菜サラダ	4.3×10^4	8.2×10^3	<5	-	-	+	-	•
E22	カット野菜 ※	2.8×10^7	2.3×10^6	<5	-	-	-	+	•
E46	ベビーリーフ ※	1.0×10^8	7.5×10^6	5.0×10^2	+	+	+	+	+
H13	カット野菜	•	1.2×10^3	<5	-	+	+	-	-
H17	カットキャベツ	•	3.1×10^2	1.0×10	+	-	+	-	-
T12	大根サラダ	•	<5	<5	-	+	•	•	•
O131	豆腐	1.3×10^4	* 1.2×10	1.0×10^2	+	+	+	•	•
O1216	豚肉炒め	9.0×10^2	* <5	<5	-	+	•	•	•
H6	ほうれん草のゴマ和え	4.4×10^4	* 1.0×10^2	<5	-	-	+	-	-
H9	ほうれん草の白和え	5.4×10^3	* 1.0×10^2	<5	-	-	+	+	+

注) +は検出、-は不検出、•は未実施（NT）。
大腸菌群数検査で、*はデソ法、それ以外はCDECで実施。
推定大腸菌数は、XM-G混積法またはCDECで実施。*：野菜素材

考 察

県内に流通する生野菜サラダ・カット野菜類には、数%の低頻度で、しかも菌数は少量である場合がほとんどであったが、大腸菌が検出され、糞便汚染が疑われる野菜の存在が示唆された。

大腸菌の存在の有無は、大腸菌群数とは関連性がなかったこと、大腸菌群数は細菌数と相関し、菌量的には1~2Log低い値であることから、糞便汚染とは直接関係のない植物・環境由来の常在菌の一部が大腸菌群として検出されるものと考えられる。よって原材料及び調理加工工程における糞便汚染を的確に検知するためには、大腸菌群は不適當で、大腸菌を指標とする方が合理的である。

少量の大腸菌を感度よく検出するためには、直接培養法よりも増菌培養法がよく、ECブルーやXMプロスなどの特定酵素基質法を用いた場合、蛍光は大腸菌の存在のよい指標となることがわかった。直接培養法では、青色コロニー（推定大腸菌）が発育しても、大腸菌ではない場合が多かったが、ECブ

ルー・XMプロス・XM-Gの検査系では、青色コロニーが出現すればそれは100%大腸菌であった。選択増菌を2回かけるので大腸菌以外の菌は抑制されるものと推察される。また、XMプロスに少量のECブルー増菌液を接種することによる希釈効果で食品由来成分の影響もかなり減弱されることが期待される。細菌学的厳密さには欠けるかもしれないが、衛生指標として考えた場合、指導基準の簡易迅速検査では、この検査系の最後のXM-G寒天平板上に青色コロニーの発育が認められた時点で「大腸菌陽性」と判定しても支障なからう。さらに、この検査法は、生野菜サラダ・カット野菜類以外のそうざいに適用を拡大しても問題がないこともわかった。病原性大腸菌のみならずノロウイルスによる食中毒予防の観点からも、感度のよい本検査法は、糞便汚染の検知に有用と思われる。

衛生的な取扱いをみる指標として細菌数は有用であるが、生野菜類は、ベースの常在菌の菌数値が高いので、現行の未加熱そうざいの細菌数の指導基準

(10万CFU/g以下)は、厳しすぎる。基本的に指導基準は、実際の流通食品の実態調査の結果と学問的に理想的なレベルのバランスから、不適合率がほぼ20%前後になるように設定される¹²⁾。今回の調査で、生野菜サラダ・カット野菜類の細菌数の分布を見ると、100万CFU/g以下に全体の85%が収まるので、細菌数の基準は「100万CFU/g以下」が妥当である。また、弁当及びそうざいの衛生規範¹³⁾でも、未加熱そうざいの細菌数は「100万/g以下」とされているので、特に基準が緩いということはないであろう。

