

<平成 21 年度助成>

輸入食材中からの病原体、特に寄生虫卵や原虫のシストの 検出の試み及び疫学的調査

大 西 義 博

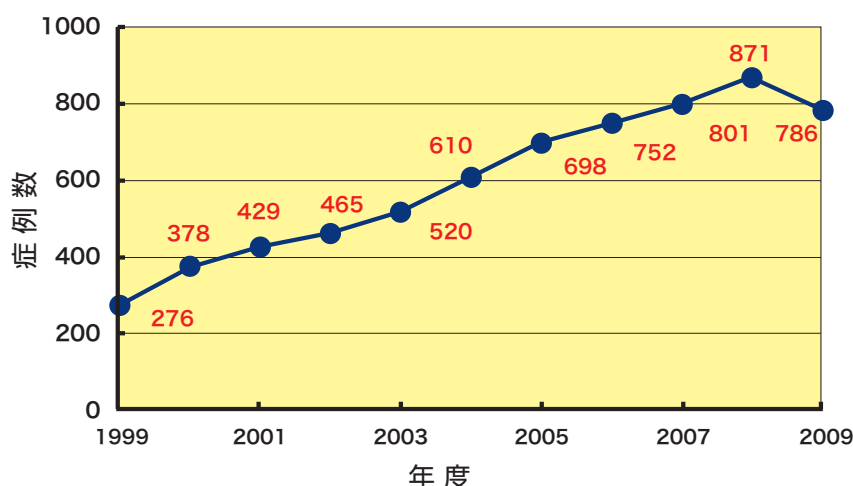
(大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科獣医学専攻)

1. はじめに

平成22年度において、我が国の総合食料自給率は生産額ベースでは69%を保持しているものの、カロリーベースでは40%を下回っており、食材の多くを輸入に頼っている¹⁾。品目別に見ると、野菜類でも自給率は生産額ベースで81%、カロリーベースで77%であり、残りを輸入に頼っている²⁾。この様な中で、輸入食品は食品衛生法に基づいて空港や港の検疫所で検疫されており、輸入手続きにおいてはモニタリング検査制度として行われている³⁾。しかしながら、検疫所でのモニタリング検査は野菜などの農産食品において抗菌性物質等、残留農薬、添加物、成分規格等、カビ毒及び遺伝子組み換え食品に限られ、しかも全体の10%ほどしか検査が行われず、病原体の検査はほとんど行われていない⁴⁾。

一方、アメーバ赤痢は「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、感染

症新法と略す)で五類感染症に指定されており、ヒトの症例は保健所への届出の義務がある。最近の報告では本症は年々増加傾向にあり、2008年度では871症例もの報告があり、2009年度でも786症例と多かった(図1)⁵⁾。これらの多くの症例はAIDS患者や男性同性愛者間での感染および発展途上国への渡航による感染であると報告されている。しかし、届出された症例の中には、感染源の不明な国内感染例も多く含まれている。この不明な症例の感染源の一つとして、毎日輸入される食材の中に赤痢アメーバ原虫のシストで汚染したものがあ、これらによって感染したものがあるのではないかと考えられた。現に、1994年には輸入キムチが原因と考えられる有鉤囊虫症の発生もあった⁶⁾。また、2005年には中国産や韓国産のキムチが回虫卵で汚染しているかの新聞報道もあり、厚生労働省も輸入キムチについて再検査を行った⁷⁾。この時、我々の研究室にも唐辛子などに付着した回虫卵を殺滅する処理法についての



<http://idsc.nih.go.jp/idwr/ydata/report-Ja.html> より作図

図1 アメーバ赤痢患者の届出数の年次変化⁵⁾

問い合わせもあった。

このようなことから、今回、スーパーなどで売られている輸入食材、特に生食する輸入野菜類への赤痢アメーバ原虫のシストや寄生虫卵の付着の有無を疫学的に調査することを目的とした。さらに、赤痢アメーバ原虫のシストが検出された場合は、問題提起し、感染予防などの啓発を行いたいと考えた。

2. 材料と方法

2.1 検体の輸入野菜

平成 21 年 11 月から平成 23 年 3 月までに、スーパーなどで外国産の表示のある輸入野菜 533 品目（重複有り）を購入した。購入した輸入野菜の品目数の内訳を表 1 に示す。購入品目として最も多かったものは“もやし”であるが、これは原料の豆が輸入され国内で発芽させたもので、安価であったので多くを購入した。その他、輸入野菜で多かったものはアスパラガスや根菜類などで、店頭で長く保存できるものであった。これらは洗滌されずに土壌が付着したままで販売されていた。

