

図9 サイトカラシンDによる孢子原形質の細胞侵入阻害

(A) サイトカラシン非添加 (B) サイトカラシン添加 (2 μ M)

1 : Caco-2 細胞 2 : 孢子 3 : 孢子原形質

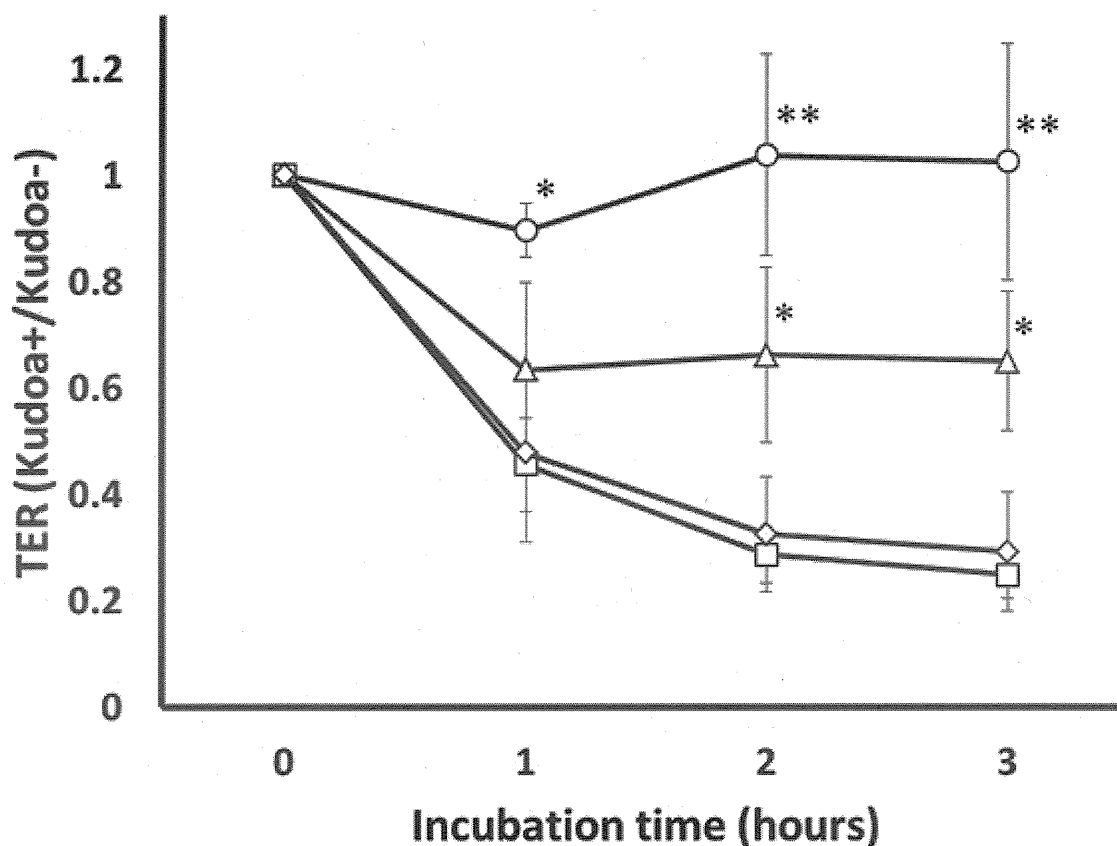


図 10 孢子原形質の細胞侵入による TER 低下に対するサイトカラシン D の影響
K. septempunctata 孢子を様々な濃度のサイトカラシン D (2 μM, ○), (0.2 μM, △), (0.02 μM, □) or DMSO (◇) と共に接種した。結果は孢子を接種した細胞の TER と孢子を接種していない細胞の TER との比で表した (平均 ± SD、n=3)。*, P < 0.05; **, P < 0.01 vs. DMSO (Student's t test).

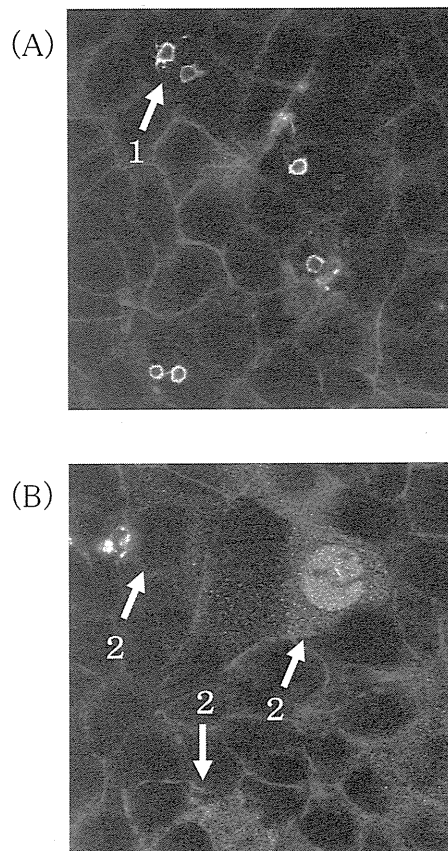


図 11 孢子原形質の分解

Caco-2 細胞に孢子を接種し、1 時間 (A)、2 時間 (B) 後に細胞を抗 *K. septempunctata* 血清と反応させた。

分 担 研 究 報 告 書

ザルコシスティスおよびクドアセプテンpunkタタの
予防対策に関する研究

小西 良子

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明
研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

