

201005019A

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する
食品衛生上の予防対策

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小西 良子

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成23(2011)年3月

目次

I. 総括研究報告	
生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策……………	3
II. 分担研究報告	
1. 実験動物を用いたヒラメに寄生するクドア属の嘔吐毒性評価……………	21
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
2. 乳のみマウスを用いた <i>Kudoa septempunctata</i> 胞子の下痢原性に関する研究…	29
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
3. 生鮮魚介類中の危害分子に対する培養細胞を用いた毒性評価法の構築……………	37
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
4. ヒラメ中のクドア汚染分布と定量的検出系の構築……………	47
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
5. ヒラメの筋肉に寄生するクドア属粘液胞子虫 3 種の診断法……………	55
横山 博 (東京大学)	
6. 生鮮魚介類中の危害因子の検出法開発……………	61
黒田 誠 (国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター)	
7. ひらめ喫食と発症の疫学調査……………	69
八幡 裕一郎 (国立感染症研究所 感染症情報センター)	
8. 生鮮魚介類中の危害因子の制御に関する研究……………	79
鎌田 洋一 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………	99

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策

主任研究報告書

小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

要旨

近年、全国的に、食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢を呈し、軽症で終わる有症事例で、既知の病因物質が不検出、あるいは検出した病因物質と症状が合致せず、原因不明として処理された事例が増加している。

平成21年6月から平成23年3月までに、同様の症状で報告された事例を調べたところ提供メニューのうち生食用鮮魚介類が含まれていた事例が多く、とくにヒラメが提供された例が多く認められた。生鮮魚介類以外では馬刺しが提供された例が多く見られた。また、平成22年10月にA県で起きた食中毒事例ではヒラメが原因食品であることが明らかであったことから、ヒラメおよび馬肉に焦点をあて、本食中毒の原因物質の究明に必要な毒性評価法の確立を行った。また、同時に予防対策として、加熱、凍結等の処理が毒性に与える影響を評価した。

<ヒラメを介した有症事例>

本食中毒事例残品1件を次世代シーケンサーによる網羅的配列解読を行ったところ、粘液胞子虫(クドア属)の*Kudoa septempunctata*が有意に多く存在したことから、他の食中毒事例残品(参考品を含む)もクドア属を顕微鏡所見および遺伝子検査を行ったところ、頻度高く検出された。また患者吐瀉物からも遺伝子検査法で*Kudoa septempunctata*が検出されたことから、ヒラメ中の病因物質として、クドア属が本食中毒と相関性が極めて高いことが示唆された。

次に*Kudoa septempunctata*を主とするクドア属を用いた動物実験系および細胞培養系を構築し、その毒性を評価した。その結果、マウスにクドア胞子を経口投与すると、沈鬱になり、血中の数種サイトカインが亢進した。unksにクドア胞子を経口投与した場合には、嘔吐が観察された。乳のみマウスに、クドア胞子を経口投与した場合、水溶性排便、腸管水分貯留が認められた。これらのことからマウス、unksおよび乳のみマウスが実験動物系として毒性評価に使用できることが明らかになった。培養細胞系では、ヒト腸管細胞培養系の経上皮電気抵抗を指標にクドアの腸管毒性評価ができることが明らかになった。

さらに*Kudoa septempunctata*の失活は、冷蔵状態では少なくとも1週間程度病原性が保持されていたが、 -30°C 2時間または -30°C で1日以上保管することで失活した。加熱処理(中心温度 75°C 5分以上の加熱)でも失活した。

食中毒原因究明および水産現場でのモニタリングに用いるための検査法として、2種類の遺伝子検査法を開発した。食中毒事例の疫学調査の結果から、発症暴露量の推定も行った。

<馬刺しを介した有症事例>

馬刺し中の病因物質は、有症事例に関連した馬刺し残品の筋肉部位に、大半のものに共通して住肉胞

子虫の1種である *Sarcocystis fayeri* が感染していたこと、事例から分離された *Sarcocystis fayeri* は犬を終宿主とし馬を中間宿主とする生活環を有することが確認されたことから、*Sarcocystis fayeri* の可能性が強く示唆された。

Sarcocystis fayeri の病原性は、ウサギ腸管ループ試験で腫脹、体液貯留が確認され腸管病原性が認められた。*Sarcocystis fayeri* の失活は、馬肉を-20℃（中心温度）で48時間以上、-30℃（中心温度）で36時間以上、-40℃（中心温度）で18時間以上及び急速冷凍装置を用いた場合は-30℃（中心温度）で18時間以上を保持する冷凍方法、並びに、液体窒素に浸す場合にあっては、1時間以上保持する方法で失活した。

予防対策としては、本研究で確立した検査法を用いて養殖場や屠殺場段階におけるモニタリング等の対策および冷凍、冷蔵などの流通・加工段階における対策が有効であると考えられる。

研究分担者

鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所
大西 貴弘	国立医薬品食品衛生研究所
黒田 誠	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
八幡裕一郎	国立感染症研究所、感染症情報センター
横山 博	東京大学大学院農学生命科学研究科

研究協力者

福田 穰	大分県農林水産研究指導センター
関塚 剛史	国立感染症研究所
大西 真	国立感染症研究所
久米田裕子	大阪府公衆衛生研究所
河合 高生	大阪府公衆衛生研究所
原田 哲也	大阪府公衆衛生研究所
飯島 義雄	神戸市環境保健研究所
中西 典子	神戸市環境保健研究所
渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所
入倉 大祐	国立医薬品食品衛生研究所
斉藤 守弘	埼玉県食肉衛生検査センター
田中 成幸	埼玉県食肉衛生検査センター
原田 誠也	熊本県保健環境研究所
古川 真斗	熊本県保健環境研究所

A. 研究目的

平成15年から生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒（有症苦情を含む）が全国的に増加しており、平成21年6月から平成23年3月までに発生した原因不明有症事例は198件が厚生労働省に報告されている。このうち提供メニューに生食用生鮮魚介類が含まれていた事例は165件であり（うち135件はヒラメの提供あり）、生食用獣肉（馬刺し）が含まれていた事例は33件であった。症状は生食用生鮮魚介類および生食用獣肉とも共通しており、摂食後数時間で、嘔吐下痢を主症状としている。発症までの平均時間は6時間であり、回復は早く予後は良好である。しかしながら、症例が増え続けていることから、喫緊に予防対策を講じる必要がある。

本食中毒による嘔吐下痢症状の動物モデルおよび細胞モデルはまだ確立されていないことから、その原因危害因子はまだ解明されていない。

本研究では、生鮮獣肉および生鮮魚介類を対象に、それぞれ以下の4項目を実施することを目的とした。

- 1) 食中毒症状を反映する毒性評価法の構築
- 2) いままでに食中毒原因と推定される因子に対する遺伝子的検査法等の確立
- 3) 食品衛生上実現可能な予防対策の検討
- 4) 平成22年10月にA県で起こったヒラメの喫食が原因とされる食中毒事例に関する疫学解析

