

輸入野菜に付着する病原体について

廣 谷 博 史 (愛媛大学農学部教授)

1. はじめに

衛生という観点では先進国であったはずのわが国で、食中毒が近年多発し被害が大規模化する傾向にある。他方、市場経済の世界的な発展および科学技術の進歩の結果、多種多様の食品等が大量に生産され世界的に流通するようになった。輸入野菜は一般に発展途上国から輸入されることが多く、発展途上国では灌漑や収穫後の農作物を洗浄する水の水質が劣悪であることがある。そのような場合、野菜に付着した病原体が野菜とともに輸入されることが懸念される。これまでに、野菜や果樹を通じた病原体の伝播や市販野菜に病原体が検出される例が報告されている¹⁻⁹⁾。

今後、諸外国から輸入される食品について、その安全性をどのように確保していくかが大きな課題となる。しかし、食糧供給の6割弱(カロリーベース)を輸入に頼るわが国では、国際基準を無視した独自規制を実施することは困難である。ここでは、科学的な観点から健康影響について配慮された国際基準の作成に貢献することが国際社会の中で求められている。

そこで本研究は、生食されることが多い野菜や果実に関して、病原体が付着したものが輸入される可能性について論じ、また国際基準作成の基礎データとなるべく糞便汚染を検出する指標についても病原体との関係を検討することを目的とする。

2. 材料と方法

2.1 野菜表面からの微生物の溶出

スーパーマーケットで市販されている野菜表面に付着している糞便汚染指標微生物を調べた。愛媛県松山市内で市販されていた生および冷凍の輸入及び国産野菜を購入し、試料として用いた。供試野菜可食部の一部を0.1%肉汁100mlとともにポリエチレン製袋に入れ、5分間水平に振とうし、野菜表面から微生物を溶出させた。

2.2 野菜表面に付着した指標微生物

野菜表面から溶出した微生物数は次の方法で測定した¹⁰⁾。大腸菌群はmEndo (Difco, Detroit, MI) 培地上で35°C24時間培養後に生じた金属光沢コロニーを計数した。糞便性大腸菌群はmFC broth base (Difco) にロゾール酸を添加した培地で44.5±0.2°Cで24時間培養後に生じた青色コロニーを計数した。糞便性連鎖球菌はmEnterococcus 培地 (Tryptose 20g/l, yeast extract 5 g/l, glucose 2 g/l, K₂HPO₄ 4 g/l, Na₂SO₄ 0.4 g/l, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride 0.1 g/l, agar 10 g/l) で35°C48時間培養後に生じた桃色あるいは濃赤色コロニーを計数した。腸球菌は溶出液をメンブランフィルターでろ過し、mE 培地 (peptone 10g/l, NaCl 15g/l, yeast extract 30g/l, esculin 1 g/l, cycloheximide 0.05g/l, Na₂SO₄ 0.15g/l, agar 15g/l) 上で41°C ± 0.5°C 48時間培養後、メンブランフィルターをEIA substrate (esculin 1 g/l, ferric citrate 0.5 g/l, agar 15g/l) に移し、赤色コロニーの下部が赤茶に染まったものを計数した。大腸菌ファージは宿主に *Escherichia coli* 15597を用いて重層寒天法¹¹⁾で生じたブラックを計数した。

2.3 野菜表面での微生物の消長

野菜試料に病原原虫、バクテリオファージ、指標細菌を付着させ、それらの消長を調べた。

不活化した *Cryptosporidium* 属オーストおよび *Giardia* 属シストがトリス緩衝液 (pH 7.4) 中でそれぞれ 10^3 個/ml となるように原虫懸濁液を調製した。原虫懸濁液にニンジンおよびピーマンを浸し、暗所に放置して 0, 2, 4, 6 日後のオーストならびにシストの数を間接蛍光抗体法¹²⁾で測定した。オーストおよびシストを含む溶出液をろ過器 (Hofer FH 225V) 上にセットしたセルロースアセテート製メンブランフィルター (孔径 0.2 μ m, 直径 25mm, Advantec) でろ過し、フィルター面に Hydrofluor Combo Kit (Ensys) の一次抗体をのせ 25 分間室温で反応させた。本検査キットは *Cryptosporidium* 属と *Giardia* 属を同時に測定することができるキットである。反応後リン酸緩衝液で一次抗体を洗浄し、FITC により標識された二次抗体と室温 25 分間暗所で反応させ、リン酸緩衝液で洗浄した。メンブランフィルターに 10, 20, 40, 80, 90.2% のエタノール (5% glycerol 含有) を順次 1 ml ずつ通して脱水処理をした。スライドグラスに DABCO-glycerol 封入剤をのせた上に抗体染色したフィルターを置き、37°C 30 分加温しフィルターを透明化させた。このように作成したフィルター全面を落射蛍光顕微鏡 (B 励起) で検鏡し、青リング色の蛍光を発する直径 3~7 μ m の円形のを *Cryptosporidium* 属オースト、長径 8~18 μ m かつ短径 5~15 μ m の楕円形のを *Giardia* 属シストと推定して計数した。