輸入野菜の輸入国の内訳では、中国産が 241 品

目、次いでアメリカ産が 91 品目と多く、さらにタイ産やミャンマー産を多く購入した。その他は表 2 の通りであった。購入した輸入野菜で中国産が多かったのも安価な“もやし”を多く購入したためである。また、サラダは原材料が複数国から輸入され、国内で細切された後に混ぜて販売されていたものもあった。

2.2 検査方法

2.2.1 輸入野菜の洗滌方法

- 1) 1 品目につき 2 パック（包装）ずつを購入し、1 パックは寄生虫学的検査に用い、もう 1 つの方は赤痢アメーバ原虫のシストを検出するために、DNA の抽出に用いた。
- 2) 1 パックごとに 0.05 % tween 液加 PBS（Phosphate buffered saline）液の 2 リットルに 30 分間、浸漬し、野菜の表面を洗滌した。
- 3) 洗滌液はガーゼ 1 枚で濾過して 3,500 回転 10 分間、遠心して沈渣を得た。
- 4) ホルマリンエーテル法（以下、MGL 法と略す）及びショ糖液遠心浮遊法では、沈渣にホルマリン液で固定後保存した。濾紙培養法では、沈渣を固定せずにそのまま使用した。また、

表 1 輸入野菜の品目数

品目名	品目数
もやし	105
アスパラガス	57
サラダ	53
ニンニクの芽	45
ネギ	37
ブロッコリー	27
セロリ	26
オクラ	23
ゴボウ	21
ショウガ	21
サトイモ	19
タマネギ	17
キムチ	11
その他	71
合計	533

その他（10 品目以下）：ネギカット、ニンジン、枝豆、三度豆、水、ニンニク、落花生、キヌサヤ、シイタケ、インゲン豆、エンドウ豆、シシトウ、干し芋、アーモンドダイズ、カボチャ、クワイイモ、パプリカを含む

表 2 輸入国別の輸入野菜の品目数

輸入国	品目数
中国	241
アメリカ	93 (5) ^{a)}
タイ	79
ミャンマー	37
韓国	22
フィリピン	10
オーストラリア	8
メキシコ	7
ペルー	6
ニュージーランド	6 (1)
台湾	6
フランス	5
オーストラリア	4
オランダ	2 (1)
ベトナム	1
その他 ^{b)}	13
合計	540 (7)

^{a)} () 内の数は他の輸入国との重複を含む

^{b)} 不明及び我が国の 3 品目を含む

polymerase chain reaction (以下、PCRと略す)を用いた赤痢アメーバ原虫の検査用としては、沈渣を固定せずに冷凍保存後にDNAの抽出に用いた。

2.2.2 寄生虫学的検査法⁸⁾

1) MGL法

定法通りの方法で行った。沈渣をヨード・ヨードカリウム液で染色して赤痢アメーバ原虫のシストの検出を試みた。

2) ショ糖液遠心浮遊法

輸入野菜の多くは土壌等でかなり汚れていたため、ホルマリン液固定後にショ糖液遠心浮遊法を用いて集シストを行った。ホルマリン液固定済みの検体をPBS液で2mlに調製後、この液の下部にショ糖液(比重 1.200)を注加し、2,500rpmで5分間、遠心し、ショ糖液層とホルマリン液層との境界部を回収した。回収した液は10倍量のPBS液で遠心洗滌し、沈渣を得て、赤痢アメーバ原虫の検出に用いた。

3) 濾紙培養法

MGL法で線虫の虫体を検出したので、一部の検体では糞線虫の有無を確認するために濾紙培養を行った。

2.2.3 PCR

1) DNAの抽出方法

輸入野菜から回収した沈渣は土壌を多く含んでいるものがあったため、PCRの阻害物質除去のためにDNAの検出キットとしてQIAamp DNA Stool Kit (Qiagen 社)を用いた。手技はキットの説明書に準じて行った。ただし、キットでは検体の200 μ lを使用することになっていたが、今回の検査では輸入野菜の洗滌後の沈渣をすべて使用した。また、lysis bufferを用いて95℃での溶解後、上清をすべて回収してDNAの抽出に用いた。最後に、検体からのDNAの抽出は39.75 μ lの滅菌水にて回収し、PCRを行うまで冷凍保存した。

土壌線虫からのDNAの抽出はQIAamp DNA

Mini Kit (Qiagen 社)を用いて、キットの説明書通りに行った。

2) 検査方法

① Tachibana *et al.* (1991)⁹⁾の方法

赤痢アメーバ原虫の30-kDa cystein rich protein (peroxiredoxin) 遺伝子の531bpを増幅する primer (Eh_POR29と Eh_POR549)を表3に示した。温度条件は denaturation を 94℃ 1min、annealing を 59℃ 90 sec、elongation を 72℃ 90sec、40 cycles (originalでは 30 cycles)で行った。