B. 研究方法

本研究の研究対象は、生食用生鮮魚介類ではヒ

ラメ、生食用獣肉では馬刺しとした。

1. ヒラメ喫食による食中毒

1) 食中毒症状を反映する毒性評価法の構築

(1) 実験動物による毒性評価系の構築

(a) 実験材料とクドア胞子の計測および精製法

マウス、ラット、ウサギおよびスunksを用いた実験系の検体として、平成22年10月に発生したA県での食中毒事例で提供された残品および大分県農林水産研究指導センター水産研究部 福田穰博士の協力を得て、大分県の養殖場からクドア感染ヒラメを入手して使用した。

乳のみマウスの系の検討では、2010年に豊中市、神戸市、北九州市で発生した3事例の原因不明食中毒で得られた喫食残品のヒラメをサンプルに供した。また、2010年に発生した広島市の食中毒事例では喫食残品が入手できなかったため、同一のいけすで飼育されていたヒラメ10匹を調べ、クドア胞子数の最も多いヒラメをサンプルとして使用した。

クドア胞子の分離および精製は、メッシュで筋肉とクドアを分離し、クドア胞子ホモジネート液とし、実験に供した。沈渣を1mlのPBSで懸濁して血球計算版でクドア胞子数を計測した。

対照のヒラメホモジネート液は、クドア胞子を含まないヒラメを上記と同じ方法で抽出し作成した。精製クドア胞子は、30%パーコールで、精製した^{1,2)}。

(b) マウス実験

クドア胞子を胃ゾンデで経口投与した。投与後マウスの様子を観察し、投与後約一時間で心臓採血を行い、血清を回収した。血清中の42種類のサイトカインの産生を検出した。

(c) 腸管ループ法

実験動物としてマウス、ラットおよびウサギを用いた。腸管ループに、マウスでは1ループ当たり0.2ml、ラットでは0.1ml、ウサギでは1.0mlを注入後、マウスおよびラットでは4時間後、ウサギでは6時間後の腸管内貯留水分量を観察した。

(d) スunksを用いた嘔吐実験

体重70g前後のスunks ϕ にあらかじめク

ドア胞子を含まないヒラメを用いて餌付けしておき、ヒラメ筋肉を自発的に摂食するようにしておいた。これらのスunksに、クドア胞子を含むヒラメの切り身を食べさせ、約1時間嘔吐の有無を観察した。摂食後20-30分後に3回以上嘔吐を起こした場合、嘔吐反応陽性とした。精製クドア液を経口投与した場合は、胃ゾンデで投与した。

(e) 乳のみマウス試験

4-5日齢のddYマウスにクドア胞子抽出液を0.1ml経口投与した。25°Cで1.5時間または4時間保温・観察した後にと殺し、腸の液体貯留値 (FA値) を測定した。1サンプルにつき3-6匹のマウスを使用し、Student's *t* testを用いて統計解析した。

(f) ヒト腸管培養 (Caco-2細胞) 実験

経上皮電気抵抗 (TER) を測定する場合、Caco-2細胞をBiocoat Cell Culture Inserts (BD Biosciences) 内に 2×10^5 cells/mlを加え、37°C、24時間培養した。分化誘導が完了したCaco-2細胞のTERをMillicel-ERS (Millipore) によって測定した後、披験物質をBiocoat Cell Culture Insertsに加え、任意の時間培養したのち、再びTERを測定した。

2) 食中毒原因物質の次世代シーケンサー (illumine GAIIX) による網羅配列解読とクドア属の遺伝子的検査法等の確立

(1) 次世代シーケンサー (illumine GAIIX) による網羅配列解読

養殖ヒラメ (0904) の冷凍切り身からDNAおよびRNAをAmbion Total Nucleic acid purification kitにて精製した。コントロール・ヒラメ (築地市場) と事例ヒラメから得られた網羅解読リードを比較解析し、事例ヒラメにのみ見られる特徴的な配列を抽出し、事例ヒラメに特徴的な配列をMEGABLAST法 (核酸 vs 核酸データベース nt) にて相同性検索を行い、得られた結果をMEGANによりtaxonomy分類した。

(2) 精製RNAを鋳型にした定量的逆転写PCR (qRT-PCR) による検査法の確立

粘液胞子虫 *Kuoda* spp. の18S-rRNAのPCR増幅は、既報論文のプライマー配列を用いた。粘液胞

子虫 *Kudoa* spp. の 18S-rRNA 全般を PCR 増幅するための共通プライマーをアライメント解析にて選別した。精製 RNA を鋳型にした定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) は、Invitrogen SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit with ROX を用いて行った。

(3) 精製 DNA を鋳型にした定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) による検出法の確立とサンプリングプラン

(a) ヒラメのサンプリング法の検討

クドア孢子に感染したヒラメを大分県農林水産研究指導センター水産研究部 福田 穰博士より供与された。クドア孢子の汚染のあるヒラメを用いて可食部から 10 か所採取し、筋肉中の分布を顕微鏡所見により測定した。

(b) 定量的 PCR の構築と定量標準プラスミドの作成

K. septempunctata の 18S rDNA の配列 (accession no. AB553293) に基づき、リアルタイム PCR による定量的検出系を設計した。

K. septempunctata の 18S rDNA の遺伝子のクローニングを行なった。リアルタイム PCR に用いる配列を含む、1,184 塩基を PCR で増幅し、TA クローニングによりプラスミドに組み込んだ。rDNA のコピー数の算出において、*K. septempunctata* 1 個体当りのコピー数の算出は、精製 *K. septempunctata* から、サザン・ブロットイングからまたは全塩基配列からおこなった。

(c) 食中毒事例ヒラメ中の *K. septempunctata* の定量

キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit の「組織からのプロトコール」に準じて、原因食材と推察されるヒラメ 61 検体から DNA を抽出した。Ct 値を求めた。濃度を調整したプラスミドを段階希釈し、検量線から *K. septempunctata* の DNA 量を求めた。1 個体当り 18S rDNA のコピー数で除して、*K. septempunctata* の数量を算出した。

また、同じ検体を金属メッシュで濾した後、血球計数版を使用して *K. septempunctata* のクドア孢子数を求めた。

患者の吐物 5 検体から、DNA を抽出し、上記の

方法に準じて、*K. septempunctata* の検出を試みた。

ヒラメの稚魚の *K. septempunctata* による汚染状況を調べる目的で、3 種類の成長段階 (全長約 40 mm, 約 53 mm, 約 58 mm) にある稚魚各 100 匹、計 300 匹から DNA を抽出し、*K. septempunctata* を検出した。