バクテリオファージ MS 2 がトリス緩衝液 (pH 7.4) 中で 10^6 PFU/ml となるように調製したファージ液にニンジンおよびピーマンを浸し、暗所に放置して 0, 2, 4, 6 日後に表面に生残しているバクテリオファージ MS 2 を宿主に *E. coli* 15597

を用いた重層寒天法で調べた。

E. coli または *Enterococcus faecalis* がそれぞれ 10^8 cfu/ml となるように調製した細菌懸濁液にニンジンおよびピーマンを浸し、暗所に放置して 0, 2, 4, 6 日後の細菌数をそれぞれ mENDO 培地で 35°C 24 時間培養または mEnterococcus 培地で 35°C 48 時間培養を行い、生じたコロニーを計数した。

2.4 原虫オーストの洗浄除去

不活化した *Cryptosporidium* 属オーストがトリス緩衝液 (pH 7.4) 中で 10^3 個/ml となるように原虫懸濁液を調製した。原虫懸濁液にニンジンおよびピーマンを浸し、風乾後に、蒸留水 500 ml リンスによる洗浄操作を 3 回行った。その後 0.1% 肉汁 100 ml とともにポリエチレン製袋に入れて 5 分間水平に浸透した。各々の洗浄と肉汁中のオースト数を間接蛍光抗体法で測定した。

3. 結果と考察

3.1 野菜表面の微生物

スーパーマーケットなどで市販されている生または冷凍の野菜や果実表面に付着している糞便汚染指標微生物を調べた (図 1)。供試した 24 試料のうちのほとんどにいずれかの糞便汚染指標が検出された。いずれも検出されなかったものは、米国産イチゴ 2 種類とタイ産インゲンマメだけであった。

このグラフでは細菌が検出されなかったものについても、検出限界値をプロットした。検出限界値はおおむね、マイナス値となった。とくに無菌の取り扱いをされることなく扱われてきた以上、ある程度の指標細菌が検出されたとしても問題はない。検出の有無よりも著しく多い量が検出された試料に注目すべきである。