② Tachibana *et al.* (1991)⁹⁾の方法

赤痢アメーバ原虫の peroxiredoxin の遺伝子の100bpを増幅する primer (P11と P12) を表3に示した。温度条件は denaturation を 94℃ 1min、annealing を 59℃ 90 sec、elongation を 72℃ 90 sec、40 cycles (originalでは 30 cycles)で行った。

③ Haque *et al.* (1998)¹⁰⁾の方法

赤痢アメーバ原虫のSSUrRNA遺伝子の約900bpを増幅する primer (1st PCR 用:E1と E2、2nd PCR 用:E3と E4) を表3に示した。温度条件は denaturation を 94℃ 30 sec、annealing を 43℃ (1st PCR) 又は 62℃ (2nd PCR) 30 sec、elongation を 72℃ 1min、35 cyclesで行った。

④ Evangelopoulos *et al.* (2000)¹¹⁾の方法

赤痢アメーバ原虫のSSUrRNA遺伝子の427bpを増幅する primer を表3に示した。温度条件は denaturation を 94℃ 30 sec、annealing を 58℃ 30sec、elongation を 72℃ 1min、40 cyclesで行った。

⑤ Dorris *et al.* (2002)¹²⁾の方法

糞線虫のSSUrRNA遺伝子の390bpを増幅する primer を表3に示した。温度条件は denaturation を 94℃ 30 sec、annealing を 55℃ 30 sec、elongation を 72℃ 30 sec、40 cyclesで行った。

3) 反応条件

輸入野菜からの検体のDNA液39.75 μ lに、TaKaRa ExTaq buffer 5 μ l、dNDP mixture 4 μ l、forward primer 0.5 μ l、reverse primer 0.5 μ l、

表 3 PCR に用いた primer の配列

	Primer 名	ターゲットの 遺伝子	Primer の 配列 (5' → 3')	増幅産物の サイズ (bp)	引用文献
①	Eh_POR29	<i>Entamoeba histolytica</i> peroxiredoxin gene	taaagcaccagcatattgtc	531	Tachibana <i>et al.</i> , 1991 ⁹⁾
	Eh_POR549		ttaattccatctggtggtgg		
②	P11	<i>E. histolytica</i> peroxiredoxin gene	ggaggagtaggaaagttgac	100	Tachibana <i>et al.</i> , 1991 ⁹⁾
	P12		ttcttgcaattcctgcttcga		
③	E1	<i>E. histolytica</i> SSUrRNA gene	tttgattagtacaaa	909	Haque <i>et al.</i> , 1998 ¹⁰⁾
	E2		gta(a/g)tattgatatact		
	E3 (EH1)		aatggccaattcattcaatg	873	
	E4 (EH2)		tttagaacaatgcttctct		
④	EhL	<i>E. histolytica</i> SSUrRNA gene	acattttgaagactttatgtaagta	427	Evangelopoulos <i>et al.</i> , 2000 ¹¹⁾
	EhR		agagaagcattgttctagatctg		
⑤	Strong_SSUAF_39	<i>Strongyloides stercoralis</i> SSUrRNA gene	aaagattaagccatgcatg	390	Dorris <i>et al.</i> , 2002 ¹²⁾
	Strong_SSU22R_428		gcctgctgccttccttgga		

TaKaRa ExTaq Hotstart version 0.25 μ l をそれぞれ加えて、上記の温度条件で反応を行った。

土壌線虫を用いた PCR では DNA 液 5 μ l に、滅菌水 34.75 μ l を加え、他の試薬類は上記と同じ量を加えて行った。

4) 結果の判定

① アガロース電気泳動

PCR 増幅産物は 3% アガロース液を用いて電気泳動を行い、解析した。

② DNA ダイレクトシーケンス

アガロース電気泳動で検出された目的のバンドは QIAamp Gel Extraction Kit (Qiagen 社) を用いてゲルから抽出し、DNA 配列を DNA ダイレクトシーケンス法により確認した。

3. 検査成績

1) 寄生虫学的検査法による検査

寄生虫学的検査法による結果を表 4、図 2-4 に示した。輸入野菜は土壌等でかなり汚れており、特に根菜類は土壌が付着したまま売られていた。このため、MGL 法では沈渣が多くて、MGL 法によるアメーバ原虫のシストの検出には限界があった。このため、ショ糖液遠心浮遊法を併用することで、検体からの沈渣を少なくし、検査を容易することができた。これらの検査法では 1～4 核のアメーバ原虫のシストが全体で 294 検体中 22 検体 (7.5%) から検出された (表 4、図 2a～e)。また、繊毛虫のシストやコクシジウムのオーシストも検出された (図 2f & g)。