汚染経路を調べる目的で、ヒラメの稚魚に与える生物餌料 [L 型ワムシ] 3 ロットと「アルテミア幼生」3 ロット、配合飼料である「アンブローズ」4 ロットと「おとひめ」1 ロットから、*K. septempunctata* の検出を試みた。

(3) 3 種のクドア属鑑別のための PCR 検査法の確立

ヒラメの筋肉組織からクドア属を採集し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した後、クドア属粘液胞子虫の 18S および 28S rDNA 用に用いられる既報のプライマーにより各領域を増幅し、シーケンスした。得られた 18S と 28S rDNA のデータを用いて、Bayes 法により系統解析を行った。

4) 平成22年10月にA県で起こったヒラメの喫食が

原因とされる食中毒事例に関する疫学解析

調査対象はC銀行の景品が送付された家庭で、調査に協力が得られた家庭とした。症例と対照は下記の定義を満たす者とし、国立感染症研究所感染症情報センターで作成した標準質問票を用いて調査を実施した。

調査方法はA県の保健所及びC市の保健所より研究班で作成した標準調査票を利用し、保健所職員が調査を行った。統計解析は相関係数の算出を Spearman の順位相関係数、喫食及び健康状態が発症のリスクについてはロジスティック回帰分析 (ゼロセルがある場合には全てのセルに1を加算して算出) によりオッズ比 (OR: Odds Ratio) を算出し、クドア摂取量による発症する閾値の推定をモンテカルロシミュレーションにより喫食量 [g] とクドアの汚染度 [個/g] をそれぞれランダムに 10 万回抽出し、乗算し、その分布より 75 パーセンタイル値を閾値として算出することとした。

2. 馬肉喫食による食中毒

1) 食中毒症状を反映する毒性評価法の構築

(1) *S. fayeri* シストのウサギ腸管ループ試験による腸管病原性解析

(a) 試験材料

熊本県保健環境研究所に -40°C で保管中の有症事例由来の馬肉を試験に用いた。馬肉は組織標本を作成し検鏡により、平方センチメートルあたりのシスト数を確認した。

タンパク質分解酵素の作用をみるため、馬肉抽出物に対してペプシン処理を行った。反応後 1 N 水酸化ナトリウム溶液を pH が 7.0 となるように添加し、ペプシン処理試験材料とした。

別の馬肉からシストを取り出し、人工胃液でシスト壁を壊してブラディゾイトを遊出させ、遠心にて回収し、試験材料とした。

(b) ウサギ腸管ループ試験手技

ウサギ(日本在来種、オス、約 1.5 Kg、日本 SLC)に 6~10 cm のループとなるように腸管を結紮した。実験後貯留している内容物の有無とその量を計測した。

2) 食品衛生上実現可能な予防対策の検討

(1) 馬肉の冷凍処理によるシスト(ブラディゾイト)失活の条件検討

(a) シスト含有馬肉の冷凍処理

シストが含まれていることを実体顕微鏡で確認した馬肉を用い、 -20°C 、 -30°C 、 -35°C 、 -40°C 、 -60°C の冷凍庫内に設置した。また、急速冷凍装置内に設置し、 -30°C に冷却した。それぞれの検体から経時的に馬肉を取り出し流水で解凍後、シストを取り出した。

(b) 冷凍処理の効果判定

予め人工胃液(2%ペプシンを含んだ pH 2.0 の溶液) 1 ml を入れたマイクロチューブ内にシストを懸濁した。その後 15 分間 37°C で保温した。反応液を顕微鏡下で観察し、ブラディゾイトが検出されるかどうか確認した。

(c) シスト由来 15 KDa タンパク質への冷凍効果の影響

冷凍処理前後のシストについて、PBS に懸濁後凍結融解を繰り返し、遠心後上清を回収した。常法に従い上清を SDS-電気泳動し、その後ウエスタンブロット法を用いて 15 KDa タンパク質の存在の有無を調べた。PTH アミノ酸の同定がなされた。

C. 研究結果

1. ヒラメの病原物質の毒性評価法の検討

(1) マウスでの投与実験結果

高濃度群は投与後約 10 分で 4 匹すべてが沈鬱となり、体毛が毛羽立ち、心拍数が早くなった。投与後約 1 時間でマウスの元気は回復した。クドアの投与量を増やすことによって血中の G-CSF、KC、SDF の産生量が特に上昇した。JE、IL-16、sICAM-1、Rantes は若干上昇した。

(2) 腸管ループ法

腸管ループ法では、マウス、ラットおよびウサギとも、水分貯留は認められなかった。

(3) スンクスを用いた嘔吐毒性

クドア胞子含有ヒラメの嘔吐反応はクドア胞子の用量依存的反応であることが示唆された。一方 $4-6 \times 10^7/\text{g}$ のクドア胞子を含むヒラメ切り身を -20°C で 1 週間冷凍したものを食べさせた場合には、5 匹すべてで嘔吐反応は見られなかった。

つぎに一匹あたり精製クドア 6×10^7 を経口投与した場合には 2 匹中 2 匹に嘔吐反応が見られた。この反応は -20°C で 1 週間冷凍したヒラメから同じ用量の精製クドア胞子液では反応を起こさなくなった。このことから冷凍により毒性は失活することが示唆された。

(4) 乳のみマウス試験

(a) ヒラメ筋肉から抽出したクドア胞子の種の同定

ヒラメ 4 検体から抽出したクドア胞子の極囊の数は 6 極が主体であった(図 1)。18S rDNA の塩基配列 1,528 bp を解析した結果、*Kudoa septempunctata* の配列と 100% 一致した。ヒラメ筋肉寄生性の *K. septem-punctata*、*K. thyrssites*、*K. lateolabracis* の鑑別 PCR(横山ら、分担報告書)を行ったところ、*K. septempunctata* のみ陽性となった。以上の結果より用いた検体のヒラメ

サンプル中のクドアは *K. septempunctata* であると同定した。

(b) *K. septempunctata* の下痢活性

0.81~1.2×10⁶個の *K. septempunctata* 孢子を乳のみマウスに経口投与した結果、4時間以内に50~100%のマウスが1~4回排便した。4℃保存試験を行った結果、17~24日と保存日数が経過するとマウスの排便率が低下した。投与後4時間後のFA値は、ほとんどのサンプルで有意差は認められなかった。

