

Kudoa neothunni の感染したキハダマグロが原因食品と疑われた有症事例

田崎 穂波, 竹村 明浩, 堀田 千恵美, 追立 のり子, 西嶋 陽奈, 福井 聡子¹⁾, 松本 真侑¹⁾,
吉森 和宏¹⁾, 小川 知子²⁾, 鈴木 淳³⁾

Suspected foodborne illness due to *Kudoa neothunni* infected in yellowfin tuna *Thunnus albacares*

Honami TASAKI, Akihiro TAKEMURA, Chiemi HOTTA, Noriko OITATE, Haruna NISHIJIMA,
Satoko FUKUI¹⁾, Mayu MATSUMOTO¹⁾, Kazuhiro YOSHIMORI¹⁾, Tomoko OGAWA²⁾, and Jun SUZUKI³⁾

キーワード：キハダクドア、キハダマグロ、胃腸炎症状
Keywords : *Kudoa neothunni*、*Thunnus albacares*、gastroenteritis

(令和元年 7 月 16 日受付 令和元年 10 月 21 日受理)

はじめに

ヒラメやマグロなどの生鮮魚介類の生食後、短時間で下痢や嘔吐の症状を呈する原因不明の食中毒が全国的に発生する中、2011 年に主にヒラメに寄生するクドア属の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が食中毒の原因物質に指定された。また、メジマグロに寄生する *Kudoa hexapunctata* が原因と推定される一過性の下痢症も散発的に報告¹⁾され、*K. septempunctata* 以外の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が複数報告されている²⁾。

今回、千葉県内でマグロを生食した複数名が、*K. septempunctata* による消化器症状と似た症状を呈したことから、原因食品と考えられたマグロにおける粘液胞子虫の寄生状況の調査と種同定を行ったのでその結果を報告する。

材料と方法

1. 検査材料

冷凍保管されていた調理前のマグロの残品

2. 方法

1) 疫学情報の収集

2018 年 7 月、県内 A 保健所に、当該保健所管内の飲食店で食事をした後、下痢・腹痛を呈し、医療機関を受診した者が複数いるとの情報が寄せられた。

これを受けて A 保健所は、有症者及び飲食店に対し、聞き取り調査等を行った。

2) 形態学的検査

(1) シュードシストの確認

ガラス板 2 枚でマグロの筋肉を圧平し、実体顕微鏡を用いて倍率 5 倍で観察した。

(2) 胞子の計数

K. septempunctata の検査法に関する厚生労働省通知³⁾を準用し、次のように行った。

マグロ筋肉を 0.5 g 秤量し、PBS を加えて潰しながら 200 μm のメッシュ (日本理化学器械) で濾過後、さらに 100 μm のセルストレイナー (コーニング) で濾過し、遠心管に回収した。

これを 10°C で 400 \times g、10 分間遠心して得た沈渣に PBS 0.5 mL を加え、懸濁液とした。この懸濁液に含まれる 6 極囊を有する胞子の数を Burker-Turk 血球計算盤を用いて計測した。

(3) 形態観察

マグロの筋肉 0.6 g を細切し、3 mL の PBS に懸濁したものを 100 μm のセルストレイナー (コーニング) で濾過後、さらに 40 μm のセルストレイナー (コーニング) で濾過した。

この濾液を 400 \times g で 15 分間遠心分離して得た沈渣に 1 mL の PBS を加え沈渣液とした。

50%パーコール液に 25%パーコール液を重層した 15 mL チューブにこの沈渣液を重層し、1,500 \times g で 30 分間遠心分離した。得られた沈渣を PBS で洗浄後、500 μL の PBS に懸濁し、この懸濁液をスライドグラスに滴下して生物顕微鏡を用いて倍率 1,000 倍で形態を観察した。Yokoyama ら⁴⁾の方法を参考に、胞子 10 個の胞子厚 (T)、胞子幅 (W) と縫合線部胞子幅 (SW)、極囊長 (PCL)、極囊幅 (PCW) を計測し、W と SW の値から胞子のへこみ割合 (SW/W) を求めた (図-1)。