表 4 輸入野菜からのアメーバ原虫のシスト及び土壌線虫などの検出状況

検査法	検査数	検出数 (%)		
		アメーバ原虫シスト ^{a)}	土壌線虫類 (虫卵, 幼虫, 成虫)	ダニ (卵, 成虫)
ホルマリンエーテル法 ^{b)}	32	5 (15.6)	3 (9.4)	1 (3.1)
ショ糖液遠心浮遊法	91	17 (18.7)	31 (34.1)	2 (2.2)
濾紙培養法	172	ND	14 (8.1)	1 (0.6)
合計	294	22 (7.5)	48 (16.3)	4 (1.4)

^{a)} 1 核から 4 核のアメーバ原虫のシストを検出した

^{b)} ホルマリンエーテル (MGL) 法

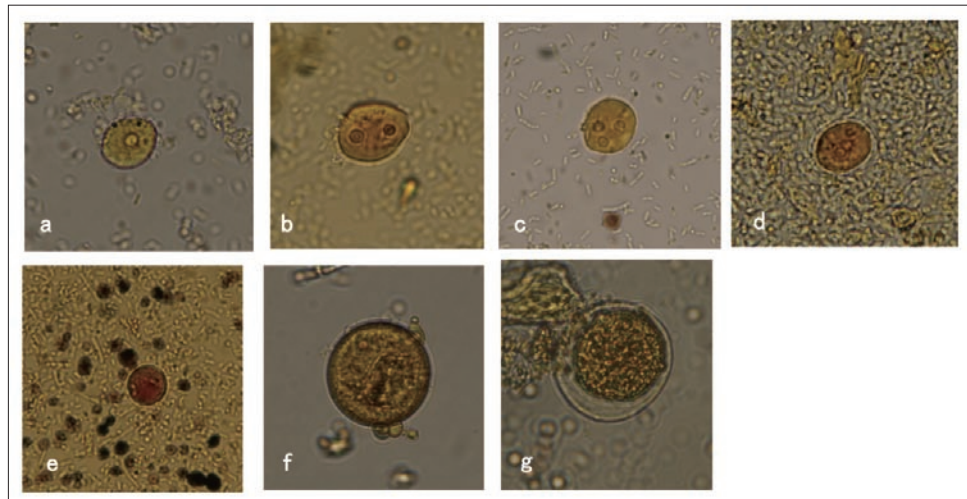


図2 検出された種々の原虫のシストやオーシスト (×40)

a～e, アメーバ原虫のシスト (a, 1核; b, 2核; c, 3核; d, 4核; e, 1核でグリコーゲン胞を持つ) f, 繊毛虫のシスト; g, コクシジウムのオーシスト