しかし *K. septempunctata* 孢子 8.1×10⁵個を投与したマウス群では、投与後1.5時間で、FA値は有意に増加した。

K. septempunctata 孢子を10倍階段希釈した場合には陰性対照と有意差は認められなかった。

K. septempunctata 孢子を95℃5分間の加熱処理後に投与したマウス群では、FA値は低く、陰性対照と有意差は認められなかった。

(c) ヒト腸管培養細胞での毒性評価

分化誘導完了後のCaco-2細胞に

精製クドア接種後1時間でTERが接種前の5分の1にまで低下した。-80℃、1週間、凍結を行ったヒラメからクドアを精製し、Caco-2細胞に接種したがTERの低下は認められなかった。また、クドアが培地中に毒素を産生しているかどうかを調べるために、精製クドアをEnterocyte Differentiation Medium中に1×10⁶/ml加え、37℃で18時間培養しこの培養上清でCaco-2細胞を培養したがTERの低下は見られなかった。

(5) クドア属の検出法

(a) 網羅的配列解析結果とRNAを用いたqRT-PCRの確立

網羅配列解析の場合、食材そのもののヒラメDNA/RNAも含んだ状態で解析することになり、混在するコントロール配列の中から候補病原体の混入を検討することになる。ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) のゲノム配列が公開されていないため、本研究では、コントロールサンプルとの比較解析により病原体を探索した。事例ヒラメ・解析リードの80%はヒラメ配列と推定されたが、細

菌・ウイルス配列よりも真核生物 (Eukaryote) に分類される配列が3.3%もあり際立っていた。それらを詳細に分類すると、ミクソゾア門に分類される粘液孢子虫 (Kudoidae) の配列が全体の2.56%に相当し、大量の粘液孢子虫の存在を示唆するデータを得た。粘液孢子虫 *Kudoa* spp. の18S-rRNAのPCR増幅では、SSU1-SSU3の組み合わせは、コントロール・ヒラメ (HIRAME-control) には特異増幅が見られず、事例ヒラメ (HIRAME-0904) に想定された1.1 kbの特異増幅を認めた。ゲルから特徴的なバンドを回収後、キャピラリー法により配列確定し、新規 *Kudoa* sp. の18S-rRNAであることが半明した (後に、*Kudoa septempunctata* として登録される)。

精製RNAを鋳型にした定量的逆転写PCR (qRT-PCR) を行った。*Kudoa* spp. 18S-rRNAの各領域を増幅するプライマーペア *Kudoa*-1~7の内の一つのペアが非特異的増幅もなく良好な検出感度を得られると推測された。

(b) ヒラメの感染状況

18S rRNAリアルタイムPCRおよび顕微鏡所見により事例 (参考品を含む) 46検体を検査したところ、29検体から定量限界以上 (顕微鏡所見では4500孢子/ヒラメg) のクドア属が検出された。その分布は、10⁷/g以上のクドア孢子が検出されたのは6検体、10⁶~10⁷/gのクドア孢子が検出されたのは16検体、10⁵~10⁶/gのクドア孢子が検出されたのは6検体、10⁴~10⁵/gのクドア孢子が検出されたのは1検体であった (表1)。参考品とは、食中毒事例残品であるが、患者が摂食したヒラメとは同体ではないもの、あるいは同じいけすに入っていたものを意味する。

A県の食中毒事例では、患者が摂食した残品そのものは1件も入手出来なかった。そのため、患者宅へ送付された他の半身検体および送付されたが食されなかった同一ロットの検体を収集した。74検体中38検体からクドアが検出され、10⁷/g以上のクドア孢子が検出された検体はなかったが、10⁶~10⁷/gのクドア孢子が検出されたのは19検体、10⁵~10⁶/gのクドア孢子が検出されたのは9検体、10⁴~10⁵/gのクドア孢子が検出されたのは8検体

$10^3 \sim 10^4$ /gのクドア孢子が検出されたのは2検体であった(表2)。この結果からは、食中毒残品のクドア孢子数は不明であるが、患者が喫食したヒラメと同一ロットのヒラメには、頻度高くクドア属が感染していたことが明らかになった。

(c) ヒラメのサンプリング法

クドア孢子感染ヒラメのうち、1グラム当たり100万個以上感染している検体3検体と、10万個以上感染している検体1検体の計4検体を用いて、分布を調べた。

100万個以上感染している検体では部位による相対偏差は21.3%~27.7%であった。一方10万孢子以上汚染しているヒラメ(検体番号4)では平均69.6万孢子が感染しており、部位による相対偏差は54.8%であった。また、採取する部位により、クドア孢子数が検出されない場合もあることがわかった。このことから100万個以上感染している検体では可食部のどこを採取してもクドア属は検出されることが分かった。

(d) DNAを用いたqRT-PCR検査法の確立

*K. septempunctata*の18S rDNAの配列を基に設計したリアルタイムPCRの検出系は、ヒラメ、他のクドア属、腸内細菌等には反応せず、特異的に*K. septempunctata*を検出した。rDNAのコピー数の算出は、サザン・ブロッティング、全塩基配列の平均冗長度等の値から、1個体中の*K. septempunctata*の18S rDNAは約40個と算出された。この値を基に、DNA量から*K. septempunctata*の数量を求めた。

(d) PCR法と顕微鏡検法との相関性と事例検体からの検出

食中毒の原因と推察されるヒラメの中の、*K. septempunctata*の孢子数を、鏡検とリアルタイムPCRで比較した。鏡検で検出できなかった検体を除いた検体の鏡検とリアルタイムPCRの間には $y = 1.017 \times x$ の近似直線が得られた。その相関係数 r は、0.67であった。

この検査法を用いて、患者吐物を検査したところ5検体中、4検体から*K. septempunctata*を検出した。吐物中の*K. septempunctata*の数量は、

原因と考えられるヒラメの中の*K. septempunctata*推定クドア数の約1,000分の1であった。

稚魚からの*K. septempunctata*の検出においてはヒラメの稚魚300匹のうち、1匹(0.33%)から*K. septempunctata*を検出した。18S rDNAの塩基配列を決定し、*K. septempunctata*であることを確認した。飼料からは*K. septempunctata*は検出されなかったが、*Kudoa alliaria*と考えられるクドア属が検出された。

(e) ヒラメに汚染する3種のクドアを鑑別するPCR法の開発と養殖ヒラメの検査

ヒラメの筋肉に寄生するクドア属3種のプライマーを用いたPCRにおいて、対象の種類以外の7種の粘液孢子虫および宿主のDNAに対する交差反応は見られず、種特異性の高さが示された。検出できる最低限界は*K. septempunctata*では100プラスミド/tube(240孢子/g)、*K. thyrssites*では1プラスミド/tube(4孢子/g)、*K. lateolabracis*では100プラスミド/tube(400孢子/g)であった。

