

B-25 ベトナム・ホーチミン市における 微生物汚染状況調査

○北島 正章^{1*}・Chanetta PHANUWAN¹・原本 英司¹・片山 浩之¹
滝沢 智¹・大垣 眞一郎¹

¹東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻（〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1）

*E-mail: kitajima@env.t.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

ホーチミン市はベトナム南東部のメコンデルタ地帯に位置するベトナム最大の都市であり、人口は約624万人（2005年の時点で）¹⁾である。

東南アジアの発展途上国において、病原微生物を原因とする下痢症は公衆衛生上の重要な問題となっており、その主な感染経路としては糞便により汚染された生鮮食品あるいは飲料水が考えられる。しかし、各感染経路における感染リスクの大小は現時点において明らかとなっていない。

そこで、本研究では、生鮮食品の中でも一般に喫食量が多く、加熱せずに食べられる食品として生野菜に注目し、生野菜表面に付着した病原微生物の検出を試みた。ベトナムのホーチミン市における生野菜の微生物汚染状況を調査すると共に、水道水中からの病原微生物の検出も試みた。

2. 実験方法

(1) 現地における生野菜および水道水試料の採取

2005年8月8日にホーチミン市内4地点の水道水試料を採取した。また、2006年2月28日、3月1日に市内10地点の水道水試料の採取および市内12地点で購入した生野菜からの拭き取り作業を行った。水道水試料の採水には、ガンマ線滅菌済みのプラスチック製パックを用いた。なお、採水後直ちにPortable Colorimeter DR/890 (Hach) を用いて水道水中の残留塩素濃度を測定するとともに、水道水試料に3% チオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) を最終濃度0.003%となるように加えた。

生野菜を購入した12地点のうち、11地点は大衆レストランであり、サラダ等の形で購入した。残りの1地点

はマーケットであり、ここではマーケットの店頭に並んでいる状態の生野菜（6種類）を購入した。

(2) 生野菜表面からの指標微生物およびウイルスの拭き取り法

物体表面からの病原微生物の検出法としては、衛生試験法²⁾「真菌一般試験法」中の「ふき取り培養法」が用いられる。この方法はガーゼを用いて物体表面から真菌を拭き取り培養法により測定するという方法である。物体表面からの真菌の拭き取り測定法は公定法として定められているものの、物体表面からのウイルスの拭き取り法は未だ確立されていない。本研究では、拭き取り素材としてガラスウールを用いた。ガラスウールを用いたウイルス測定法としては、ウイルスを含む水試料中からのウイルス濃縮法³⁾が既に開発され実際の水試料中からのウイルス検出に用いられてきたが、ガラスウールを用いた物体表面からのウイルス拭き取り法の開発は現在のところまだ報告されていない。

拭き取りには予め誘出液（3% ビーフエキス、SIGMA）で湿らせておいた乾熱滅菌（180℃、30分間）済みガラスウール（glass wool）0.06gを用いた。滅菌済みピンセットを用いて、このガラスウールで生野菜表面を丁寧に拭き取った後、速やかにガラスウールを50mL遠沈管（IWAKI）に入れた15mLの誘出液（3% ビーフエキス）中に浸漬し、遠沈管を15秒以上激しく振とうすることでガラスウールで拭き取った病原微生物を誘出液中に誘出した。

(3) 大腸菌および大腸菌群の測定法

生野菜および水道水の糞便汚染の指標微生物として、大腸菌および大腸菌群を測定した。

誘出液中には、細菌およびウイルスが共存している

ものと考えられる。誘出液の全量をパッド付きディスクフィルター Analysis monitor (Millipore) で濾過することにより、Analysis monitor中の膜面(孔径0.45 μ m)に細菌を捕捉した。Analysis monitor による濾過後の濾液は、全量を15mL遠沈管(IWAKI)中に回収した。Analysis monitor中の膜の孔径が0.45 μ mであることから、細菌は全て膜面上に捕捉されると考えられ、従って誘出液中のウイルスは微生物分解を受けないと考えられる。m-ColiBlue broth (Millipore) を Analysis monitor中の膜面に注入し、37°Cのインキュベータ内で24時間培養した後、膜面のm-ColiBlue broth中に形成されたコロニーを計数した。青から紫色を示したコロニーを大腸菌とし、赤色を示したコロニーとの合計を大腸菌群とした。