ザルコシスティスおよびクドアセプテンpunkタタの予防対策に関する研究

研究分担者 小西 良子（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 菊池 裕（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）
研究協力者 古沢 博子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）
研究協力者 峰岸 恭孝（(株) ニッポンジーン）
研究協力者 福田 穰（大分県農林水産研究指導センター）
研究協力者 乙竹 充（(独) 水産総合研究センター）

喫食後短時間で発症し下痢、嘔吐を主症状とする新規食中毒の原因物質としてヒラメに寄生するクドアセプテンpunkタタおよび馬肉に寄生するザルコシスティスである可能性が最も高い。本研究では、これら食中毒の予防を目標に、1) クドアセプテンpunkタタの出現頻度 2) 毒性と飼育温度との関係、3) クドアセプテンpunkタタおよびザルコシスティスフェアリーの迅速検出法の開発 4) クドアセプテンpunkタタ喫食のサルへの影響を行った。クドアセプテンpunkタタの感染率の高い養殖場における同寄生虫の保有率を8ヶ月間毎週10尾ずつ観察した結果、その検出頻度は20-80%までのばらつきがあり、特に 5×10^7 乗以上のクドア胞子が寄生するヒラメの検出率は0-30%の確立で出現することが明らかになった。また、夏から秋にかけて食中毒が発生することから、水温と毒性との相関性を検討した結果、水温上昇による毒化現象は確認できなかった。食品衛生管理に必要な迅速検査法の確立のため免疫抗体法の開発を検討した。抗クドアセプテンpunkタタ抗体はクドアセプテンpunkタタ孢子ソニケート全物質を抗原としてニワトリを用いて作成した。作成したIgY抗体はクドアセプテンpunkタタに特異的で有り、ELISA法やイムノクロマト法などの迅速測定法に使用できる可能が示唆された。抗ザルコシスティス抗体は、ザルコシスティスフェアリーのソニケート全物質を抗原にウサギを用いて作成した。作成したIgG抗体は高い力価を示し、イムノクロマト法に使用できる可能が示唆された。さらにクドアセプテンpunkタタの毒性をサルを用いて検討した結果、サルに対しては1頭当たり 8×10^9 クドア胞子を経口投与した場合には毒性がないことを証明した。

A. 研究目的

近年増加傾向にある、即時的で下痢嘔吐を主症状とする食中毒は、ヒラメ中のクドアセプテンpunkタタおよび馬肉中のザルコシステイスフェアリーを推定病原物質とすることを厚労省が発表した。それを受けて、本研究では予防対策の策定を目的に、クドアセプテンpunkタタの寄生頻度の調査、水温と毒性の関係、食品衛生管理のための検査法の確立、サルにおける毒性の検証を検討した。

B. 研究方法

1. *kudoa* 感染ヒラメのクドア数の変動

kudoa 感染ヒラメを飼育している大分県 T 業者から、ほぼ毎週提供されたヒラメを用いて、その頻度と孢子数を測定した。

2. *kudoa* 孢子の精製

Kudoa 感染ヒラメの筋肉を定量採取し、200 μ m のメッシュで裁断、濾過した後、100 μ m のメッシュでさらに濾過し、1500 rpm X 10 分 10 度の条件で遠心した。沈殿を 10-30 %のグラジエントパーコールにより遠心し、クドア孢子を精製した。

3. *kudoa* 孢子の下痢原性の評価

kudoa 孢子の下痢原性は、ヒト腸管培養細胞 (Caco-2 細胞) の経上皮電気抵抗値 (TER、 Ω) の低下で評価した。

BD BioCoat 腸上皮細胞分化エンバイロメント (BD 社製) を用いて、Caco-2 細胞を培養し、3 日後 TER (Ω) が 800 以上を示した細胞を用いて、 10^7 /mL に定容した精製し

たクドア孢子を Caco-2 細胞の apical 側に加えた。1 時間後に TER を測定した。

4. 抗体作成

1) 抗クドアセプテンpunkタタ抗体の作成

抗クドアセプテンpunkタタ抗体はクドアセプテンpunkタタ孢子ソニケート全物質を抗原としてニワトリを用いて作成した。作成した IgY 抗体は *Kudoa septempunctata* のニワトリ抗血清を Hitrap IgY カラムで精製し、IgY 精製画分を取得した。