この検査法を用いて、10尾のうち5尾で $2.0 \times 10^4 \sim 8.5 \times 10^6$ 孢子/gの寄生が確認された。PCR検査の結果、*K. septempunctata*の検出率は100%であった一方、他の2種は0%だった。

鰓蓋裏の筋肉中の孢子を顕微鏡検査する方法では、10尾中5尾が陽性であり、体側筋肉から孢子を精製して密度を測定する方法で陽性と判定された個体と完全に一致した。

(4) ヒラメ喫食による事例の疫学的解析

ヒラメが原因食であることが強く示唆されるA県で起きた食中毒事例について、詳しく疫学的調査を行った。調査対象者の属性は、発症者が25.3%(59/233)で、男性の発症者が24.0%(23/96)、女性の発症者が26.7%(36/135)であった。年齢階級別の発症割合は20-29歳が42.9%(3/7)で最も高く、次いで60-69歳(30.6%)、70-79歳(28.6%)であった。

症例の潜伏期喫食量、症状年齢、潜伏期の中央値は潜伏期が5.0時間(範囲:1.0-22.0時間)であった。症状は下痢が79.7%(47/59)で最も多

く、次いで嘔吐 (57.6%) の順であった。下痢を呈した者のうち 24 時間以内の下痢回数は中央値が 3.0 回 (範囲: 1.0-20.0 回) であった。喫食量は症例の中央値が 66.7g (範囲: 33.3-300.0g) であった。

ひらめの調理方法は生での喫食 (OR=7.26, 95%CI: 0.95-55.44) のオッズ比が大きかったが、有意ではなかった。また、景品と同封のポン酢の使用 (OR=2.33, 95%CI: 1.27-4.26) は有意に発症していた。

モンテカルロシミュレーションにより喫食量、クドアの汚染度からクドア摂取量を算出すると、発症者の割合を考慮して、クドア摂取量の 75 パーセントイル値を発症用量の目安とし 7.20×10^7 クドア孢子数/人と推定された。

2. 馬肉の病原物質の毒性評価法の検討

1) 馬肉中の *Sarcocystis fayeri* および *S. fayeri* の腸管病原性

S. fayeri のシストを含んだ馬肉ホモジネート、およびその可溶性成分のみとしたホモジネートろ液について、ウサギにおける腸管ループテストを行った。

その結果、馬肉ホモジネートおよびその可溶性画分であるろ液に、腸管毒性が認められることを示し、その毒性はホモジネート原液にのみ保持されていたことが明らかになった。

さらに、腸管ループ反応は馬肉の影響を受けず、馬肉中にシストが存在するときに腸管毒性を示すことも明らかになった。また、シスト中に含まれるペプシン感受性のタンパク質によって、ウサギ腸管毒性が担われていること、その毒性はシストの中に含まれるブラディゾイトに起因する可能性があることを示していた。

1) 接種ループの病理組織像

シストを含んだ馬肉のホモジネートを接種されたループの病理組織像を示す。シストを含んだ馬肉ホモジネートを接種されたループでは、腸管腔内に蓄積された分泌物が顕著であるとともに、分泌物中には壊死した細胞の断片が沢山認められた。腸管上皮細胞は剥離脱落し、腸絨毛が短くな

っていた。筋層から漿膜にかけて水腫性病変が観察された。一方、PBS 接種ループでは病変は見られなかった。

以上の実験から、① *S. fayeri* のシストが馬肉に存在すると、腸管毒性が観察され、毒性成分はシスト内のブラディゾイトが保有し、かつ、タンパク質性の物質であることが考えられた。

2) 食品衛生上実現可能な予防対策の検討

(1) ブラディゾイトへの人工胃液処理時間の検討

予備試験として -20°C で 24 時間保持したシストと、非冷凍処理のシストについて、人工胃液によるブラディゾイトの安定性を調べた。冷蔵状態で保存し、シストを摘出して人工胃液処理した場合、60 分の処理時間でもブラディゾイトは確認された。一方、 -20°C 処理した馬肉からシストを調製した場合には、人工胃液処理時間が長くなるにつれて、ブラディゾイトが確認できなくなった。この結果から、冷凍処理がシスト壁を障害し、ペプシンを含んだ人工胃液の作用を受けやすくなり、胃液の作用がブラディゾイトまで及んだと考えられるため、種々の冷凍条件のシストへの効果の指標として用いることとした。

(a) 各種の冷凍条件の *S. fayeri* シスト/ブラディゾイトへの影響

馬肉片の中心温度が目的の温度に達して、一定時間保持した後、シストを分離して人工胃液処理した。 -20°C および -30°C では、ブラディゾイトの殺滅に 48 時間の保持時間を必要とした。 -35°C までは 24 時間、 -40°C では 18 時間、 -60°C では 12 時間と、冷凍温度が低下するにつれ、ブラディゾイト殺滅に要する保持時間は短くなった。液体窒素中では僅かに 1 時間でブラディゾイトは消失した。

馬肉が共通食となっている食中毒の原因は、*Sarcocystis fayeri* である可能性が高い。患者喫食馬肉には、シストが多量に含まれている。シスト含有馬肉抽出物およびシスト内に含まれるブラディゾイトに腸管毒性が認められた。

D. 考察

1. 病原体及び病原性の推定

(1) ヒラメ喫食により起こる原因不明食中毒の推定病原体及び病原性

超高速シークエンサーを用いた病原因子の網羅的検索を行った結果、事例ヒラメには対照ヒラメと比べ 粘液胞子虫 (クドア属) が有意に多く存在することが明らかになった。さらに遺伝子検査および顕微鏡所見により 60%以上の事例 (参考品を含む) から定量限界以上 (顕微鏡所見では4500胞子/ヒラメg) のクドア属が検出された。4検体であるが、患者吐瀉物からも遺伝的検査法でクドア属が検出された。このクドア属は、平成20年度に行った市場に流通しているヒラメの調査研究で検出された *Kudoa septempunctata* と同一種であった。

以上の結果から、ヒラメを喫食して起こる原因不明食中毒との相関性が高い推定原因物質としてクドア属が考えられた。本食中毒から検出されたクドア属のほとんどは形態的には6つの極嚢を有する *Kudoa septempunctata* であったが、他の種のクドア属の存在も否定できない。

次に *Kudoa septempunctata* の毒性を本研究で確立した動物実験の系で評価した結果、

- マウスに高濃度 (10^7 /一匹) のクドア胞子を含むヒラメ筋肉濾過液を経口投与すると、沈鬱になり、血中の数種サイトカインが亢進した。
- スンクスはクドア胞子 (4×10^7 /一匹以上) を含むヒラメ切り身を直接摂食された場合、および精製クドア胞子 (5×10^7 /一匹) を経口投与した場合に、嘔吐活性が観察された。
- 乳のみマウスは、高濃度 (10^6 /一匹) 精製クドア胞子を経口投与した場合、4時間以内に水溶性排便がおり、投与後 1.5 時間においては対照群に比べ有意に腸管水分貯留が起っていた。
- ヒト腸管細胞培養系の評価法では、精製クドア胞子を絨毛上皮側に負荷した場合、経上皮電気抵抗値の低下がみられた。