3) 遺伝子検査

(1) 粘液胞子虫

形態観察のために調整した胞子懸濁液から QuickGene-Mini480 (クラボウ) を用いて DNA を抽出し、

1) 印旛健康福祉センター成田支所, 2) 元千葉県衛生研究所, 3) 東京都健康安全研究センター

クドア属粘液胞子虫の 28S rDNA を標的とした既報⁴⁾の 3 つのプライマーセット (表-1) を用いて PCR を行った。各プライマーの終濃度が 0.1 μM となるように反応液を調製し *Takara Ex Taq*[®] DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用して PCR を実施した。PCR 条件は 95°C5 分加温し、95°C30 秒、59°C30 秒、72°C1 分を 35 サイクル繰り返した後、72°C で 6 分インキュベートとした。

ダイレクトシーケンス法により PCR 増幅産物の塩基配列を決定した。

得られた塩基配列のうち 2,048 塩基について maximum likelihood method (ML 法) による系統解析を実施して、マグロに寄生していたクドアの種を同定した。

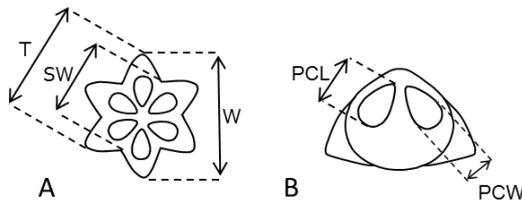


図-1 *Kudoa* 属粘液胞子虫胞子の概略図

A: 正面概略図, B: 側面概略図

T: 胞子厚, W: 胞子幅, SW: 縫合線部胞子幅,

PCL: 極囊長, PCW: 極囊幅

表-1 粘液胞子虫の種同定に用いたプライマー

| プライマー名 | 塩基配列 | 位置 |
|-----------|------------------------|-----------|
| Myxo28S1F | AGTAACTGCGAGTGAAGCG | 80-98 |
| Ku28R1 | TCACGCATAGTTCACCATCT | 946-965 |
| Ku28F2 | AGTGAAGCGAGAGATGAGA | 845-864 |
| Myxo28S3R | GAGCACTGGGCAGAAATC | 2506-2523 |
| Ku28F3 | ATTAACAACAAAGCATTGCGAT | 2459-2479 |
| Ku28R3 | GCATTGCATCACTGGCCTAT | 3504-3523 |

(2) マグロ

マグロ筋肉 50 mg を 2 ヶ所より採取して、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン) の「組織からのプロトコール」に準じて DNA を抽出した。*Takara Ex Taq*[®] DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用しマグロのミトコンドリア ATPase 遺伝子を標的とした既報⁵⁾のプライマーセット (TunaATP-F : CTTCGACCAATTTATGAGCCC、TunaATP-R : GCCATATCGTAGCCCTTTTTG) を用いて PCR を行った。各プライマーの終濃度が 0.4 μM となるように反応液を調製した。PCR 条件は 95°C2 分加温後、95°C1 分、50°C30 秒、72°C1 分 30 秒を 30 サイクル繰り返した。

得られた増幅産物はクドア胞子と同様に塩基配列を決定し、得られた塩基配列のうち 821 塩基について ML 法による系統解析を実施して、マグロの種を同定した。

結果

1. 疫学調査

探知した保健所による疫学調査の結果、体調不良者は

マグロの漬け丼を喫食していた者に限られた。また漬け丼に載せたマグロは、提供されるまで冷凍工程を経ず、提供の 30 分前から醤油、みりん、わさびが含まれる調味液に漬け込まれていた。

マグロの漬け丼の喫食者 55 名中、11 名が胃腸症状を呈していた。有症者の喫食から発症までの潜伏時間は、最短 40 分、最長 19 時間 30 分であり、中央値は 6 時間 48 分であった (図-2)。

症状は頻度の高い順に下痢 (11 名)・腹痛 (5 名)・嘔気 (5 名)・嘔吐 (4 名) であり、全員が下痢を呈していた。下痢は全員が水様便で、多くの者が 1 日以内に回復し、数時間のうちに回復した者もあった。また従事者便及び体調不良者便からは有意な食中毒起因細菌及びウイルスは検出されなかった。

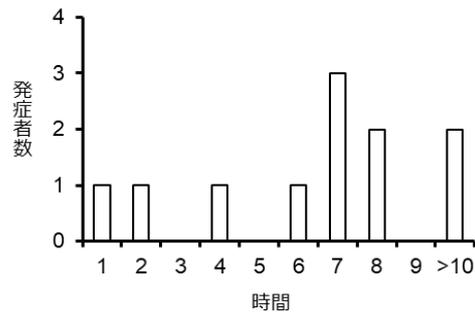


図-2 喫食から発症までの潜伏時間

2. クドア胞子の形態と寄生強度

ガラス板で圧平したマグロ筋肉を実体顕微鏡下で観察したところ、長さ約 0.6~1.7 mm のシュードシストが多数確認された (図-3-A)。またマグロ筋肉 1 g あたりの胞子の寄生数 (寄生強度) は、 1.75×10^5 個であった。