2) 抗ザルコシステイスフェアリー抗体の作成

ザルコシステイスフェアリーのソニケート全物質を抗原にウサギを用いて作成した。得られたウサギ抗血清を Hitrap Protein G カラムで精製し、IgG 精製画分を取得した。この精製画分を SDS-PAGE で確認したところ IgG のバンドを確認した。

3) 抗クドアセプテンpunkタタ抗体および抗ザルコシステイスフェアリー抗体のイムノクロマト法

テストストリップタイプ (図 1 参照) 金コロイド、イムノクロマト部材、添加試薬類はニッポンジーン社製品を使用した。4-1), 2) で精製した抗ニワトリクドアセプテンpunkタタ IgY ポリクローナル抗体および抗ウサギザルコシステイスフェアリー IgG 抗体を用いて、メンブレンへの固相化と金コロイドへの標識を行った。さらに必須となるイムノクロマト用の各部材を組み合わせ、テストストリップを作製した (図 1 参照)

5. サルを用いた喫食実験 *Kudoa*

4×10⁸ /head 胞子含有ヒラメ筋肉濾過液 (100 μm mesh) を 10mL PBS 溶液として調整後、カニクイザル (体重 3.45–5.75 kg、♂) に食餌 30 分後それぞれ胃カテーテルにて投与して 24 時間観察した。その間に採取した糞の *Kudoa* 胞子をリアルタイム PCR で測定した。

C. 研究結果

1. クドアセプテンpunkタタの出現頻度

図 2 に同じロットの感染ヒラメを用い 8 ヶ月間、ほぼ毎週クドア胞子数を測定した結果を示した。毎回 5 尾から 10 尾のヒラメを用いてクドア胞子数を顕微鏡法で計測し、その感染率を算出した。また、クドア数が 500 万個以上の感染魚の確立も算出した。その結果クドア胞子が確認されたヒラメは 20%から 80 %の確立で検出され、この程度のサンプル数であると、そのばらつきは非常に大きいことが明らかとなった。その中でも 500 万個以上の感染魚が検出される確率は 0%から 30 %であり、感染率からは、感染胞子数の高いヒラメの検出頻度は予測できないことが明らかになった。また、季節間 (1 月から 8 月まで) において、感染率の差は認められなかった。

2. 毒性と飼育温度との相関性

飼育水温度とその下痢原性について検討するために、クドア感染が確認されているロットのヒラメを 80 尾ずつ飼育水温 16 度と 24 度の 2 グループに分け、約 3 ヶ月間飼育をした。毎回ヒラメから筋肉を採取し、

顕微鏡法によりクドア胞子数を測定した。

図 3 で示したように、飼育水温によるクドア胞子の感染率の変化は認められなかった。さらに Caco2 細胞の TER の変化によりその下痢原性を調べたところ、16°C飼育区においても TER 値が 20 %から 40 %と低い値を示したことから、その毒性が保たれていたことが示唆された。24°C飼育区においては、TER 値がやや高い傾向が見られたが 16°C飼育区との有意差は認められなかった。これらの結果から、水温とクドアの下痢原性の毒化には相関性は認められなかった。

3. クドアセプテンpunkタタおよびザルコシスティス フェアリーの迅速検出法の開発

1) 抗クドアセプテンpunkタタ抗体

抗クドアセプテンpunkタタ抗体は、マウスでの作成が成功しなかったことから、ニワトリを用いてクドアセプテンpunkタタのソニケートを抗原として IgY ポリクローナル抗体を作成した。得られた IgY 抗体は タイなどに寄生する *Kudoa iwatai* やマダラに寄生するクドア ネオチュニーに交差反応がないことが確かめられた。

2) イムノクロマト法

Tween 20 含 PBS で希釈調製した 10⁶ 個/mL のクドア抗原試料を図 1 に示したテストストリップへ 150 μL/test アプライし、15 分後、30 分後において判定ライン部を観察したが 着色は認められなかった。なお、確認試験として抗ニワトリ IgY 抗体をテストストリップへアプライしたところ、判

定ライン部に着色が認められた。この結果よりニワトリ IgY ポリクローナル抗体のメンブレンへの固相化と金コロイドへの標識は問題なく行われていたと判断された。

抗原となるクドアセプトンククタタ胞子を以下の前処理をして、抗体との反応性を検討した。

① 10^7 個/mL 胞子懸濁液 30 μ L を Bioruptor (出力 H、30 秒 \times 10 回) で超音波破碎

② 10^7 個/mL 胞子懸濁液 30 μ L を Bioruptor (出力 H、30 秒 \times 30 回) で超音波破碎

③ 10^6 個/mL 胞子懸濁液 300 μ L ヘビーズを添加し FastPrep-24 (最高出力 1 分 \times 2 回) で破碎し遠心分離

前処理した抗原が少量だったため、ここでは各条件で前処理した抗原をメンブレンへスポットしたテストストリップを用いて、金コロイド標識したニワトリ IgY ポリクローナル抗体と固相化した抗原との反応性を評価した。スポットした抗原の種類を表 1 に示した。

