シンポジウムI クドア属寄生虫—日韓の管理体制と最近の話題—

● Symposium 1 Myxozoan Genus *Kudoa*—Control on Fish Farm in Japan and Korea, and Recent Topics—

都内の粘液胞子虫がかかわる有症事例と魚介類の感染実態調査

Association between Myxozoan Parasites and Fish-Borne Diseases in Tokyo, and a Survey of the Myxosporean Infections in Marine Fishes

鈴木 淳

(東京都健康安全研究センター)

Jun SUZUKI

(Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073)

1. はじめに

粘液胞子虫は、古くから罹患魚の筋肉をジェリー状に融解することにより食品価値の低下の原因となる寄生虫として知られてきた^{1, 2)}。これまで粘液胞子虫は、ヒトへの病原性はないと考えられてきたが、主にヒラメの筋肉に寄生する *Kudoa septempunctata* が、下痢や嘔吐の原因となることが明らかとなり、2011年6月に *K. septempunctata* が食中毒原因物質に指定された³⁾。その後5年が経過し、全国で年平均31事例の食中毒が報告⁴⁾されているが、行政機関や大学等による実態調査や検査法の確立、養殖ヒラメの生産にかかわる研究機関による *K. septempunctata* のヒラメへの感染防止策、養殖現場における出荷前検査の導入などにより、国産養殖ヒラメの喫食による食中毒は大きく減少した。しかしながら、韓国から輸入される養殖ヒラメを原因とした食中毒対策や都内でも散発事例が報告^{5, 6)}されているヒラメ以外の魚種に寄生する粘液胞子虫が原因と考えられる下痢症への原因究明については十分になされてはいない。

今回、粘液胞子虫が関与する下痢症対策の一助となることを目的に、近年の都内で発生した粘液胞子虫が原因と考えられた下痢や嘔吐を伴う有症事例への対応とともに、下痢症の推定原因食品となる主な魚介類として、ヒ

ラメ、マグロおよびカンパチにおける粘液胞子虫の寄生状況について紹介する。

2. 東京都における粘液胞子虫の検査

東京都では、ヒラメに限らず魚介類の生食後、短時間で下痢や嘔吐を起こした事例について、食中毒起因菌や腸管ウイルスの検査だけでなく、寄生虫のについても食品や糞便の検査を実施している。保健所等より依頼された食品検体について、魚1尾の場合には6カ所（左右の腹側、背側、尾側）、切り身などでは大きさにより数カ所から筋肉50 mgを採取し、遺伝子抽出キットにより抽出したDNA抽出物を遺伝子検査用の試料とした。また、有症者の糞便検体では、厚生労働省の事務連絡にある検査法⁷⁾にほぼ準じてDNAを抽出し試料とした。得られたDNA抽出試料について、Table 1に示した多種のクドア属粘液胞子虫の18S rDNAを検出可能なリアルタイムPCRによるスクリーニング検査を実施し、遺伝子の増幅が認められた場合には、18S rDNAまたは28S rDNAを標的としたコンベンショナルPCRを行い、PCR増幅産物のシーケンス解析を行った。また、有症苦情にかかわる魚介類や市場流通魚を対象とした検査では、顕微鏡下でその胞子の形態を確認し、顕微鏡下でクドア属粘液胞子虫が認められた場合には、魚肉1 g当

Table 1. スクリーニング用リアルタイムPCRのプライマーおよびプローブ

プライマー名		塩基配列 (5'→3')	配列位置	GenBank 登録番号
KuRT-F	(forward)	TGGTGCATGGCCGTTCTTA	1234-1252	AB693042
KuRT-R	(reverse)	CTCGCTCGTTACCGGAATAAA	1275-1295	AB693042
KuRT-R2*	(reverse)	TCGTTTCGTTACCGGAATAAACCT	1272-1294	AB693042
KuRT-P	(probe)	FAM-TTGGTGGAGTGATCTGT-MGB	1254-1270	AB693042