本データは試料の新鮮重あたりの指標細菌数として表示したため、異なる種類の野菜の数値を比

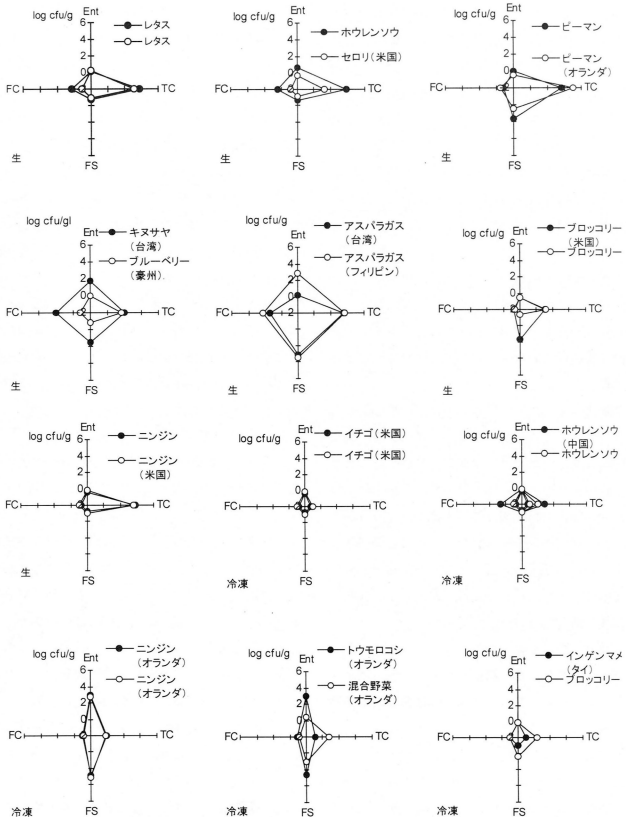


図1 市販の野菜と果実の表面に付着している糞便汚染指標微生物

かつこ内は生産国表示をそのまま記載した。生産国の無いものは国内産である。FC, 糞便性大腸菌群; TC, 大腸菌群; Ent, 腸球菌; FS, 糞便性連鎖球菌

較することによって汚染の大小を比較することはできないが、それぞれの種類について指標の検出パターンの違いが本図に現れている。野菜の種類ごとに同じようなグラフ形を示すことが多かった。例えば、レタスは同じような指標細菌検出パターンを示した。さらに、ピーマン、ニンジン、アスパラガス、冷凍ホウレンソウがそうであるように、同じ種類の野菜であれば生産国にかかわらず似かよった指標細菌検出パターンを示した。購入元(店)、購入日、冷凍の場合は購入したブランドはランダムである。

大腸菌群は生試料の全てと冷凍試料の一部に検出された。しかし、大腸菌群が検出された場合でも糞便大腸菌群が検出されないことも多く、大腸菌群は糞便汚染の指標としては適格性を欠くと考えられた。

図1に示したグラフの多くでは、x軸を中心に上下対称となることが多かった。すなわち、糞便性連鎖球菌と腸球菌は、同程度に検出されるかともに検出されないというパターンが多かった。糞便性連鎖球菌と腸球菌の種組成は重なる部分が多く、また糞便性連鎖球菌にだけ含まれて腸球菌に含まれない *Streptococcus bovis*, *S. equinus* は環境中で生残しにくい¹³⁾ため、これらはほぼ同じ細菌種を測定していたと考えられる。

冷凍のオランダ産ニンジンおよびトウモロコシには大腸菌群と比べ球菌指標が著しく多く検出された。キヌサヤ、アスパラガスには全ての糞便指標が多く検出された。

水浴場の水質基準の糞便性大腸菌群に関する「適」の上限は1000cfu/100mlである。また、水浴中にヒトは10~50mlの水を直接飲用すると考えられる¹⁴⁾。水浴場の水質基準は必ずしも病原体の水系感染リスクから算出されたものではないが、現状では最大100~500cfuの糞便性大腸菌群が容認されていることになる。十分な洗浄がな

れていない野菜や果実を生食するということは、水浴と比べてもかなり多い糞便汚染が口に入ることを意味する。

野菜や果実表面に付着した汚染指標細菌の検出パターンを見ると、輸入されたものであるか国内産であるかという違いよりも、野菜または果実の種類による違いが大きいくことが明らかとなった。すなわち、ここで検出されている指標微生物はバックグラウンドの微生物として常在しているものかもしれない。生と冷凍を比較すると、冷凍のほうが洗浄され包装されているため糞便汚染指標の検出数は少なかった。しかし、オランダ産の冷凍野菜のように球菌が突出して多い場合もあった。この原因は不明である。以上から、輸入野菜に対して糞便汚染の基準を設けることは可能であるが、その場合に基準値は野菜ごとに検討を行う必要があると考えられた。

3.2 野菜表面の微生物の消長

従来あまり問題となることがなかった原虫による野菜や果実の汚染が近年報告されている¹⁻³⁾。発展途上国で生産され、収穫後環境水で土やゴミを落とすために洗浄された野菜が、病原性原虫を付着したまま輸入されてしまうことが懸念される。病原性原虫は糞便由来と考えられるため、従来の糞便指標と病原性原虫の生残性の違いを明らかにしておく必要がある。ここでは、原虫シストならびにオーシストの野菜表面での消長をバクテリオファージおよび細菌のそれと比較した(図2)。

原虫のオーシストおよびシストを野菜表面に接種しても、検出数にきわだった変化はなかった。ニンジンにおいてはやや増加が認められたが、オーシストおよびシストが野菜表面で増加することはありません。実験処理上の問題と考えられる。オーシストおよびシストは乾燥などにも強く、野菜表面上でも長期間存続し続けることが確認された。本実験ではたんにオーシストまたはシストの数の