表 1 に示した抗原をスポットしたテストストリップへ展開試料として PBST を 150 μ L/test アプライした。その結果、15 分時点で VI の抗原で僅かながらスポット部に着色が認められた。それ以外の抗原では着色は認められなかった。

3) 抗ザルコシステイス フェアリー抗体

抗ザルコシステイス フェアリー抗体は、ウサギにザルコシステイス フェアリーのブラディゾイドソニケートを抗原として免役しウサギ IgG ポリクローナル抗体を作成

した。

4) イムノクロマト法

ブラディゾイド溶液を PBST で 3~96 倍に希釈調製した試料を、それぞれテストストリップへ 150 μ L/test アプライした。その結果、何れの試料も 15 分後、30 分後において判定ライン部に着色は認められなかった。

なお、確認試験として抗ウサギ IgG 山羊抗体をテストストリップへアプライしたところ、判定ライン部に着色が認められた。この結果よりウサギ IgG ポリクローナル抗体のメンブレンへの固相化と金コロイドへの標識は問題なく行われていたと判断した。抗原の凍結融解液の前処理法として凍結融解液について、下記の条件で試料調製を行った。

①凍結融解液 30 μ L を Bioruptor (出力 H、30 秒 \times 10 回) で超音波破碎

②凍結融解液 30 μ L を Bioruptor (出力 H、30 秒 \times 30 回) で超音波破碎

③凍結融解液 300 μ L ヘビーズを添加し FastPrep-24 (最高出力 1 分 \times 2 回) で破碎し遠心分離

各条件で前処理した抗原をメンブレンへスポットしたテストストリップ (図 2 参照) を用いて、金コロイド標識したウサギ IgG ポリクローナル抗体と固相化した抗原との反応性を評価した。スポットした抗原の種類を表 2 に示した。

表 2 に示した抗原をスポットしたテストストリップへ展開試料として PBST を 150 μ L/test アプライした。その結果、スポ

ット部において陽性対象(PC)では濃い着色が確認され、Ⅰ～Ⅲで弱い着色が認められた。さらにⅣでも僅かながら着色が認められた。この結果を受けてⅠ～ⅢについてⅣと同じ抗原濃度になるようにPBSで10倍希釈し、これらを2で試作したテストストリップで試験を行った。

その結果表2に示したⅠ～Ⅲの10倍希釈液およびⅣにおいて、判定ライン部に着色が認められた(図5黒矢印)。10分後の着色の濃淡は濃い順にⅢ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅳとなった。またⅠとⅡの抗原を供したテストストリップにおいて、金コロイドコンジュゲートが顕著に凝集している様子が観察された(図5赤矢印)。一方、ⅢとⅣの抗原ではこのような顕著な凝集は確認されなかった。これらで観察された様子から、ⅠやⅡのように未処理の状態や超音波破碎が不十分だと不溶化したままの抗原が多く残存し、それがメンブレンに目詰まりしたと考えられる。そこへ金コロイドコンジュゲートが凝集し、結果としてライン部の着色がⅢよりも弱かったと考えられた。またⅢと同様に顕著な凝集がなかったⅣについては、ビーズによる磨砕が不十分で残存した *Sarcocystis fayeri* が遠心分離で沈殿物として除去されたため凝集が少なく、その結果として抗原の可溶化も不十分だったため判定ライン部の着色がⅢに比べて弱かったと考えられた。

4. クドアセプテンpunkタタ喫食のサルへの影響

Kudoa 胞子 8×10^8 /head 含有ヒラメ筋肉濾過液を摂食させた2匹とも陰性であった。平成23年度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」においてすでに陰性であることを報告しているため、本実験では省略した。これらの結果から、クドアセプテンpunkタタはサルに対しては感受性が低いことが示された。

D. 考察

ヒラメの喫食により起こる食中毒は8月から11月をピークとして発生するが、その原因はまだわかっていない。そこで、この食中毒の病因物質として推定されているクドアセプテンpunkタタの寄生数が夏に多くなるか、また、水温によりクドアセプテンpunkタタの寄生率およびその毒性が変化するかどうかを検討した。1月から8月までほぼ1週間おきに養殖場からクドア感染率の高いロットのヒラメを購入し、クドア数と感染魚の比率を測定した結果、季節による感染率の増加は認められず、かつクドア数の顕著な増加も認められなかった。さらにこの結果から、養殖場の同ロットから限られた数(5-10匹)のヒラメを採取しても、その感染率には大きなばらつきがあることも明らかになり、養殖場における感染率の検査に信頼性をもたせるには、ある程度の匹数が必要であることが示唆された。