一方、病原性細菌については、黄色ブドウ球菌が1%未満の低率で検出されたが、サルモネラ、リステリア、病原性大腸菌は今回調べた範囲では不検出であった。黄色ブドウ球菌は、不衛生な取扱いによる手指等からの汚染を知る指標として有用である。サルモネラやリステリアは、他の報告¹⁴⁻¹⁶⁾を見ても低頻度であり、検査コストも考慮すると指導基準として日常的な検査項目とする必要性は低いと思われた。本来、指導基準は、自主衛生管理や衛生指導のための指標であり、個々の食品の安全性を保障するものではない。指導基準の検査で特に衛生状態が好ましくない食品が見つければ、別途、取去検査でサルモネラやリステリア等の必要な検査を実施する方が合理的と考える。

以上から「生野菜サラダ・カット野菜類」については、「細菌数100万/g以下、大腸菌が特定酵素基質法を用いた増菌法で陰性、黄色ブドウ球菌陰性」という新基準を設けることが適当と考えられた。

参 考 文 献

- 1) 高野朋美：中食，知恵蔵2009，(株)朝日新聞出版(2008)
- 2) 村島克利：中食市場の現状と展望，Mizuho Industry Focus Vol.50 (2006)
- 3) 農業協同新聞：(株)サラダクラブ急伸する「カット野菜」市場，JAcomホームページ (<http://www.jacom.or.jp>) (2013)
- 4) 大西真ら：ドイツを中心としたEAggEC-EHEC O104：H4による大規模集団事例，IASR 33, 131-132 (2012)
- 5) 片岡郁夫ら：浅漬による腸管出血性大腸菌O157の集団食中毒事例(中間報告)，食品衛生研究, 63 (1), 27-35 (2013)
- 6) 稲口舞子ら：千切りキャベツによる広域食中毒の発生について，食品衛生研究, 63 (2), 45-48 (2013)
- 7) 厚生労働省監修：2汚染指標菌，食品衛生検査指針 微生物編 2004, 116-145, (社)日本食品衛生協会，東京(2004)
- 8) 林徹ら：生食用野菜と県指導基準について，平成23年度食品衛生監視員・と畜食鳥検査員・狂犬病予防員研究発表会抄録集, 56-59 (2012)
- 9) 伊藤健一郎：遺伝子検査法，平成23年度 短期研修 細菌研修テキスト, 国立保健医療科学院，和光市(2011)
- 10) 伊藤文明ら：下痢原性大腸菌のPCR法，臨床病理, 43, 772-775 (1995)
- 11) 小林一寛ら：下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察，感染症学雑誌, 76 (11), 911-920 (2002)
- 12) 倉田 浩ら：改訂食品衛生における微生物制御の基本的考え方，社団法人日本食品衛生協会発行，東京都(1994)
- 13) 厚生省環境衛生局食品衛生課長通知：弁当及びそうざいの衛生規範について，昭和54年6月29日，環食第161号(1979)
- 14) 上原さとみら：市販生鮮青果物の衛生細菌学的調査成績(1999年~2010年)，東京都健安研セ年報, 62, 151-156 (2011)
- 15) 森 哲也ら：市販の生食用カット野菜，カット果実およびスプラウトの微生物汚染調査，日本食品微生物学会雑誌, 27 (3), 163-170 (2010)
- 16) 食品安全委員会微生物・ウイルス合同専門調査会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル~非加熱喫食調理済み食品(Ready-to-eat食品)におけるリステリア・モノサイトゲネス~(改訂版) 2012年1月，食品安全委員会ホームページ(http://www.fsc.go.jp/sonota/risk_profile/listeriamonocytogenes.pdf) (2012)

大分県における急性呼吸器感染症からのウイルス検出状況 (2012~2013年)

加藤 聖紀 本田 颯子 田中 幸代*1 小河 正雄*2、緒方 喜久代

Isolation of Viruses from the Acute Respiratory Infections in Oita Prefecture, 2012-2013

Miki Kato, Akiko Honda, Sachiyo Tanaka, Masao Ogawa, Kikuyo Ogata

Key Words : 急性呼吸器感染症 acute respiratory infections, ウイルス virus, マルチプレックスPCR法 MultiplexPCR assays