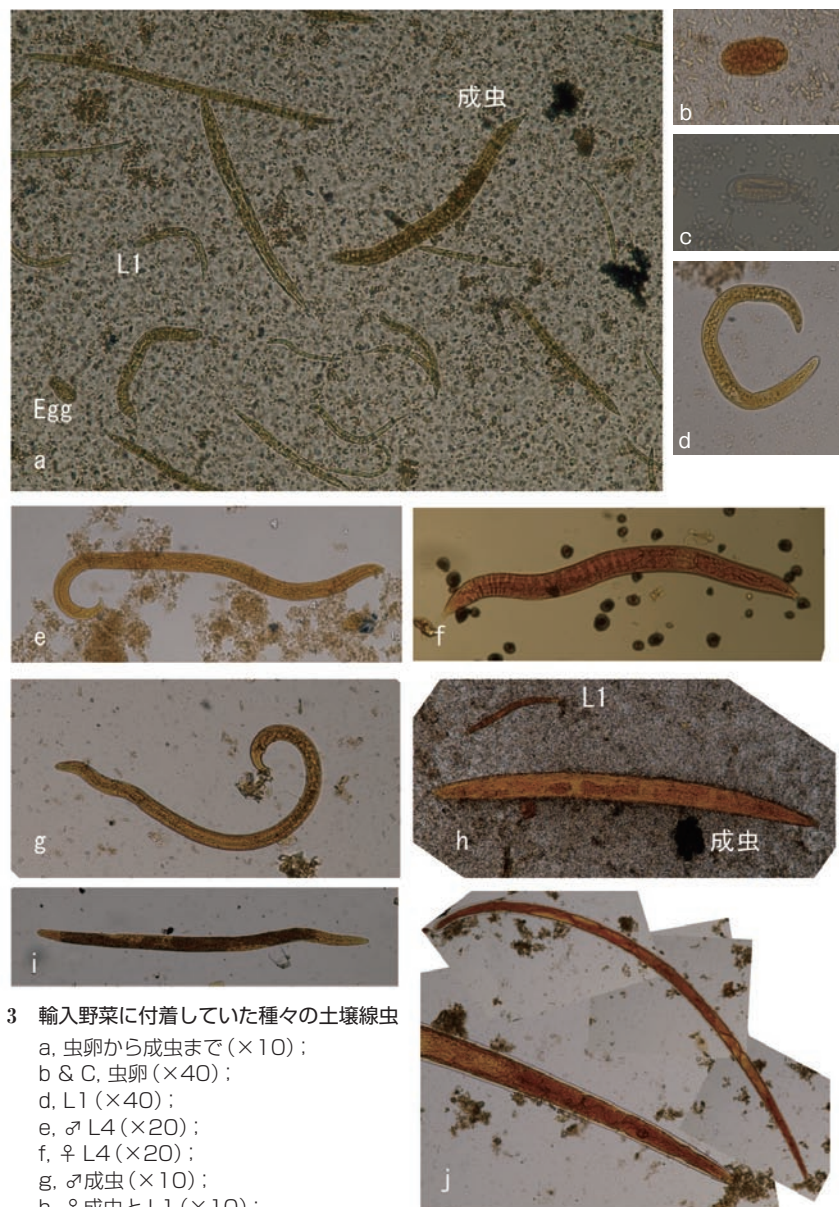


図3 輸入野菜に付着していた種々の土壌線虫

a, 虫卵から成虫まで (×10);
b & c, 虫卵 (×40);
d, L1 (×40);
e, ♂ L4 (×20);
f, ♀ L4 (×20);
g, ♂ 成虫 (×10);
h, ♀ 成虫と L1 (×10);
i, 尾端の丸い線虫 (×20);
j, 大型の線虫 (×10);

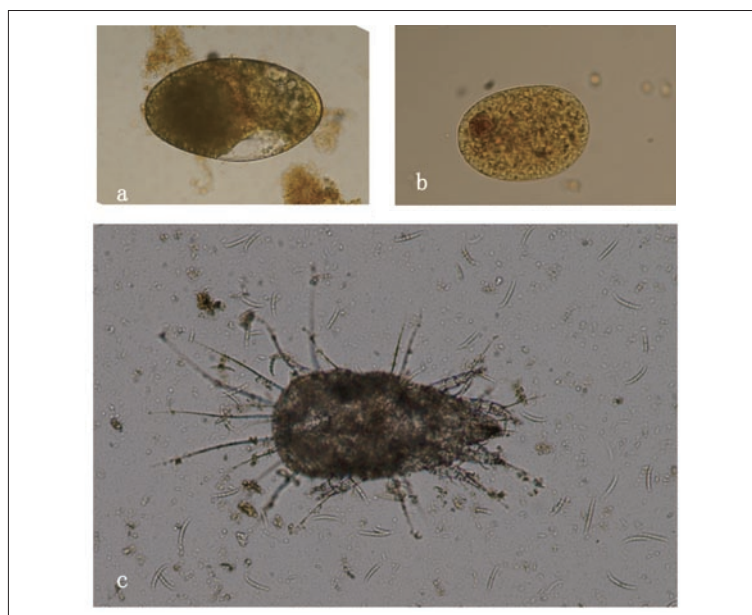


図4 検出されたダニの成虫及び虫卵
a & b, ダニの虫卵(×40); c, ダニの成虫(×20)

さらに、土壌線虫類による汚染も全体で294検体中48検体(16.3%)で認められた(表4、図3)。濾紙培養法の結果では、発育可能な土壌線虫が全体で172検体中14検体(8.1%)から検出された。

一方、コナダニと思われるダニの卵や成虫も全体で294検体中4検体(1.4%)から検出された(表4、図4)。

また、濾紙培養法で検出された土壌線虫についてPCRを行い、検出されたDNAについてDNA

ダイレクトシーケンス法でDNA配列を調べたところ、*Panagrolaimus* spp. や *Cruzema* sp. などの土壌線虫のDNAと一致した。

2) PCRによる検査結果

次に、先ず、赤痢アメーバ原虫を検出するPCRの検査法について再検討したところ、従来法はいずれも検出感度が悪かった。このため、各検査法でPCRのサイクル数を増やすことで、検出感度をやや増やすことができた(図5-7)。