*: *Unicapsula seriolae* 用のプライマー

たりの胞子数を計数した⁸⁾。

3. 近年の都内における発生状況

2014年および2015年の2年間に、粘液胞子虫による食中毒疑いの有症事例は32事例で、そのうち16事例(50%)が9月および10月の検体であった(Table 2)。32事例中18事例において、粘液胞子虫の胞子または遺伝子が食品または有症者の糞便から検出され、その種類はFig. 1に示した*K. septempunctata*, *Kudoa hexapunctata*, *Kudoa iwatai*, *Unicapsula seriola*の4種と種不明のクドア属粘液胞子虫であった。*K. septempunctata*は、9月および10月を中心に32事例中7事例(23%)から検出されたが、11事例(34%)では*K. septempunctata*以外の粘液胞子虫が検出された。その内訳は、11事例中3事例から

Table 2. 都内の粘液胞子虫が原因と考えられた有症事例 (2014年, 2015年)

発生月	事例数	陽性事例数	検出された粘液胞子虫 (陽性事例数)
1月	2	1	<i>Kudoa septempunctata</i> (1)
2月	3	1	<i>Unicapsula seriola</i> (1)
3月	3	1	<i>U. seriola</i> (1)
4月	2	1	<i>U. seriola</i> (1)
7月	3	2	<i>Kudoa hexapunctata</i> (2)
8月	1	0	—
9月	9	6	<i>K. septempunctata</i> (3) <i>Kudoa iwatai</i> (1) <i>Kudoa</i> sp. (1) <i>U. seriola</i> (1)
10月	7	5	<i>K. hexapunctata</i> (1) <i>K. septempunctata</i> (3) <i>U. seriola</i> (1)
12月	2	1	<i>U. seriola</i> (1)
	32	18

Fig. 1. 下痢症事例から検出された粘液胞子虫
A: *Kudoa septempunctata*, B: *Kudoa iwatai*, C: *Unicapsula seriola*, D: *Kudoa hexapunctata*
スケール: 5 μ m

メジマグロ由来の*K. hexapunctata*, 6事例からカンパチ由来の*U. seriola*, 1事例からスズキ由来と考えられる*K. iwatai*, そして1事例から種不明のクドア属粘液胞子虫の遺伝子が検出された。3事例中2事例が7月の検体において検出された*K. hexapunctata*は、主に日本近海のクロマグロの若魚であるメジマグロに高率に寄生し、2014年に新種として報告されたクドア属粘液胞子虫である⁹⁾。これまで*K. hexapunctata*が残品のメジマグロから検出された有症事例は6月および7月に多く、メジマグロ1g当たりの*K. hexapunctata*平均胞子数は 1.7×10^7 spores/gであった(Table 3)。また、カンパチ由来の*U. seriola*によると考えられた有症事例は、2014年では1事例であったが、2015年においては5事例に増加した。5月から8月の春から夏期における検体から*U. seriola*は検出されなかったが、それ以外の時期の有症事例からは検出された(Table 2)。今後、カンパチに寄生する*U. seriola*が原因と疑われる食中毒様事例の増加が懸念される。

その一方で、34事例中14事例では粘液胞子虫が検出できなかったが、14事例中11事例においては、粘液胞子虫の遺伝子検出が困難な糞便または食品の別ロット品(参考品)の検査であった。これまでヒラメの*K. septempunctata*がかかわると考えられた有症事例において、残品のヒラメからの陽性率が70%であったのに対して、参考品からの陽性率が4.2%であった(Table 4)。また、

Table 3. 都内有症事例におけるメジマグロ(残品)からの*Kudoa hexapunctata*の検出状況 (2009年~2015年)

発生月	推定原因食品	顕微鏡検査	Real-time PCR
		平均胞子数 (spores/g)	平均コピー数 (copies/g)
6月	メジマグロ	8.1×10^6	5.6×10^9
	メジマグロ	7.2×10^5	4.2×10^8
	メジマグロ	9.4×10^6	5.2×10^9
	メジマグロ	4.2×10^7	2.9×10^{10}
7月	メジマグロ	4.5×10^6	4.7×10^9
	メジマグロ	4.1×10^7	2.6×10^{10}
	メジマグロ	7.4×10^6	4.5×10^9
	メジマグロ	4.1×10^7	2.4×10^{10}
8月	メジマグロ	9.8×10^6	5.3×10^9
9月	メジマグロ	4.9×10^7	1.6×10^{10}
10月	メジマグロ	1.0×10^6	6.4×10^8
12月	メジマグロ	2.0×10^6	1.5×10^9
	メジマグロ	2.6×10^6	1.9×10^9
平均値		1.7×10^7	9.6×10^9