Analysis monitorによる濾過を行った後、回収した誘出液を東京大学の実験室(東京都文京区)まで氷冷して持ち帰り、冷蔵保存した。さらに、実験室に持ち帰った誘出液に対し、Centriprep YM-50 (Millipore) を用いた遠心操作(2,500rpm, 10分間×3回)を行うことにより約600 μ Lの濃縮液を得た。

また、水道水中から大腸菌および大腸菌群を測定する場合は、水道水100mLを Analysis monitorで濾過し、上記と同様の培養、計数方法により測定を行った。

(4) 水道水中からのウイルス濃縮法

陰電荷膜吸着・酸洗浄・アルカリ誘出法⁴⁾を用い、以下の手順にしたがって濃縮操作を行った。

2Lの水道水に2.5M MgCl₂を20mL添加した後、口径47mmのHA膜(孔径0.45 μ m, Millipore)で濾過した。濾過水量は全ての水道水試料に対して2Lとし、濾過には滅菌済みのシリンジ(TERUMO)と47mmフィルターホルダー(Advantec)を用いた。0.5mM H₂SO₄ (pH=3) 200mLを濾過することで膜を洗浄し、5mLの1.0mM NaOH (pH=10.5)でウイルスを膜から誘出した。膜の孔径が0.45 μ mであることから、細菌は全て膜面上に捕捉されると考えられ、従って誘出液中のウイルスは微生物分解されないと考えられる。膜を透過した5mLの誘出液(1.0mM NaOH)を5mLチューブ中に回収し、イオン的に等量となる100mM H₂SO₄ (pH=1.0) 25 μ Lにより中和するとともに100×TE (Tris-EDTA) buffer (pH=8.0, 和光純薬) 50 μ Lを用いて誘出液のpHを中性付近に保った。

表1 ホーチミン市における生野菜表面からの拭き取り法による指標微生物検出数およびウイルスの陽性率

Source of samples	Total coliforms (CFU/15mL ^a)	<i>E. coli</i> (CFU/15mL)	NV- G1	NV- G2	AdV- 40&41	EV	Rota-A	HAV	HEV	No. of samples
Restaurant	All >500	All >500	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	11
Market	All >500	All >500	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	6

^aCFU/15mLは、誘出液の液量(15mL)すなわち全拭き取り面積あたりの細菌数を示す

誘出液は、現地から東京大学の実験室(東京都文京区)まで氷冷して持ち帰り、冷蔵保存した。

実験室に持ち帰った誘出液に対し、Centriprep YM-50 (Millipore) を用いた遠心操作(2,500rpm, 10分間)を行うことにより約900 μ Lの濃縮液を得た。

(5) PCR法によるウイルスの検出

a) DNAウイルスの検出法

DNAウイルスの検出は以下の通りに行った。濃縮液(水道水)または誘出液(生野菜)中から200 μ L, 400 μ Lをそれぞれ分取してQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いたDNA抽出に供し、DNA抽出液200 μ Lを得た。DNA抽出液から5 μ Lを分取してPCR反応液45 μ Lと混合しABI PRISM 7500 (Applied Biosystems)によるウイルス検出に供した。

b) RNAウイルスの検出法

RNAウイルスについては、濃縮液または誘出液中から140 μ Lを分取してQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いたRNA抽出に供し、RNA抽出液60 μ Lを得た。RNA抽出液から10 μ Lを分取してRandom hexamer (Applied Biosystems)を用いた逆転写反応に供することでcDNAを生成し、20 μ Lを得た。20 μ Lから5 μ Lを分取してABI PRISM 7500によるウイルス検出に供した。

c) 各試料中から検出を試みたウイルスの種類

生野菜表面から検出を試みたウイルスは、ノロウイルスG1型(NV-G1)⁹⁾、ノロウイルスG2型(NV-G2)⁹⁾、エンテロウイルス(EV)⁴⁹⁾、アデノウイルス40型・41型(AdV-40&41)⁷⁾、A型肝炎ウイルス(HAV)⁹⁾、E型肝炎ウイルス(HEV)⁹⁾、ロタウイルスA群(Rota-A)¹⁰⁾であり、水道水中から検出を試みたウイルスは、ノロウイルスG1型(NV-G1)、ノロウイルスG2型(NV-G2)、エンテロウイルス(EV)、アデノウイルス(AdV)¹¹⁾である。