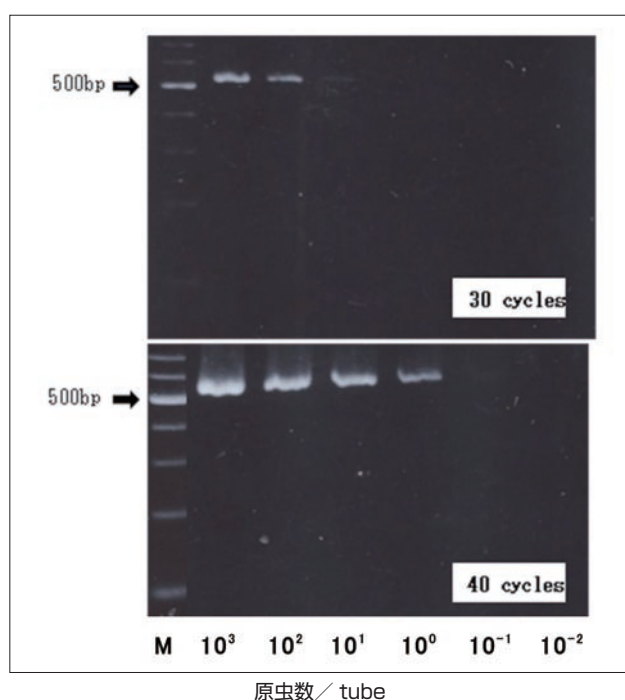


図5 PCR(検査法①)の検出感度

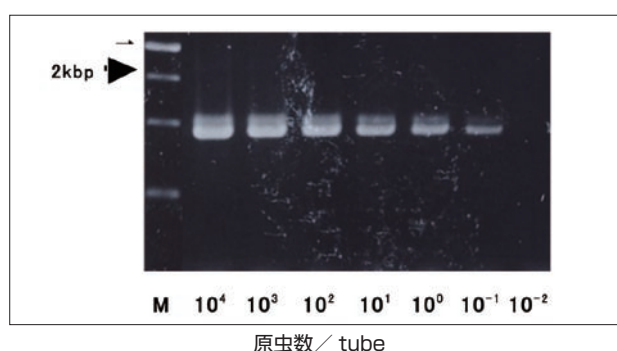


図6 PCR(検査法③)の検出感度

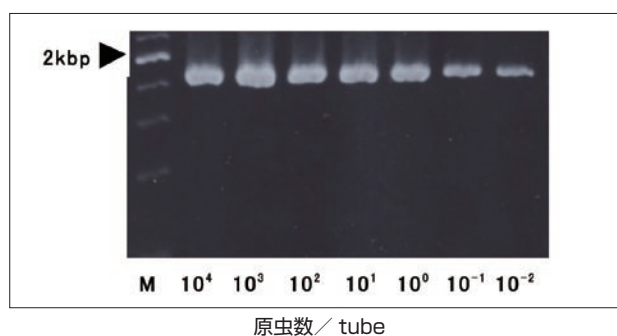


図7 PCR(検査法④)の検出感度

改良したPCRの各検査法での赤痢アメーバ原虫の検出結果を表5に示した。PCRに用いる検査法によっては検出感度に差が見られたが、赤痢アメーバ原虫のDNAが全体で499検体中38検体(7.6%)に検出された。

赤痢アメーバ原虫のDNAが検出された輸入野菜の種類を見てみると、検査数が少ないけれども

豆類の汚染が高率(33.3～66.7%)であり、中国産のニンニクの芽やネギの汚染も見られた(表6)。また、生食する野菜サラダなどへのアメーバ原虫の汚染もMGL法で高率(41.7%)に見られたが、赤痢アメーバ原虫を検出するPCRでは陽性率は2%と低率であった(表7)。

表5 PCRによる赤痢アメーバ原虫の検出率

検査法 ^{a)}	検出遺伝子	検査数	陽性数(%)
①	<i>E. histolytica</i> peroxiredoxin gene	74	0
②	<i>E. histolytica</i> peroxiredoxin gene	55	16 (29.1)
③	<i>E. histolytica</i> SSUrRNA gene	180	0
④	<i>E. histolytica</i> SSUrRNA gene	190	22 (11.6)
合 計		499	38 (7.6)

^{a)} 番号は表3のそれに対応する。

表6 PCRで赤痢アメーバ原虫が検出された輸入野菜の種類および輸入国

野菜の種類	検査数	陽性数	陽性率	輸 入 国 (陽性数)
エンドウ豆	3	2	66.7	中国 1、タイ 1
インゲン豆	2	1	50.0	オーストラリア 1
水	5	2	40.0	フランス 3
サントマメ	6	2	33.3	オーストラリア 2
シシトウ	3	1	33.3	韓国 1
キヌサヤ	4	1	25.0	中国 1
ニンニクの芽	43	8	18.6	中国 8
ネギ	38	5	13.2	中国 5
ブロッコリー	24	3	12.5	アメリカ 3
オクラ	20	2	10.0	タイ 1、フィリピン 1
アスパラガス	51	5	9.8	タイ 3、メキシコ 2
キムチ	11	1	9.1	韓国 1
セロリ	26	1	3.8	アメリカ 1
もやし	101	3	3.0	中国 3
サラダ	51	1	2.0	アメリカ + 韓国
合 計	388	38	9.8	

表7 生食する野菜サラダやカットネギなどからの赤痢アメーバ原虫などの陽性率

方 法	検査数	陽性数(陽性率, %)		
		原虫のシスト	土壌線虫類	ダニ
ホルマリンエーテル法	36	15 (41.7) ¹⁾	3 (8.3)	1 (2.8)
ショ糖液遠心浮遊法	3	0	0	0
濾紙培養法	20	ND	0	0
PCR	51	1 (2.0) ²⁾	ND	ND

¹⁾ 1核～4核の原虫のシストが検出された。

²⁾ 赤痢アメーバ原虫のDNAが検出された。

ND, not done.