食中毒の多い8月から11月までは、海の水温は20度を超える。さらに9月には水温は約24度まで達する(1)。そこで、低水

温(16度)と高水温(24度)飼育による寄生率およびその毒性を、それぞれの水槽を設置し、約3ヶ月間連続飼育して検討した。その結果、水温によるクドアセプトンクタタの寄生率には顕著な差異が認められなかった。さらに、生きたクドアはCaco-2細胞の経上皮抵抗性を低下させる性質を持つことを利用して(1)、その毒性を評価したところ、寄生率同様、水温による差異は認められなかった。すなわち、高水温は、寄生率の上昇や毒性強化の要因にならない可能性が強く示唆された。今後季節性を左右する要因を明らかにしていく必要がある。

次に食品衛生検査を強化するための免疫迅速検査法の開発を行った。現在本食中毒の予防対策の一環として、クドアセプトンクタタ感染ヒラメの防除が養殖場で試みられている。まず稚魚において感染しているロットは養殖場に入れないこと、次に、養殖場からの出荷時の適正な検査により感染魚を排除することである。稚魚を対象とするクドアセプトンクタタの検査にはリアルタイムPCR法が用いられているが、その検査には特別な装置とコストがかかる。出荷時の検査においては顕微鏡検査法が用いられているが、それには多大な時間と労働力が費やされ、かつばらつきも大きいとの報告もある。これらの短所を解決するには、低コストでかつ高価な機器を必要としない免疫学的迅速検査法の開発が考えられる。我々は、クドアセプトンクタタのソニケート溶液を作成し、ニワトリに免疫

しすでに抗血清を得ていることから(2)、これを用いて、免疫クロマト法を開発した。この抗血清はソニケート溶液によく反応することから、試料として提供するヒラメをあらかじめソニケートする必要がある。しかし、ソニケートを出力30秒×10回行った方が30回おこなったときより良好な結果が得られたことから、その程度にも免疫反応の差異が出てくることが示唆された。

馬肉を喫食して起こる食中毒ではザルコシステイスがその病因物質と推定され(3)、検査法が通知されたが(4)、顕微鏡検査でザルコシステイスと同定するにはある程度の技術の習得が必要である。一方比較的技術習得が必要ない手法であるPCR法では高価な機器等が必要となってくる。そこで、検査をより正確、簡便化するために免疫学的検査法の開発を試みた。抗ザルコシステイス抗体はウサギで作成し、免疫クロマト法への応用を検討した。抗ザルコシステイス抗体もザルコシステイス内のブラディゾイド(感染子虫)をソニケートして作成したため、反応性を高めるために馬肉においてもソニケートする必要があることが示唆された。今後は検体をソニケートしなくてもよい反応抗体を作成する必要がある。

ヒラメ喫食による食中毒の病因物質がクドアセプトンクタタであることを他の実験動物で確認する目的で、サルを用いた摂食実験を行った。一匹当たり4億胞子を投与した結果、下痢、嘔吐の症状は確認で

きなかった。この結果から、サルにおいては本食中毒症状は呈さないことが示された。今までにもこのような例は、コレラや腸管出血性大腸菌食中毒においても観察されており、この結果はクドアに対する感受性の違いであると考えられたい。

E. 結論

本研究は、ヒラメ喫食によって起こる食中毒の病原物質と推定されるクドアセプテンpunkタタと馬刺し喫食によって起こる食中毒の病原物質と推定されるザルコシスティス フェアリーを対象に、予防対策に有効な知見を明らかにしたものである。まずヒラメ喫食によって起こる食中毒が晩夏から初秋にかけて発生率が高くなる事実から、同時期のクドアセプテンpunkタタのヒラメ内での感染率を検討したが、冬期との有意差はみられなかった。毒性への水温の影響を、冬期平均水温(16度)と晩夏平均水温(24度)で飼育したヒラメを用いて検討したが、顕著な差異はみられなかった。これらのことから、水温上昇がの発生率を上昇させる要因ではないことが考えられた。

次にそれぞれの寄生虫をクドアセプテンpunkタタを認識する抗体を用いて免疫迅速試験法を開発した。抗体はソニケートしたそれぞれの抗原により作成した。

その結果、抗原となる病因物質が生の状態では認識されにくく、ソニケートすることにより認識度が高くなる可能性が示唆された。このことから、実用性を高めるためにはソニケート処理なしで高い反応性を示す

抗体を作成することが必要であることが示唆された。

クドアセプテンpunkタタの毒性をサルで確かめるため、一匹当たり4億胞子を経口投与した結果、無症状であったことが確認された。このことからサルにおいてはクドア食中毒への感受性が非常に低いことが示唆された。

F. 参考文献

1. 平成 22 年度 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」 報告書
2. 平成 22 年度 厚労省食品等試験費 「生食用生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒病因物質調査」 報告書
3. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長、*Sarcocystis fayeri* の検査法について(暫定版):食安監発 0823 第 1 号
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/>.
4. 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会、食中毒部会、乳肉水産食品部会:生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例についての提言
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000001fz6e-att/2r9852000001fz18.pdf>.