Table 4. 有症事例のヒラメからの*Kudoa septempunctata*の検出状況 (2009年~2015年)

検体の種類	検体数	陽性数	陽性率(%)
残品 (検査を含む)	20	14	70.0
参考品	24	1	4.2

有症者の糞便検査では、喫食日から5日以上経過した検体から *K. septempunctata* の遺伝子を検出できなかった。さらに、糞便からの *K. hexapunctata* および *U. seriola* の検出状況も同様であったことや、下痢などの症状が一過性であることから、少なくともこれらの粘液胞子虫はヒトの腸管で定着や増殖はしないものと考えられる。したがって、粘液胞子虫がかかわる有症事例においては、食品残品の検査と糞便検査では喫食から4日以内の採便が重要であるといえる。

4. 都内の食中毒事例

食中毒とされた都内の事例として、2015年10月に、寿司店でヒラメを喫食した5名中2名が下痢、嘔吐を起こした事例では、有症者2名の糞便検体から *K. septempunctata* の遺伝子が検出された。参考品のヒラメから 7.0×10^6 spores/g の *K. septempunctata* の胞子が検出され、当センターで検査した参考品から初めて *K. septempunctata* が検出された事例となった。聞き取り調査により、本事例は国内産の養殖ヒラメとして提供されていたが、実際には韓国産の養殖ヒラメが用いられていたことが判明している。国産養殖ヒラメより輸入養殖ヒラメのほうが安価であることから、今後も同様の食中毒が起こることが危惧される。

カンパチの喫食にかかわる有症事例として、2015年4月に、都内ホテルのビュッフェでカンパチの寿司を喫食した13名中7名が下痢と嘔吐を起こした事例、そして2015年12月には、ホテルのコース料理で提供されたカンパチを喫食した同一グループ60名中10名で下痢と嘔吐を起こした事例が発生した。原因食品と推定されたカンパチ（検食）を検査した結果、2事例ともに検食であるカンパチから *U. seriola* の胞子が確認され、*U. seriola* 18S rDNA が 1×10^8 copies/g 以上検出された。今後、ヒラメの場合と同様に、ビュッフェや宴会等では、カンパチに寄生する *U. seriola* による集団食中毒様事例が起こる可能性が示唆された。

5. 魚介類の粘液胞子虫の寄生状況

市場流通魚介類における粘液胞子虫の寄生調査については、有症事例の多い魚種を対象に、2012年に養殖ヒラメ40検体、2011年から2013年の3年間にメジマグロ104検体、2013年および2014年の2年間にカンパチ190検体の検査を実施した。

養殖ヒラメを対象とした *K. septempunctata* の寄生調査では陽性検体は認められなかったが、国産養殖ヒラメ5検体から四つの極嚢を有するクドア属粘液胞子虫が検出された。検出されたクドアは、既報¹⁰⁾の形態および18S rDNAの塩基配列から *Kudoa lateolabracis* と同定された (Table 5)。 *K. lateolabracis* は、*Kudoa thyrsites* と同様に魚のジェリーミートの原因となるクドア属粘液胞子虫であるが、これまで都内において有症事例はない。

Table 5. 市場流通の養殖ヒラメにおける粘液胞子虫の寄生調査 (2012年)

検査実施月	産地	検体数	陽性数	検出された粘液胞子虫
7月	千葉県	4	1	<i>Kudoa lateolabracis</i>
	韓国	4	0	—
8月	大分県	4	0	—
	韓国	4	0	—
9月	愛媛県	4	2	<i>K. lateolabracis</i>
	大分県	4	0	—
	韓国	8	0	—
10月	千葉県	4	2	<i>K. lateolabracis</i>
	韓国	4	0	—
合計		40	5	

Table 6. メジマグロにおける *Kudoa hexapunctata* の検出状況 (2011年～2013年)