要 旨

2012年1月から2013年12月に感染症発生動向調査事業で採取された検体のうち、急性呼吸器感染症と診断された272検体について、呼吸器系ウイルスの検索を行った。その結果、134検体 (49.3%) から144件のウイルスを検出した。そのうちウイルス分離は28検体 (20.9%) であった。

呼吸器疾患の原因ウイルスの検索には遺伝子検査が有用であり、マルチプレックスPCR法によりスクリーニングすることで迅速かつ特異的にウイルスを検出することが可能である。

はじめに

急性呼吸器感染症の原因の約80%はウイルスである¹⁾。病院や施設等でインフルエンザのみならず急性呼吸器感染症の集団発生が起こった場合、病原体の特定が急がれる。呼吸器系ウイルスの効率的な検査法を導入することで検出率が向上することにより、各関係機関に迅速に検査結果を還元することが可能となり、診療の一助となるとともに感染拡大の防止につながる。また、大分県における急性呼吸器感染症の原因ウイルスの動向を把握することにより、流行の早期探知が可能となり、対策を講じるの一助となる。

材料及び方法

大分県内の医療機関より感染症発生動向調査事業として2012年及び2013年に採取された929検体のうち、急性呼吸器感染症と診断された咽頭及び鼻腔ぬぐい液及び糞便272検体を対象とした。

ウイルス分離にはHEp-2、RD-18s、Caco-2、MARC 145、Vero9013、VeroE6、LLC-MK2、MDCKの8種の細胞を使用し、細胞変性効果を指標に3代まで継代培養を行った。

また臨床検体から直接にPCR法によるウイルス遺

伝子の検索を行った。検体を前処理後、QIAamp Viral RNA Mini Kitを用いてRNAを抽出し、PrimeScriptRT reagent Kit with gDNAEraserを用いて得られたc-DNAをテンプレートとしてRNAウイルスの検索を行った²⁾。呼吸器系ウイルス12種類についてはPujolらのマルチプレックスRT-PCR法³⁾を実施した。またQIAamp Viral DNA Mini Kitを用いてDNAを抽出し、ヘルペスウイルス属⁴⁾、ヒトボカウイルス、アデノウイルス及び肺炎マイコプラズマの検索を行った。

検索対象ウイルスは表1のとおりである。分離ウイルスの同定はアデノウイルス及びエンテロウイルス属については中和試験を行い、中和試験が困難な分離株及び臨床検体から遺伝子を検出したウイルス

表1 検査対象ウイルス一覧

ウイルス名	産物のサイズ	備 考
Respiratory syncytial virus(RSV)	279	
Influenza virus A	212	multiplex set1
Influenza virus B	362	
Human metapneumovirus	416	
Parainfluenza virus1	317	multiplex set2
Parainfluenza virus2	507	
Parainfluenza virus3	189	
Parainfluenza virus4	451	
Rhinovirus	549	
Human coronavirusOC43	573	multiplex set3
Human coronavirus229E	335	
Influenza virus C	485	
Adenovirus	554	multiplex set4
Human bocavirus	354	
Mycoplasma pneumoniae	782	
Enterovirus属	650	VP0
Parechovirus	194	5' NTR検出用
Human herpes virus属	215~315	検出用

*1福祉保健部薬務室, *2別府大学

については、ダイレクトシークエンス法で遺伝子配列を決定した後、BLASTにて相同性検索を行った。

結 果

2012年及び2013年に採取された急性呼吸器感染症の検体272検体のうち134検体（検出率49.3%）から144件（1検体につき複数検出したものを含む）のウイルスを検出した。最も多く検出されたのはライノ

ウイルスで31件（21.5%）、次いでRSウイルス21件（14.6%）、パラインフルエンザウイルス17件（11.8%）、HHV-6 14件（9.7%）、アデノウイルス11件（7.6%）などであった（表2）。