以上の毒性評価実験の結果から、クドア胞子は、嘔吐毒性、下痢原性を有することが明らかになった。

(2) 本食中毒の疫学

平成21年5月から平成22年2月までの発症件

数は、冬季に少なく、夏季に多い傾向が見られた。

このことから、本食中毒は季節性があることが示唆された。この傾向を基に、ヒラメの月別出荷量 (東京市場統計)、ヒラメの産地別出荷量 (大阪市場統計) および大分県佐伯市上浦地先の旬海水平均水温と相関性の有無を検討した。

その結果、ヒラメの全国月別出荷量は、12月をピークとして冬季に増えており、発症率とは逆の傾向を示していた (図1)。また、ヒラメ産地別の出荷量においては2年間通年でみても一定の傾向は認められなかった (図2)。一方海水温のピークは8月をピークとしており、発症件数と相関性があることが半明した (図3)。

ヒラメ喫食を原因とする食中毒の症状は、平成22年10月5日から9日に起こったA県における食中毒事例から明らかになった。

潜伏期の中央値 5時間、最小値 1時間、最大値 22時間であった。下痢の回数には中央値 3回、最小値 1回、最大値 20回であった。症状は 発熱 17.1%、嘔吐 50.7%、下痢 81.3%、腹痛 43.8%であった。発症者の100%が生状態で食していた。

2 予防対策について

- 1) クドア属の毒性は、生で、新鮮であるほど強いと考えられる。冷蔵庫保存では徐々にその毒性は減少するが、少なくとも1週間程度保持される。冷凍では毒性が失活するが、その条件は -80°C で1時間、 -30°C で一日が必要である。 $-15^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ での失活に必要な時間は4時間である。
- 2) 海水温の上昇と発症率の上昇が一致していることから、高水温でのクドア数の増加または毒性の活性化の可能性が示唆された。現在クドア感染ヒラメを 16°C と 24°C の条件で飼育し、毒性の比較検討中であり、その結果により低温下での養殖による毒性低減化の可能性が示される。
- 3) ヒラメのクドア属汚染がどの段階で起こるかはまだわかっていないが、少なくとも稚魚を用いたスクリーニングから、稚魚の段階でクドア汚染が確認された。このことから、まず、養殖現場で稚魚を購入する段階で汚染稚魚を排除する

ことが重要な予防対策となりうる。

- 4) 出荷前の養殖場におけるクドア汚染検査も「鰓蓋裏の筋肉を用いた簡易診断法」により可能である。ロットごとのクドア汚染検査のサンプリングプランを確立すれば、クドアフリーのロットが特定でき、有効な予防対策となる。
- 5) pHの変化による毒性の低減化は認められなかったため、昆布巻き、酢漬け等の加工条件はあまり期待できない。

3 検査法

- 1) 食中毒事例を対象とした検査法：ヒラメの食中毒事例のクドアを検出するための試験法として、DNA およびRNA を用いた定量リアルタイムPCRを開発した。検量線作成のためのテンプレートを作成した。確認試験は、顕微鏡鏡検を行い、形態的に判断する。
- 2) 養殖場での検査：ヒラメに寄生する3種のクドア属を識別できるコンベンションPCRを開発した。簡易法として鰓蓋裏の筋肉を用いた簡易診断法を開発した。

これらの結果から、クドア属および*S. fayeri*は発症させるのに相当量の汚染が必要であること、その毒性には用量依存性があることがいえる。すなわち、検査法により、ある程度汚染したヒラメおよび馬肉を検出し、排除することにより、これらの危害物質による健康被害は防止することが出来ると考える。そのためには、ヒラメ養殖場でのクドア属の管理が非常に重要となる。

馬肉においても、屠畜場での検査を徹底させることで、感染量の高いものを排除することは可能であると考えられる。

冷凍処理、加熱処理がクドア属の毒性を失活させる手段となりうるということが明らかになったが、ヒラメの商品価値を著しく低下させる可能性が高いため、養殖場でのクドア属汚染のモニタリングが有効であると考えられる。今後実情に即した予防対策を数多く提案し、その毒性を評価していく必要があると考える。

E. 結論

生鮮ヒラメを喫食することにより起こる原因不明食中毒の推定原因病原体は、本研究で構築した実験動物系およびヒト腸管細胞培養系で毒性評価を行なった結果、クドア属 (*Kudoa septempunctata*) である可能性が強く示唆された。また、平成22年10月にA県で起こった食中毒事例においてヒラメが原因食品と考えられ、その事例からもクドア属が頻度高く検出されたことから、原因病原体であることが示唆された。

馬肉を喫食することにより起こる原因不明食中毒は、馬肉中の *Sarcocystis fayeri* である可能性が高いことが示唆された。

毒性として、クドア属では嘔吐および下痢原性が実験動物およびヒト腸管培養細胞で評価できることが明らかになった。*S. fayeri*は、ウサギにおいて下痢原性が確認された。両者とも、その毒性には用量依存性があり、極めて多量な量が発症には必要であることが示唆された。

予防対策としては、両者とも冷凍することによりその毒性がなくなることが示されたが、クドア属の本食中毒の発生時期が夏季に集中していること、水温と発生件数に相関性があることから、低温において発生を阻止する効果がある可能性が考えられた。また、検出法も養殖場で実施できる方法を確立したことから、稚魚および出荷前の検査によって、クドア感染ヒラメを排除する方策も有効であると考えられた。

*S. fayeri*も汚染濃度が高い個体を判別する検査法を確立したことから、屠殺場での検査により、汚染濃度を検査し、感染の多いものだけを冷凍することも有効であると考えられた。

F. 研究業績

原著論文

1. Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y. and Yoshiko Sugita-Konishi, Y., : *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from anaquacultured olive flounder

(*Paralichthys olivaceus*) imported from
Korea, *Parasitology Research*, 107.
865-8872 (2010)

2. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y,
Sugita-Konishi Y. *Kudoa iwatai* and two novel
Kudoa spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni*
n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from
daily consumed marine fish in western Japan.
Parasitol Res. 108. 913-926 (2010)