4. 考 察

アメーバ赤痢は赤痢アメーバ症とも言い、赤痢アメーバ原虫 *Entamoeba histolytica* によって惹起される人獣共通感染症であり、ヒトの症例は五類感染症に指定されており保健所に報告され集計されている。この疾病は元々、土壤伝播性寄生虫病であり、感染型のシストを経口的に摂取することで感染する。シストに汚染した野菜類や水を介して伝播する。最近、我が国におけるアメーバ赤痢の発生状況を見ると AIDS 患者や男性同性愛者間での性的接触に感染によるものが多く報告されているものの、感染経路の不明の症例も数多く報告されている^{13,14)}。このようなことから、感染源の1つに汚染した輸入野菜の生食による感染が疑われた。

そこで今回、輸入野菜について赤痢アメーバ原虫のシストに付着があるのかどうかを寄生虫学的検査法とPCRにより検査したところ、寄生虫学的検査法では数種類の1核～4核を有するアメーバ原虫のシストが高率に検出された。しかし、MGL法では、赤痢アメーバ原虫のシストによる汚染があるかどうかは判定が困難であった。また、輸入野菜は多くが土壤の付着したまま輸入され、洗滌されずに販売されていたためか、自由生活世代を有する土壤線虫もMGL法で、かなり高率に検出された。この土壤線虫の中に、ヒトに感染する糞線虫が含まれているかどうかを濾紙培養法で検討したが、糞線虫は検出されなかった。しかし、一般に線虫類はアレルゲンを多く含有するため、これら検出された土壤線虫類がアレルギーを引き起こすかどうかを検討しなければならないと考えられた。

今回、赤痢アメーバ原虫の検出に用いたPCRの方法は既報の手技を引用したが、予備実験で検出感度を検討したところ、検出感度が悪かったため、増幅する温度のサイクル数を増やした。輸入

野菜に付着している原虫のシスト数は極めて少数であると考えられたため、DNAの抽出条件についても若干、改良して行った。しかし、PCRに使用する primer の種類によっては検出感度が悪かった。今後も検討の余地があると考えられた。PCRで赤痢アメーバ原虫に特異的なDNA増幅産物が検出されたことから、MGL法で検出された4核のシストは赤痢アメーバ原虫であると考えられた。しかし、手技②で使用した primer は *E. nuttalli* と交差性が最近知られるようになったことから、primerの特異性が疑問視されてきた¹⁵⁾。Primerの特異性についても今後の課題と考えられた。

赤痢アメーバ症は土壤伝播性及び水系伝播性の疾病であり、輸入野菜を輸出している原産国の発展途上国ではまだまだ蠕虫感染症が多く存在し、土壤や野菜の汚染も高率であることが知られている¹⁶⁾。我が国では食材を発展途上国からの輸入に頼っていることから、今後も輸入野菜の赤痢アメーバ原虫による汚染の有無等の監視体制が必要であると考えられた。

5. ま と め

感染症新法によって赤痢アメーバ症は届出の義務があり、最近の届出数は年々増加している。この感染源の一つに輸入野菜の汚染が考えられた。そこで今回、輸入食品、特に輸入野菜が赤痢アメーバ原虫のシストに汚染しているかどうかの疫学的な調査を行った。2009年12月から2011年3月までに、スーパーで購入した輸入野菜533品目について寄生虫学的検査法及びPCRによる検査を行った。多くの輸入野菜が土壤付きで売られており、数種類のアメーバ原虫のシストが付着していた。PCRでも赤痢アメーバ原虫に特異的なDNAが高率に検出された。このことから、MGL法で検出された4核のアメーバ原虫のシストは赤痢アメーバ原虫のそれと考えられた。また、数種類の

土壌線虫も検出された。このことから、輸入野菜はかなり汚れており、輸入野菜を生食する場合はよく洗滌するか、よく加熱して食する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団並びに関係各位に心より感謝を申し上げますとともに、貴財団のますますの発展をお祈り申し上げます。

[学会報告]

1. 大西義博：輸入食材からの寄生虫卵や原虫囊子の検出の試み(予報)、第67回日本寄生虫学会西日本支部大会、2011年11月7日(金沢大学)
2. 大西義博：輸入野菜に付着した寄生虫卵や原虫囊子の検出及び疫学調査、第81回日本寄生虫学会大会、2012年3月24日(神戸大学)
3. Yoshihiro OHNISHI: Detection of Cysts and Eggs from the Imported Vegetables in Japan, The 1st AFSA International Conference; Food and Safety and Food Security – OSAKA 2012, Sep. 15 – 17, 2012 (Osaka Prefecture University)