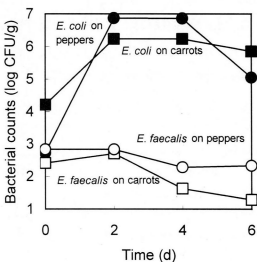
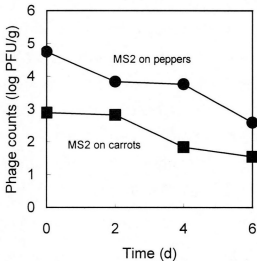
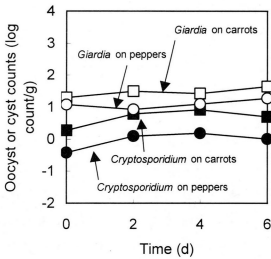


図2 野菜表面に接種した微生物の消長

みを問題としていたため、生残しているかについては未検討である。今後脱糞試験等を行いその生残性について検討すべきであろう。

バクテリオファージは、実験期間中にニンジンでは1.3log、ピーマンでは2.1logの減少が認められた。本実験で用いたMS2ファージは小型のRNAファージである¹⁵⁾。F特異大腸菌ファージは濃度が低く野菜表面での消長を調べることはできなかった。原虫または後述する細菌病原体に比べウイルスが野菜を通じて伝播される可能性は低いと考えられる。また、バクテリオファージは糞便汚染の指標としては野菜表面で減少してしまうため適切でないことが明らかとなった。

E. coli は両野菜表面上で顕著な増殖が認められた。増殖量はニンジンとピーマンとは大きく異なっていた。前節の結果によれば、ニンジンもピーマンも大腸菌群が多く付着しており、それらが本実験結果に含まれて検出されていると考えられるが、増殖した区分は新たに付着させたもの由来であると考えられる。すなわち、糞便汚染指標として大腸菌群を採用した場合には、汚染後増殖の可能性があり、糞便汚染が過大評価されてしまう懸念がある。

さらに、本実験結果より、大腸菌にとっても野菜表面は増殖に適した環境となりうることが分かった。アルファルファでは発芽直後に *E. coli* を接種すると増殖が認められるものの、発芽24時間後には他の微生物が表面に定着するために接種した *E. coli* の増殖が抑制されると報告されている¹⁶⁾。しかし、本研究では野菜表面の微生物が接種した *E. coli* の増殖を抑制するという現象は認められなかった。

E. faecalis は野菜表面での増殖が認められなかった。むしろ、実験期間内でやや減少した。指標が減少すると汚染を過小評価してしまうことになるが、*E. faecalis* の減少量は6日間でおおむ

ね1 log 程度以内であったので、糞便汚染を検出するための指標として使用することができる可能性があると考えられた。

3.3 野菜の洗浄回数と付着オーシスト数

原虫は野菜表面に付着し、存在し続けることが明らかとなった。しかし、野菜は洗浄されてから食用されるのがふつうである。そこで、野菜の洗浄回数と付着したオーシスト数の関係を調べた(図3)。

両野菜とも洗浄回数にともなって付着しているオーシスト数は減少した。しかし、減少の度合いは野菜ごとに異なった。ニンジンにおいては3回目の洗浄後の減少量は0.3 log 程度であり、リンスだけでは効果的な洗浄が行われたとは言えないことがわかった。ピーマンにおいては1度目の洗浄操作で0.5 log 減少し、以降洗浄操作ごとに漸減した。細菌は洗浄操作で1~2 log 減少すると報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。また、細菌の洗浄操作では塩素の添加により効果を高めることができる。原虫オーシストは塩素に対する耐性が高く、また本結果から洗浄の効果があがりにくい。

衛生状態が悪く、灌漑や洗浄に汚染された水を用いている可能性がある国や地域から輸入された野菜や果実を扱う際には、原虫対策としてより念入りの洗浄操作が必要であると考えられた。

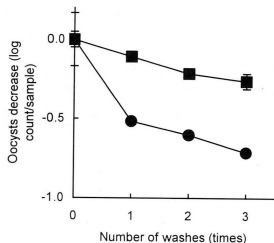


図3 洗浄によるオーシスト数の減少
(■ニンジン；●ピーマン)

とりわけ家庭においても汚染された可能性のある野菜を扱ったあとは、調理器具や他の食材にふれる前に手をよく洗浄し、病原体の拡散を防止する習慣の普及が必要となってくるであろう。