表1 A県事例以外の食中毒事例残品(参考品も含む)中のクドア胞子含有ヒラメのクドア分布

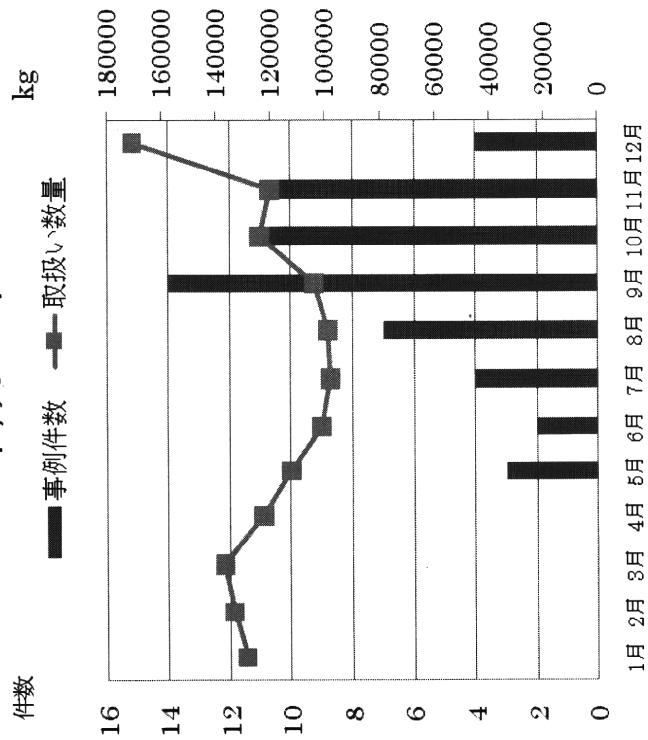
クドア胞子数	検体数	全検体に占める比率
$>10^7$	6	13.0
10^6-10^7	16	34.8
10^5-10^6	6	13.0
10^4-10^5	1	2.2
10^3-10^4	0	0.0
$<10^3$	17	37.0

参考品とは、患者が喫食したものではないヒラメまたは、同じいけすのヒラメを意味する

表2 A県事例品と同一ロットヒラメ中のクドア胞子分布

クドア胞子数	検体数	全検体に占める比率
$>10^7$	0	0.0
10^6-10^7	19	25.7
10^5-10^6	9	12.2
10^4-10^5	8	10.8
10^3-10^4	2	2.7
$<10^3$	36	48.6

平成21年



平成22年

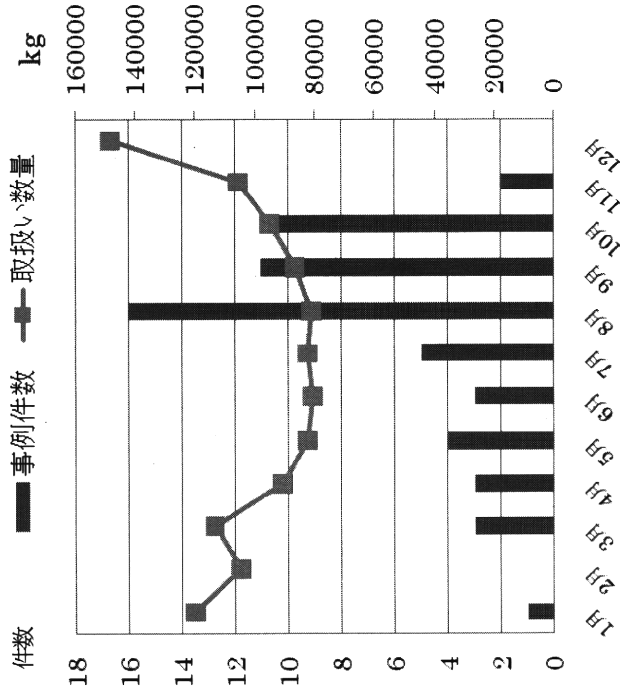


図1. ヒラメ喫食を原因とする食中毒発症件数と取扱い数量の月別変化

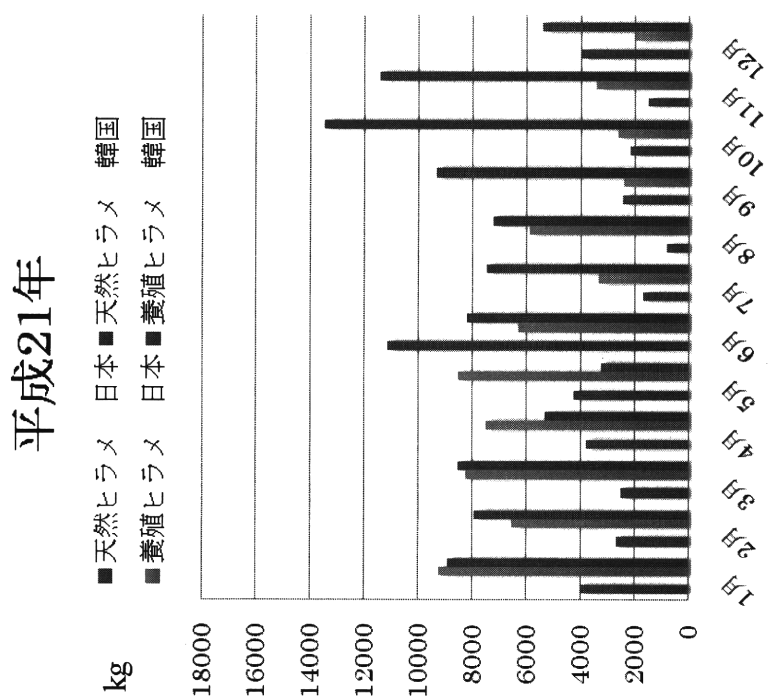
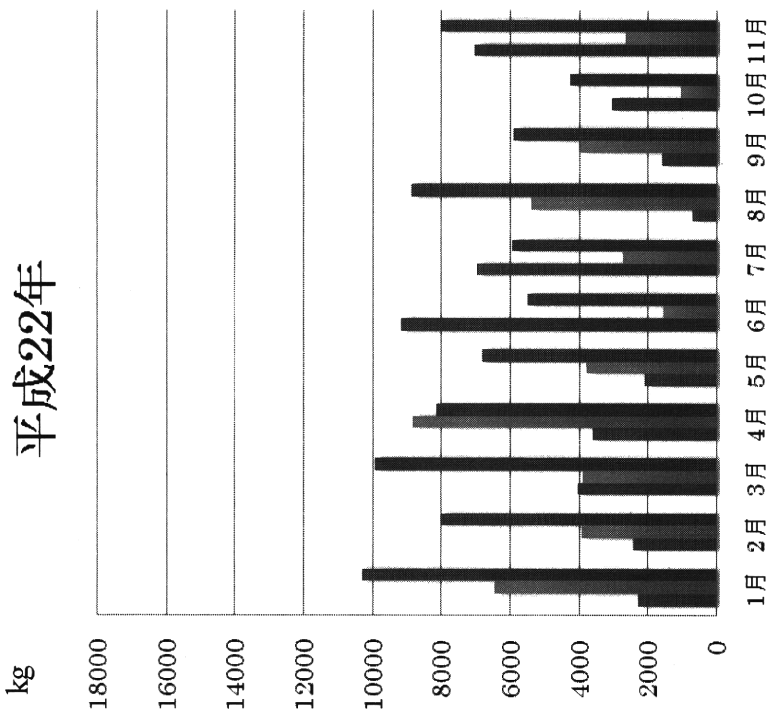