文 献

- 1) 農林水産省ホームページ(2010a) 平成22年度食料自給率をめぐり事情、http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu_ritu/pdf/22slide.pdf
- 2) 農林水産省ホームページ(2010b) 総合食料自給率(カロリー・生産額)、品目別自給率等、http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/zikyu_ritu/pdf/22sankou4.pdf
- 3) 厚生労働省ホームページ：食品衛生法に基づく輸入手続について—モニタリング検査制度、http://www.mhlw.go.jp/topics/ysk_13/tp0419-1d.html
- 4) 食品分析開発センターホームページ(2009) 検疫所モニタリング検査について、<http://www.mac.or.jp/mail/090401/06.shtml>
- 5) 感染症情報センターホームページ(2011) アメーバ赤痢の年別報告数、<http://idsc.nih.go.jp/idwr/ydata/report-Ja.html>

- 6) 永倉貢一、永山正雄(1995) 輸入キムチが原因と思われる有鉤囊虫症の1例、病原性微生物情報、16:183
- 7) 厚生労働省ホームページ(2005) 韓国産及び中国産のキムチに関する調査状況について、<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/11/h1114-1.html>
- 8) 大西義博(2008) 医動物学カラーアトラス、pp50、三恵社
- 9) Tachibana, H., Kobayashi, S., Takekoshi, M. and Ihara, S. (1991) Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. J. Infect. Dis., 164(4), 825-826.
- 10) Haque, R., Ali, I.K., Akther, S. and Petri, W.A., Jr. (1998) Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J. Clin. Microbiol., 36(2), 449-452.
- 11) Evangelopoulos, A., Spanakos, G., Patsoula, E., Vakalis, N. and Legakis, N. (2000) A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann. Trop. Med. Parasitol., 94(3), 233-240.
- 12) Dorris, M., Viney, ME. and Blaxter, ML. 2002. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. Int. J. Parasitol., 32(12): 1507-1517.
- 13) 感染症情報センターホームページ(2007) アメーバ赤痢(1999年4月～2006年12月)
<http://idsc.nih.go.jp/disease/En-histolytica/sokuho0744.html>
- 14) 感染症情報センターホームページ(2008) アメーバ赤痢(2008年6月18日現在)
<http://idsc.nih.go.jp/disease/En-histolytica/sokuho0848.html>
- 15) Tachibana, H., Yanagi, T., Akatsuka, A., Kobayashi, S., Kanbara, H. and Tsutsumi, V. (2009) Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese macaques. Parasitology, 136(10), 1169-1177.
- 16) Uga, S., Hoa, NTV., Noda, S., Moji, K., Cong, L., Aoki, Y., Rai, SK. and Fujimaki, Y. (2009) Parasite egg contamination of vegetables from a suburban market in Hanoi, Vietnam. Nepal Med. Coll. J., 11(2), 75-78.

The survey on detecting eggs and cysts from the imported vegetables

Yoshihiro Ohnishi

*Division of Veterinary Medicine, Graduate School of Life and Environmental Sciences
Osaka Prefecture University*

Abstract

In Japan, many foods are imported from many foreign countries. The safety of these imported foods is protected but limited by the quarantine. On the other hand, the amoebic dysentery with *Entamoeba histolytica* is specified in the law. The reported cases are increasing from 1999 and reach a peak of 871 cases in 2008. One of the infection sources is considered to be contaminated with cysts on the fresh vegetables imported.

This study was carried out to detect cysts of *E. histolytica* and eggs from the fresh vegetables imported. The 533 samples of the imported vegetables were purchased from Dec. 2009 to Mar. 2011. After the imported vegetables were washed with 2L of 0.01M phosphate buffered saline solution with 0.05 % Tween 20 solution, the sediments were collected for detection. As a result, several kinds of cysts, having one to four nuclei, were detected from some of the imported vegetables by the combination methods with formalin-ether method and iodine staining. By PCR, DNAs of *E. histolytica* were also detected from some of the imported vegetables. Therefore, the cyst having 4 nuclei was suspected to be that of *E. histolytica*. In addition, the eggs, larvae and adults of *Panagrolaimus* spp. and *Cruzanema* sp. were detected from washing solution by formalin-ether method. The larvae of *Strongyloides stercoralis* were not detected by the culture method.

As a result, the imported vegetables are quite dirty. The prevention of infection was considered to wash the imported vegetables well and carefully before eating fresh one. (This study was supported by research grant of Urakami Zaidan and Food Foundation in 2009)