胞子は 6 極囊を有しており (図-3-B, C)、胞子 10 個を計測したところ胞子のへこみ割合 (SW/W) の平均は 66.4%であった (表-2)。

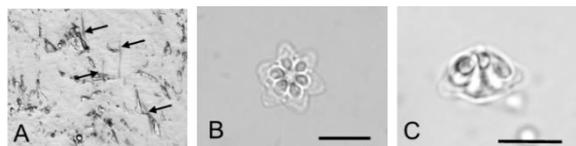


図-3 キハダマグロから検出されたシュードシストと胞子

A : キハダマグロ筋肉中のシュードシスト (矢印部分)

B : 胞子正面像 C : 胞子側面像

スケールバー : 10 μm

3. 遺伝子解析

系統解析を実施したところ、当該マグロから検出されたクドア属粘液胞子虫の 28S rDNA の塩基配列は、*K. neothunni* のレファレンス配列 (GenBank accession no. AB902959) と 100%一致し、*K. neothunni* と同じクラスターに帰属した (図-4)。また、当該マグロは、ミトコンドリア ATPase 遺伝子の塩基配列に基づいた系統解析の

表-2 検出されたクドア胞子の計測値

| 胞子 No. | 胞子厚(μm) (T) | 胞子幅(μm) (W) | 縫合線部 胞子幅(μm) (SW) | 極嚢長(μm) (PCL) | 極嚢幅(μm) (PCW) | へこみ割合 (%) (SW/W) |
|--------|-------------|-------------|-------------------|---------------|---------------|------------------|
| 1 | 10.0 | 12.5 | 8.0 | 4.5 | 2.2 | 64.0 |
| 2 | 10.0 | 12.5 | 8.0 | 5.0 | 2.5 | 64.0 |
| 3 | 10.0 | 12.0 | 7.5 | 4.0 | 2.0 | 62.5 |
| 4 | 11.0 | 13.5 | 8.5 | 5.0 | 2.8 | 63.0 |
| 5 | 11.0 | 12.0 | 8.4 | 4.2 | 2.0 | 70.0 |
| 6 | 11.0 | 13.5 | 9.0 | 4.0 | 2.0 | 66.7 |
| 7 | 11.5 | 12.0 | 9.0 | 5.0 | 2.2 | 75.0 |
| 8 | 10.7 | 13.2 | 9.0 | 5.0 | 2.5 | 68.2 |
| 9 | 10.2 | 12.8 | 9.0 | 4.8 | 2.0 | 70.3 |
| 10 | 11.0 | 13.0 | 8.5 | 4.0 | 2.2 | 65.4 |
| 平均 | 10.6 | 12.8 | 8.5 | 4.6 | 2.2 | 66.4 |
| (SD) | (0.5) | (0.6) | (0.5) | (0.4) | (0.3) | (3.8) |

結果、*Thunnus albacares* (キハダマグロ) のレファレンス配列 (GenBank accession no. GU256528) と 99.9%一致し、*T. albacares* (キハダマグロ) と同じクラスターに帰属した。

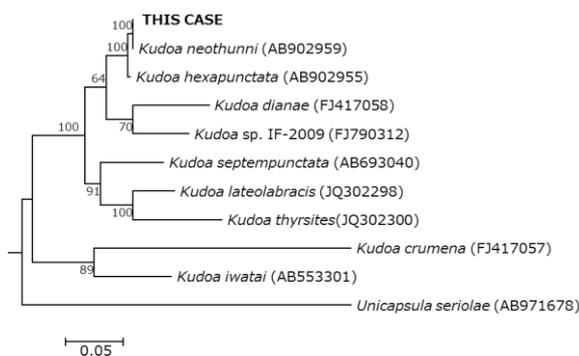


図-4 クドア属粘液胞子虫の28S rDNAの塩基配列 (2,048塩基) に基づく系統樹解析 (ML法)