図2. ヒラメ喫食を原因とする食中毒発症件数とヒラメ産地別取り扱い数量の月別変化

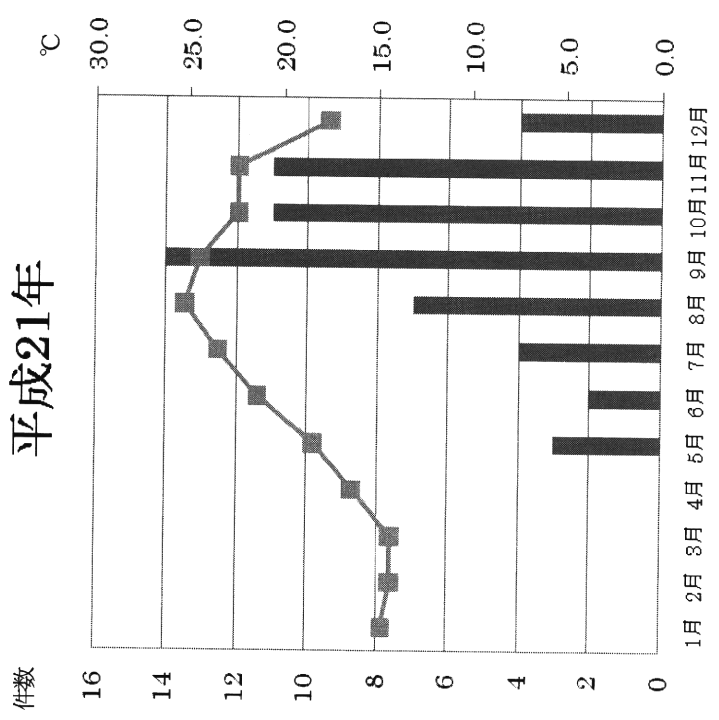
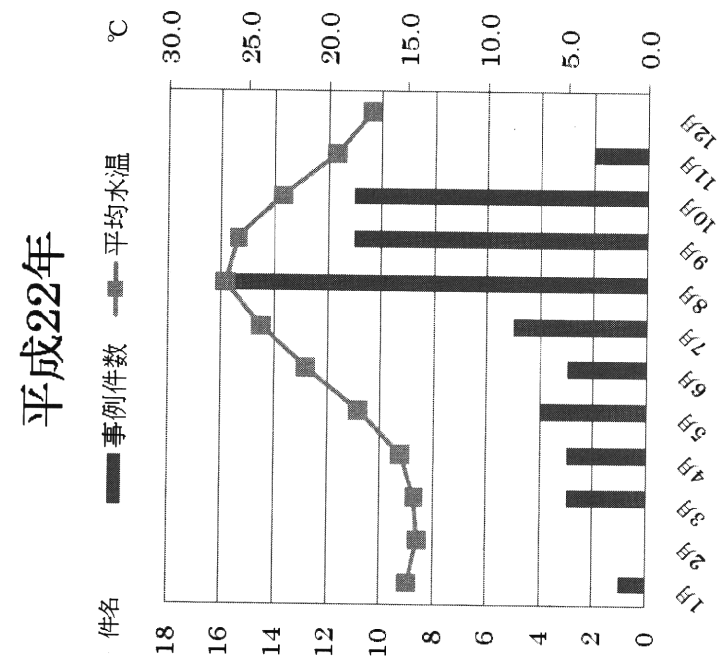


図3～. ヒラメ喫食を原因とする食中毒発症件数と海水温の月別変化

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

実験動物を用いたヒラメに寄生するクドア属の嘔吐毒性評価

分担研究報告

研究分担者 小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

研究協力者 福田 穰 大分県農林水産研究指導センター水産研究部

要旨

生鮮魚介類を共通食材とし、一過性の嘔吐下痢を主症状とする原因不明食中毒が近年増加している。いままでの研究調査から、1) 生鮮魚介類を共通食材とする原因不明食中毒事例では、ヒラメが提供されている例が極めて多いこと、2) 網羅的DNA解析手法により、食中毒事例ヒラメから大量のクドア属寄生虫DNAが検出されたこと、3) 入手出来る食中毒事例残品から、クドア属寄生虫DNAが有意に高く検出されたこと、などから、食中毒ヒラメに寄生するクドア属がその原因物質の一つであることが推察されている。しかしながら、ヒトにおける症状を裏付ける毒性は証明されていなかった。そこで本研究では、マウス等の実験動物およびヒト嘔吐モデル動物であるスunksを用いて、その毒性を検討した。

その結果、マウスでは沈鬱症状および血中サイトカインの上昇が観察され、スunksでは高濃度クドア胞子を摂取または経口投与した場合には嘔吐活性が観察され、その活性には用量依存性が見られた。スunksおよび乳のみマウスは、本食中毒症状の毒性評価系として有効であること、クドア属には嘔吐毒性があることが示唆された。

A. 研究目的

平成15年から、瀬戸内地方を中心に、生鮮魚介類を生食した場合に、摂取後2-12時間以内に嘔吐・下痢を主症状とした食中毒が起こることが報告されている。この食中毒は一過性であり、24-48時間以内に回復するため、重篤な食中毒にはならない。また、事例検体から既知の食中毒菌や、有害物質、ウイルス等が検出されないことから、原因不明として処理せざるをえなかった。

しかしながら、平成19年度から着手された倉敷市保健所を中心とする厚労省 地域保健総合推進事業において、調査の結果、本食中毒は全国的な

広がりを呈していることが明らかになった。

厚労省では、平成20年度から、食品等試験検査費により、生食用魚介類を共通食とする原因不明食中毒原因物質調査を進めてきている。

そこで、本研究では、マウス、ラット、ウサギ、スunks、乳のみマウスを用いた *in vivo* 毒性評価法を構築することを目的とした。

B. 研究方法

(1) クドア胞子の計測および精製法

平成21年7月から、各自治体に本症例に当てはまる食中毒事例の残品であるヒラメを冷凍で送付してもらうように呼びかけ毒性実験を行っていた