ま と め

食糧の多くの部分を輸入に頼るわが国では、灌漑や収穫後の農作物を洗浄する水の水質が劣悪である国や地域から、病原体が付着したままの野菜が輸入されることが懸念される。野菜や果実表面に付着した汚染指標細菌の検出パターンを見ると、生産国による違いよりも、むしろ野菜または果実の種類による違いが大きいことが明らかとなった。糞便汚染指標となる微生物の中では糞便性連鎖球菌が増殖することもなく、汚染指標として使用できる可能性があることが分かった。原虫のオーシストやシストは野菜表面に付着して存在できることが明らかとなった。オーシストは洗浄によって除去できるものの、細菌除去を目的とする場合に比べより念入りの洗浄が必要であることが明らかとなった。

謝 辞

本研究に対し多大のご助成を下さいました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。また、ご協力いただきました逸見武史氏、越野裕美氏、請田奈津江氏に感謝します。

参考文献

- 1) Millard P. S., Gensheimer K. F., Addiss F. G., Sosin D. M., Beckett G. A., Houck-Jankoski A., and Hudson A. (1994) JAMA, 272, 1592-1596.
- 2) Monge R. and Arias M. L. (1996) Archivos Latino Americanos de Nutricion 46, 292-294.
- 3) Ortega Y. R., Roxas C. R., Gilman R. H., Miller N. J., Cabrera L., Taquiri C., and Sterling C. R. (1997) Am. J. Trop. Med. Hyg. 57, 683-686.
- 4) Bagdasargan G. A. (1964) J. Hyg. Epidemiol. Mi-

- crobiol. Immunol., 8, 497-505.
- 5) Bryan F. L. (1977) J. Food Prot., 40, 45-56.
- 6) Hernandez F., Monge R., Jimenez C., and Taylor L. (1997) Int. J. Food Microbiol. 37, 221-223.
- 7) Niu M. T., Polish L. B., Robertson B. H., Khonna B. K., Woodruff B. A., Shapiro C. N., Miller M. A., Smith J. D., Gedrose J. K., Alter M. J., and Margolis H. S. (1992) J. Infect. Dis., 166, 518-524.
- 8) Reid T.M.S. and Robinson H.G. (1987) Epidemiol. Infect., 98, 109-112.
- 9) Rosenblum L. S., Mirkin I. R., Allen D. T., Safford S., and Hadler S. C. (1990) Am. J. Pub. Health, 80, 1075-1079.
- 10) American Public Health Association. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed., Washington DC, American Public Health Association.
- 11) Adams M. H. (1959) Bacteriophages, New York, Interscience Publishers, 592 p.
- 12) Schaefer F. W. III. (1997) Manual of Environmental Microbiology, Washington DC, ASM Press, 153-167.
- 13) Feacham R. (1975) Water Res., 9, 689-690.
- 14) Shuval H. I. (1976) Virus in Water, Washington DC, American Public Health Association.
- 15) Kott Y., Roze N., Sperber S., and Betzer N. (1974) Water Res. 8, 165-171.
- 16) Castro-Rosas J. and Escartin E. F. (2000) J. Food Sci., 65, 162-165.
- 17) Abdelnoor A. M., Batshoun R. and Roumani B. M. (1983) Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B., 177, 342-349.
- 18) Adams M. R., Hartley A. D., and Cox L. J. (1989) Food Microbiol., 6, 69-77.

Importation of Fresh and Frozen Vegetables and Fruits Adhering Pathogens

Hiroshi Hirotani (Faculty of Agriculture, Ehime University)

Importation of Fresh and Frozen Vegetables and Fruits Adhering Pathogens Presence of indicator microorganisms of fecal pollution on the surface of imported and domestic vegetables sold in retail markets is demonstrated. Differences of indicator levels between vegetables and fruits were greater than those between countries those were produced. Densities of inoculated *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts remained stable at room temperature up to six days, while bacteriophage MS2 level indicated a gradual decrease and inoculated *Escherichia coli* indicated a vast growth. *Streptococcus faecalis* inoculated on vegetable surface indicated a slight decrease, but fecal streptococcus was most likely to serve as fecal indicator for imported vegetables and fruits. Effectiveness of surface washing to remove *Cryptosporidium* oocysts was also investigated. Only 0.3 log unit reduction for carrots and 0.5 log unit reduction for peppers were observed after three sets of washes. More effective washing method was required to reduce *Cryptosporidium* oocysts compared to removing bacterial cells.