考察

K. neothunni は、1953年に Arai らによってキハダマグロから検出され、新種として報告されたクドア属粘液胞子虫である⁶⁾。今回、キハダマグロから検出されたクドア属粘液胞子虫は、形態学的な計測値 (T、W、SW、PCL、PCW、SW/W) の平均数値が、*K. neothunni* の文献値⁴⁾と近い値であり、遺伝子解析の結果においても *K. neothunni* のレファレンス配列と完全に一致したことから、*K. neothunni* と同定された。キハダマグロに寄生する *K. neothunni* は、ジェリーミートの原因寄生虫とされているが⁶⁾、本事例においてジェリーミートは確認されなかった。ジェリーミートは胞子形成前の栄養体でクドアが産生する消化酵素によって起こされるものと考えられているが、そのメカニズムには不明な点が多い。今回のキハダマグロにおいてジェリーミート化が起こらなかった原因は、漁獲された際に、ほとんどの *K. neothunni* が胞子形成をしていたためとも考えられるが詳細は不明である。

2009年から2010年に有症事例の原因となったヒラメ 1gあたりの *K. septempunctata* の平均寄生強度は 2.4×10^6 個/gと報告⁷⁾されている。また2009年から2015年に都内で発生したメジマグロに寄生する *K. hexapunctata* が原因と推定される有症事例 13 事例におけるマグロ 1gあたりの平均寄生強度は、 1.7×10^7 個/gと報告⁸⁾されている。今回、推定原因食品のキハダマグロにおける *K. neothunni* の寄生強度は、 1.75×10^5 個/gであったことから、これらの値と比較すると低い値であった。しかしながら、本事例では、1食あたり 130g の漬けマグロを使用しており、1名あたりの喫食胞子数は約 2.3×10^7 個と推計され、ヒラメの *K. septempunctata* による食中毒事例の推定喫食胞子数⁹⁾と同程度の *K. neothunni* を摂取していたと推定された。

厚生労働省が食中毒の病因物質としている粘液胞子虫は *K. septempunctata* のみである。粘液胞子虫の実験室内での維持、培養法は確立されておらず、細胞や動物を用いて下痢原性を確認することが困難である。したがって粘液胞子虫の関与が疑われる有症事例の疫学的情報を蓄積することが、粘液胞子虫と胃腸炎症状との因果関係の解明につながると考える。魚の生食は多くの日本人に好まれるため、今後も類似事例が発生することが危惧される。粘液胞子虫と胃腸炎症状の関係を解明し、同様事例の発生予防に資するため、今後も食品衛生監視員の協力を得て、粘液胞子虫の関与が疑われる有症事例について、喫食残品や患者便から粘液胞子虫の胞子や遺伝子を検出し、種同定を試みたい。

謝辞

調査を遂行するにあたり御尽力いただいた印旛健康福祉センター(保健所)検査課の皆様へ深謝いたします。

引用文献

1) Jun Suzuki, Rie Murata, Hiroshi Yokoyama, Kenji Sadamasu, Akemi Kai : Detection rate of diarrhoea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters, International Journal of

Food Microbiology, 194, 1-6(2015)

2)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, 日本食品微生物学会雑誌 33(3), 150-154(2016)

3)*Kudoa septempunctata* の検査法について, 厚生労働省 医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長 通知, 平成28年4月27日

4)Hiroshi Yokoyama, Jun Suzuki, Sho Shirakashi : *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*, Parasitology International, 63, 571-579(2014)

5)Seinen Chow, Hirohisa Kishino : Phylogenetic Relationships Between Tuna Species of Genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): Inconsistent Implications from Morphology, Nuclear and Mitochondrial Genomes, Journal of Molecular Evolution, 41, 741-748(1995)

6)Yoro Arai, Koichi Matsumoto : On a New Sporozoa, *Hexacapsula neothunni* gen. et sp. nov., from the Muscle of Yellowfin Tuna, *Neothunnus macropterus*. The Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 18(7), 293-298(1953)

7)Takao Kawai, Tsuyoshi Sekizuka, Yuichiro Yahata, Makoto Kuroda, Yuko Kumeda, Yoshio Iijima, 他 : Identification of *Kudoa septempunctata* as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of *Paralichthys olivaceus* in Raw Fish, Clinical Infectious Diseases, 54(8), 1046-1052(2012)

8)鈴木 淳 : 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, 日本食品微生物学会雑誌, 34(2), 84-88(2017)

9)ヒラメの *Kudoa septempunctata* に係る食品健康影響評価について, 食品安全委員会, 2015年11月10日