検査実施月	検体数	陽性数 (%)	10^3 copies/g 以上の陽性数 (%)	平均コピー数 (copies/g)
1月	7	3 (42.9)	1 (14.3)	6.9×10^8
2月	6	4 (66.7)	2 (33.3)	3.7×10^9
4月	3	2 (66.7)	1 (33.3)	8.5×10^8
5月	6	6 (100)	4 (66.7)	3.5×10^9
6月	13	11 (84.6)	8 (61.5)	2.5×10^9
7月	12	11 (91.7)	8 (66.7)	5.2×10^9
8月	12	8 (66.7)	5 (41.7)	1.9×10^9
9月	5	4 (80.0)	1 (20.0)	2.7×10^9
10月	7	4 (57.1)	2 (28.6)	1.3×10^9
11月	15	6 (40.0)	2 (13.3)	4.4×10^8
12月	18	8 (44.4)	3 (16.6)	1.1×10^9
計	104	67 (64.4)	37 (35.6)	2.1×10^9

メジマグロにおけるクドア属粘液胞子虫の寄生調査では、67検体 (64.4%) から *K. hexapunctata* が検出され、その18S rDNAの平均コピー数は 2.1×10^9 copies/g であった (Table 6)。また、1尾当たり6カ所を検査し、いずれの部位からも検出された58検体では、魚の筋肉部位における *K. hexapunctata* の寄生分布に差が認められなかった。その一方、メジマグロの重量が8 kgを超えた9検体においては、部位により寄生にばらつきが認められた。さらに、5月から7月に流通する5 kg以下のメジマグロにおいて、*K. hexapunctata* の陽性率、寄生量がともに高く、有症事例の発生時期と一致していた。また、これまでの調査結果からメジマグロの成魚であるクロマグロにおける *K. hexapunctata* の寄生率は約10%で、18S rDNAの平均コピー数もメジマグロの1/20であったことから、マグロの成長とともに *K. hexapunctata* が消失することが推察された¹¹⁾。また、都内においてクロマグロ（成魚）の喫食を原因とする有症事例は発生していない。

カンパチにおける寄生調査では、190検体中11検体 (5.7%) から *U. seriola* が検出され、そのうち、3検体では *U. seriola* 18S rDNA が 1×10^8 copies/g 以上検出された (Fig. 2)。また、*U. seriola* が検出された11検体中

Fig. 2. 月別の市場流通カンパチにおける *Unicapsula seriolae* の検出状況 (2013年, 2014年)

Table 7. イムノクロマト法による *Kudoa septempunctata* 検出キットの特異性

粘液胞子虫	魚種	結果
<i>Kudoa septempunctata</i>	ヒラメ	(+)
<i>K. thyrssites</i>		(-)
<i>K. lateolabracis</i>		(-)
<i>K. ogawai</i>		(-)
<i>K. hexapunctata</i>	クロマグロ	(+)
<i>K. neothunni</i>	キハダマグロ	(+)
<i>Unicapsula seriolae</i>	カンパチ	(-)

8検体が、9月から12月および1月に流通したカンパチで、9から12月の有症事例の発生と市場流通のカンパチからの検出状況との一致が認められたが、有症事例数が少ないことから、今後の発生動向を注視する必要がある。

6. イムノクロマト法の特異性

2016年4月に *K. septempunctata* の検査法が改正され、スクリーニング検査法として新たにイムノクロマト法が追加された⁸⁾。現在、市販されているキットは、*K. septempunctata* 検出キット (ARK Checker IC *Kudoa septempunctata* M, アークリソース) のみで、本キットを用いて、これまでにヒラメの筋肉から検出された *K. septempunctata*, *K. lateolabracis*, *Kudoa thyrssites*, *Kudoa ogawai*, メジマグロやキハダマグロの筋肉から検出された *K. hexapunctata*, *Kudoa neothunni*, そしてカンパチの *U. seriolae* との交差反応性を確認したところ、クロマグロやキハダマグロに寄生する *K. hexapunctata* および *Kudoa neothunni* が陽性となった (Table 7)。 *K. septempunctata* 検出用のイムノクロマトキットをヒラメ以外の魚介類で使用するケースは考えにくい、陽性であった場合には胞子の形態を確認する必要がある。