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

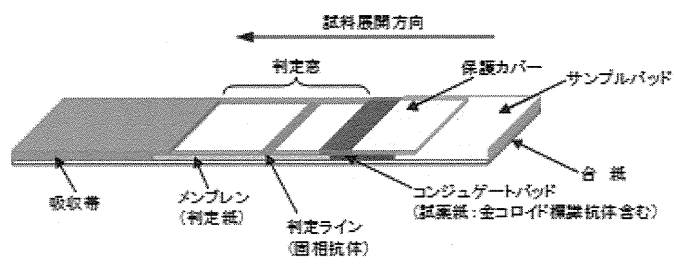


図1. テストストリップ概略図

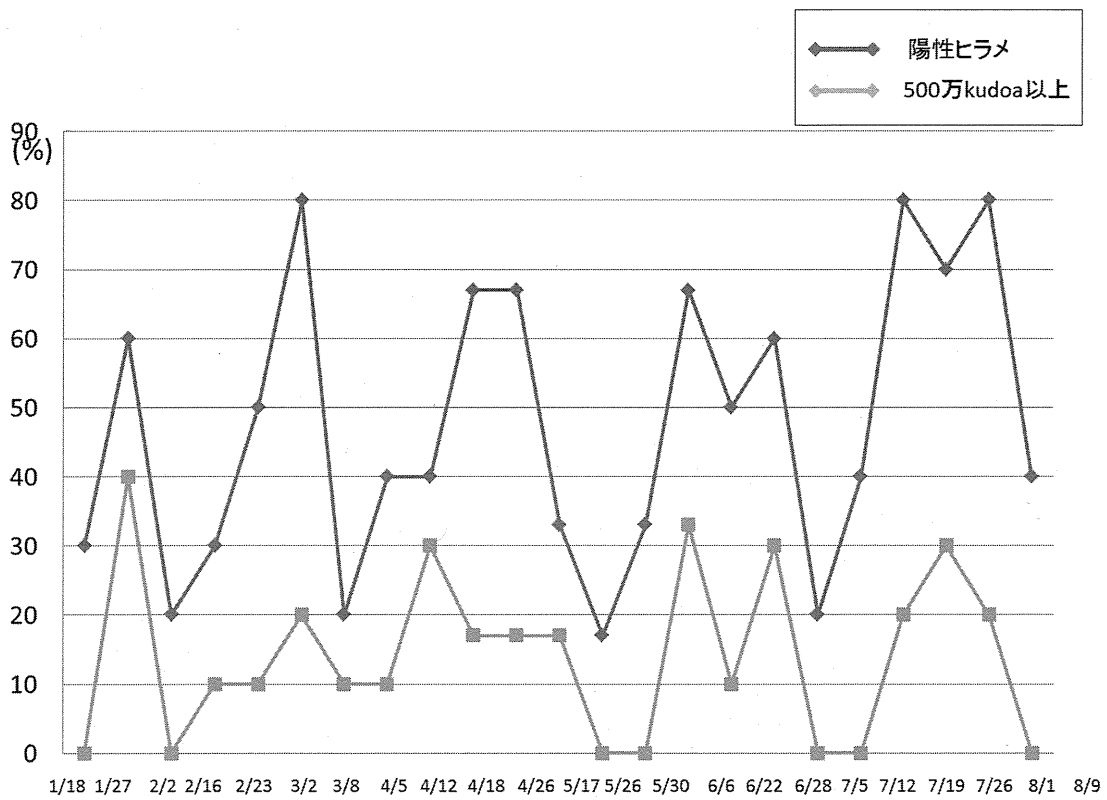


図2. 養殖場で飼育したヒラメのグダア検出頻度の変動

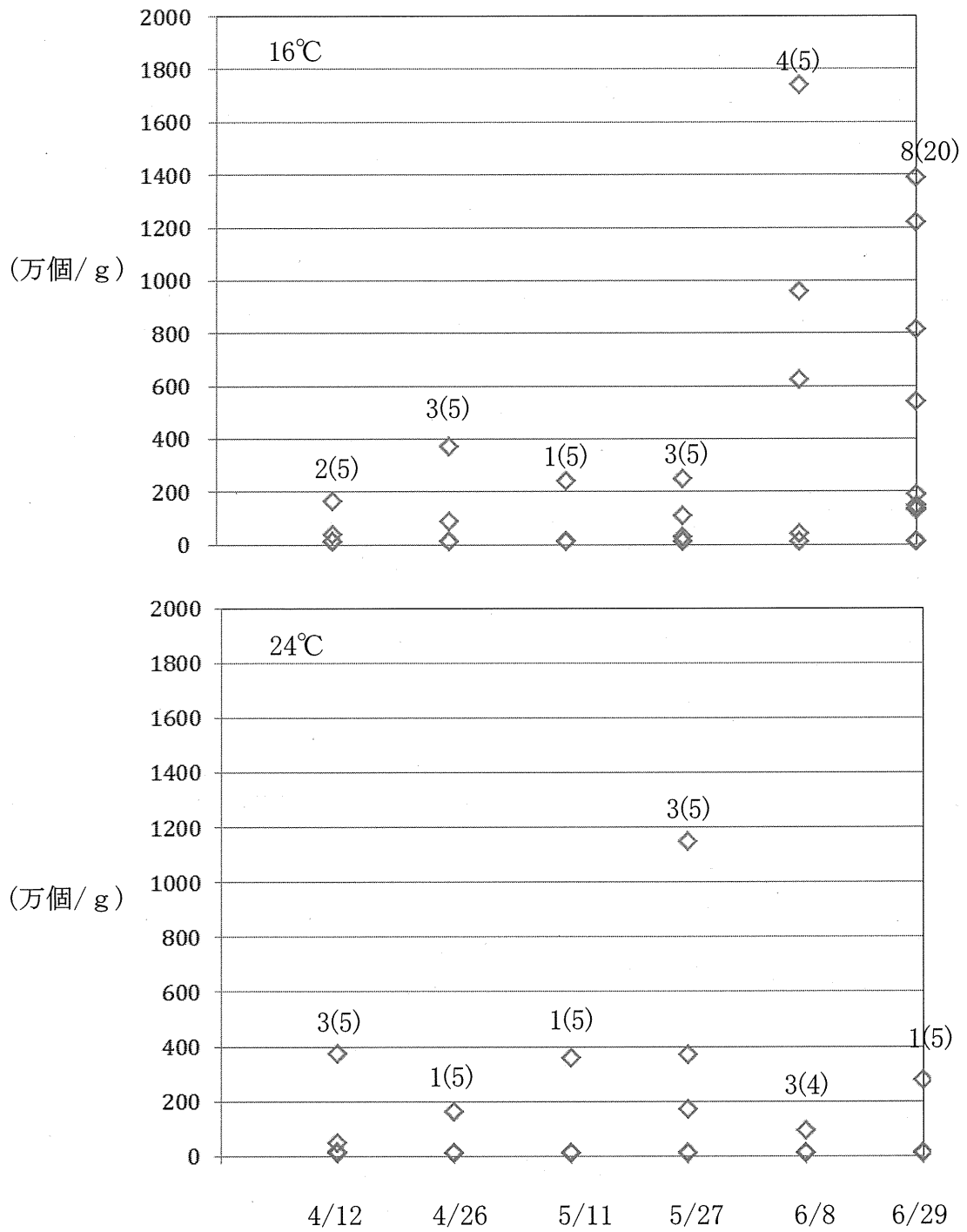


図3. 飼育水温によるクドア数の変化