3. 結果および考察

(1) ホーチミン市における生野菜表面からの指標微生物およびウイルスの検出結果

ホーチミン市において、生野菜表面の拭き取りにより指標微生物およびウイルスの検出を試みた結果を表1に示す。

表2 ホーチミン市における水道水中からの指標微生物およびウイルスの陽性率と残留塩素濃度

Date of sampling	Total coliforms (CFU/mL)	<i>E. coli</i> (CFU/mL)	NV-G1	NV-G2	AdV	EV	TRC ^a (mg/L)	FRC ^b (mg/L)	No. of Samples
2005.08.08	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0.04-1.17	0.02-1.06	5
2006.03.01	0/10	0/10	ND ^c	ND	ND	ND	ND	ND	10

^aTRC:Total residual chlorine, ^bFRC:Free residual chlorine, ^cND:no data

生野菜表面から計数可能な範囲以上の大腸菌および大腸菌群が検出されたが、ウイルスについては7種全て不検出であった。

生野菜表面の微生物汚染は、野菜栽培時の肥料および灌漑用水に由来するところが大きいと考えられる。本研究における調査により、生野菜表面から大腸菌および大腸菌群が多量に検出されたことから、生野菜が何らかの糞便汚染を受けていると考えられる。しかし、試料中からヒト腸管系ウイルスが検出されなかったことから、大腸菌および大腸菌群の由来は現地では肥料として使用されている家畜糞尿である可能性が考えられる。また、HEVについてはブタやニワトリなども排出源となる可能性があることが知られているが、HEVも検出されなかったのは、この地域における家畜の間でE型肝炎が流行していないためであると考えられる。

調査を行った2月、3月は現地では乾季にあたるため、洪水に伴う河川水、運河の水および生下水の氾濫による生野菜の糞便汚染は生じていないと考えられる。ただし、我々の研究グループは2003年9月、2004年3月、2004年5月にホーチミン市における河川水、運河水、洪水時の氾濫水中の指標微生物およびウイルス存在状況調査を行っており、それぞれの水試料中からノロウイルスG1型およびG2型、エンテロウイルス、アデノウイルス、TTウイルスを高濃度で検出した¹²⁾。すなわち、ホーチミン市内および市周辺の水環境中にはヒト腸管系ウイルスが高濃度で存在することが明らかとなっている。この結果から、雨季の間の洪水時には河川等の氾濫に伴う生野菜の糞便汚染が生じる可能性が高まると考えられる。

(2) ホーチミン市における上水道の微生物汚染状況

表2に水道水中の指標微生物およびウイルスの調査結果を示す。

ホーチミン市における水道水の15試料中1試料から、低濃度 (0.55 CFU/mL) ではあるが大腸菌群が検出された。しかし、大腸菌およびウイルスについては全ての試料中から不検出であった。

したがって、水道水の摂取に起因するウイルスの

感染リスクは非常に低いものと考えられる。ただし、残留塩素濃度が十分でない水道水サンプルも見受けられる。日本の場合、末端給水栓で遊離塩素濃度 0.1mg/L以上でなければならないことが水道法で定められているが、この基準を達成していない水道水試料が5試料中2試料 (0.02, 0.04 mg/L) あった。大腸菌群が検出された試料中の遊離塩素濃度 (0.02 mg/L) は日本における基準値を満たしていない上、今回測定した水道水試料の中でも特に低い値であった。したがって、水道水中での病原微生物の再増殖という観点から考えれば、現地の水道水が必ずしも安全であるわけではない。

参考文献

- 1) Ho Chi Minh City. Homepage, HCM CityWeb. (<http://www.hochiminhcity.gov.vn/eng>)
- 2) 日本薬学会 (2005) 衛生試験法・注解, 金原出版.
- 3) Vilagines, P., et al. (1993) *Wat. Sci. Tech.* 27(3-4): 299-306.
- 4) Katayama H., et al. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3): 1033-1039.
- 5) Kageyama, T., et al. (2003) *J. Clin. Microbiol.* 41(4): 1548-1557.
- 6) Shieh, Y., et al. (1995) *J. Virol. Meth.* 54(1): 51-66.
- 7) Ko, G., et al. (2005) *J. Virol. Meth.* 127(2): 148-153.
- 8) 西尾治ら. (2002) 第 76 回日本感染症学会総会学術講演抄録集. p.251.
- 9) 影山努ら. (2004) 第 52 回日本ウイルス学会学術集会抄録集. p. 178.
- 10) Pang, X., et al. (2004) *J. Med. Virol.* 72(3): 496-501.
- 11) Heim, A., et al. (2003) *J. Med. Virol.* 70(2): 228-239.
- 12) Katayama, H., et al. (2005) *1st IWA-ASPIRE Conference & Exhibition.*