7. 今後の課題

現在、クダア属だけでも100種近い種類が報告¹²⁾されているが、その生活環、感染経路などが解明されているのはごく一部で、*K. septempunctata* の生活環も完全

に解明されていない。*K. septempunctata* については、Caco-2細胞に対する細胞毒性や乳のみマウスにより実験的に下痢原性が確認され^{13, 14)}、食中毒起因物質に指定されたことにより、食中毒の発生状況を把握することが可能となっている。その一方で、メジマグロやカンパチ等の生食により、一過性の下痢や嘔吐等を呈する有症事例が都内だけでなく全国的にも散見されている^{4, 5, 15)}が、学会等で報告されなければ、その発生状況の把握が困難である。現在、メジマグロに寄生する *K. hexapunctata* については、Caco-2細胞に対する細胞毒性やマウスによる下痢原性が確認されたが、*K. septempunctata* の10倍量の胞子数が必要であることがわかってきた¹⁰⁾。今後、さらなる事例の蓄積を全国的に行う必要と毒性試験等の科学的根拠に基づき、*K. septempunctata* 以外の粘液胞子虫によると考えられる健康被害を未然に防止する対策が求められる。

謝 辞

本研究において、クダアの分類に関するご指導、ご助言をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科の横山 博博士に深謝いたします。

文 献

- Gilchrist, J. D. F.: A protozoal parasite (*Chloromyxum thyrssites* sp. n.) of the cape sea-fish, the "snoek" (*Thyrssites atun*, Euphr.). Trans. R. Soc. S. Afr., **11**, 263-273 (1923).
- Kudo, G., Barnett, H. J. and Nelson, R. W.: Factors affecting cooked texture quality of Pacific whiting, *Merluccius productus*, fillets with particular emphasis on the effect of infection by the myxosporeans *Kudoa paniformis* and *K. thyrssites*. Fish. Bull., **85**, 745-755 (1987).
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について。平成23年6月17日, 食安発0617第3号 (2011).
- 杉山 広: 食中毒としての食品媒介寄生虫症: 現状と検査の課題。日食微誌, **33**, 134-137 (2016).
- 鈴木 淳, 村田理恵, 新開敬行, 貞升健志: 都内で発生したクダアによる食中毒事例。Clin. Parasitol., **26**, 104-106 (2015).
- 鈴木 淳, 日向綾子, 村田理恵, 新開敬行, 貞升健志: 都内における粘液胞子虫が原因と推定された下痢症事例。Clin. Parasitol., **27**, 54-56 (2016).
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課: 食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法 (参考) について。平成26年5月26日, 事務連絡 (2014).
- 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: *Kudoa septempunctata* の検査法について。平成28年4月27日, 生食監発0427第3号 (2016).
- Yokoyama, H., Suzuki, J. and Shirakashi, S.: *Kudoa hexapunctata* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-description of *K. neothunni* in yellowfin tuna *T. albacares*. Parasitol. Inter., **63**, 571-579 (2014).

- 10) Yokoyama, H., Whipps, C. M., Kent, M. L., Mizuno, K. and Kawakami, H.: *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathology*, **39**, 79–85 (2004).
- 11) Suzuki, J., Murata, R., Yokoyama, H., Sadamasu, K. and Kai, A.: Detection rate of diarrhoea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefintuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters. *Int. J. Food Microbiol*, **194**, 1–6 (2015).
- 12) Eiras, J. C., Saraiva, A. and Cruz, C.: Synopsis of the species of *Kudoa Meglitsch*, 1947 (Myxozoa: Myxosporea: Multivalvulida): *Syst. Parasitol.*, **87**, 153–180 (2014).
- 13) Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. and Ohnishi, T.: Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clin. Infect. Dis.*, **54**, 1046–1052 (2012).
- 14) Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y. and Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathog. Dis.*, **10**, 137–142 (2013).
- 15) 大西貴弘, 都丸亜希子, 吉成知也, 鎌田洋一, 小西良子: 生鮮魚介類の生食に関連した有症苦情事例残品に含まれる粘液胞子虫の検出. *日食微誌*, **33**, 150–154 (2016).