呼吸器系ウイルス12種の他に4セットとしてDNAウイルス2種及び肺炎マイコプラズマのマルチプレックスPCRも呼吸器系ウイルスと同様のPCR条件で検出可能であるとわかった。

表2 月別ウイルス検出数

2012年

ウイルス名	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Rhinovirus		1		1		3			2	1	3	1	12
Respiratory syncytial virus(RSV)	1	1	2					1	1	2		1	9
Parainfluenza virus1				1									1
Parainfluenza virus2		2											2
Parainfluenza virus3	1						1						2
Parainfluenza virus4	1												1
CoxsackievirusA2			1			1	1	1					4
CoxsackievirusA6						1						1	2
CoxsackievirusA9								2					2
CoxsackievirusB4							1						1
Adenovirus5					1								1
Human herpes virus1(HSV)												1	1
Human herpes virus6(HHV-6)						1	2						3
Mycoplasma pneumoniae											1		1
月計	3	4	3	2	1	6	5	4	3	3	4	4	42

2013年

ウイルス名	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
Rhinovirus	1		1	1	3		1	3	2	1	6		19
Respiratory syncytial virus(RSV)		2	4	1			1	1	1	2			12
Human metapneumovirus		1	3	2			1						7
Influenza virus A H3N unknown			1										1
Parainfluenza virus1		1	1							1			3
Parainfluenza virus3					1	4	1						6
Parainfluenza virus4									1	1			2
CoxsackievirusA6							2						2
CoxsackievirusA8										1			1
CoxsackievirusA9						1							1
CoxsackievirusB3				1									1
CoxsackievirusB4							1						1
Echovirus6							1	1					2
Echovirus11									1				1
Echovirus25												1	1
Echovirus30							2	3					5
Enterovirus68							2		1				3
Parechovirus1							1				1		2
Adenovirus1						1							1
Adenovirus2				1						1			2
Adenovirus3							1		2	1	1	1	6
Adenovirus5								1					1
Human herpes virus1(HSV)										1			1
Epstein-Barr virus(EBV)	1												1
Human herpes virus5(CMV)					1					2	2		5
Human herpes virus6(HHV-6)				1	2	3	2		1	1	1		11
Human herpes virus7(HHV-7)		1											1
Human bocavirus		1		1	1								3
月計	2	6	10	8	8	9	16	9	9	12	11	2	102

考 察

呼吸器系ウイルスにはある程度の季節性が認められ、ライノウイルスは秋から冬にかけて流行し、RSウイルスは冬から春先と秋からの流行に伴って多く検出された。2013年、アデノウイルスは咽頭結膜熱の秋から冬の流行に伴い、上気道炎で同じ時期に多く検出された。エンテロウイルス属は夏に多く検出され、特に2013年はエコーウイルスの流行が見られた。

呼吸器系ウイルスの検索には、ウイルス分離と遺伝子検査を併用することで検出率を向上させることができる。さらに、マルチプレックスRT-PCR法を用いることで同時に多くの種類のウイルスのスクリーニング検査をすることができ、迅速かつ特異的な検査診断結果が得られるようになった。しかし、今回ヘルペスウイルス属のように、持続潜伏感染するウイルスも検出されていることより、検出されたウイルスが急性呼吸器感染症の原因と断定するには注意を要する場合もあり、総合的に判断する必要がある

あると考える。

近年呼吸器ウイルスの集団発生ではインフルエンザ以外は起こっていないが、この手法を用いて今後も引き続き検査を進めていくとともに、集団発生が起こった場合は迅速な検査結果を提供することで感染拡大防止に貢献したい。

参 考 文 献

- 1) 木村博一他：急性呼吸器ウイルス感染症の検査診断法概要 IASR 29 277-278 (2008)
- 2) 病原体診断マニュアル（地方衛生研究所全国協議会・国立感染症研究所編）
- 3) S Bellau-Pujol他：Development of three multiplexRT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses journal of Virological Methods 126 53-63 (2005)
- 4) Donard R: Detection and Analysis of Diverse Herpesviral Species by Consensus Primer PCR journal of Clinical Microbiology 1666-1671(1996)