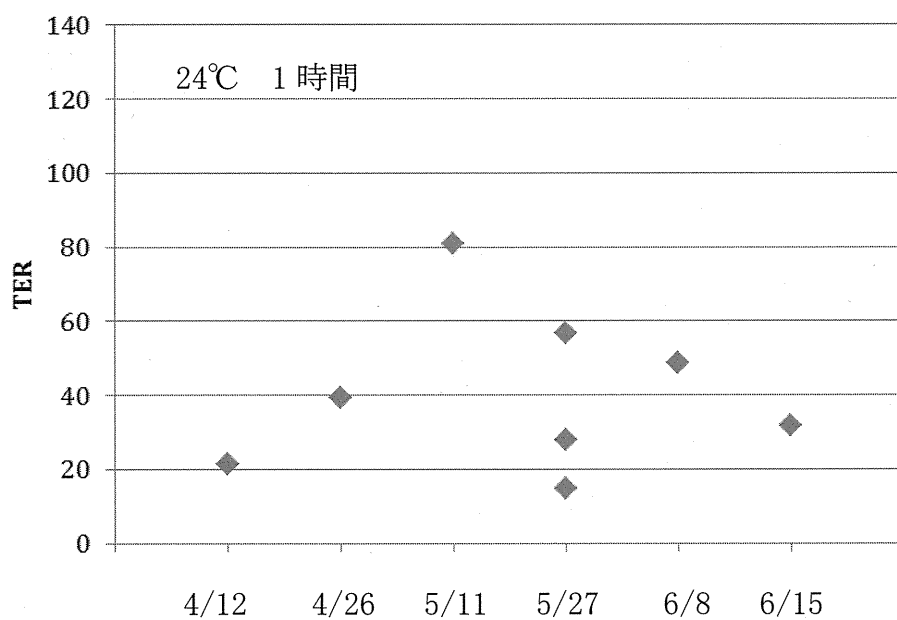
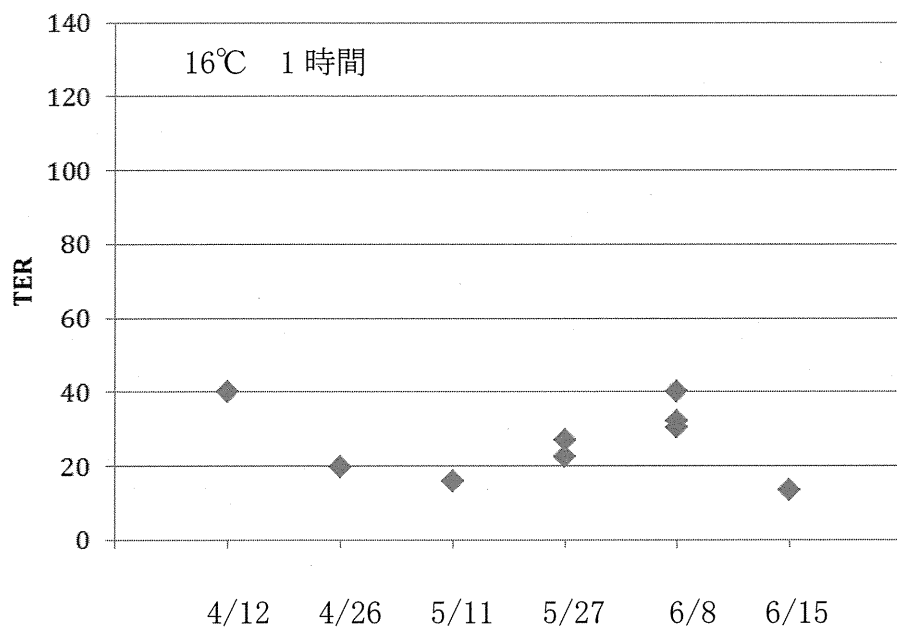


図4. 飼育水温別クドアの毒性変化(Caco-2)

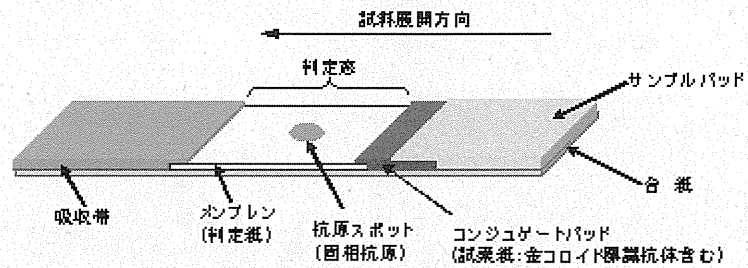


表 1. メンブレンへスポットした抗原

抗原	孢子懸濁液の状態	抗原濃度	前処理条件
I	Intact	原液	未処理
II	Sonicated	原液	未処理
III	Intact	原液	2) -①
IV	Sonicated	原液	2) -①
V	Intact	原液	2) -②
VI	Sonicated	原液	2) -②
VII	Intact	10倍希釈液(PBS)	2) -③
VIII	Sonicated	10倍希釈液(PBS)	2) -③
N.C.		50%グリセリン/PBS	

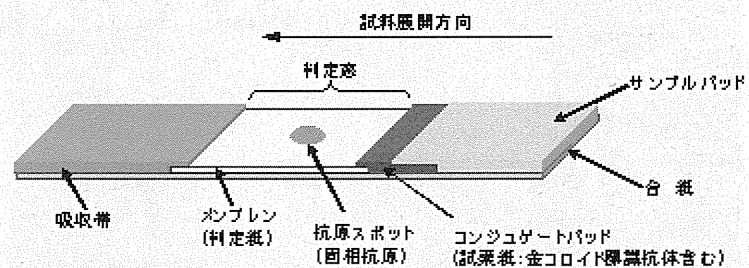


表2 メンブレンへスポットした抗原

抗原	抗原濃度	前処理条件
I	原液	未処理
II	原液	4) -①
III	原液	4) -②
IV	10倍希釈液(PBS)	4) -③
PC	抗ウサギ IgG 山羊抗体	
NC	PBS	

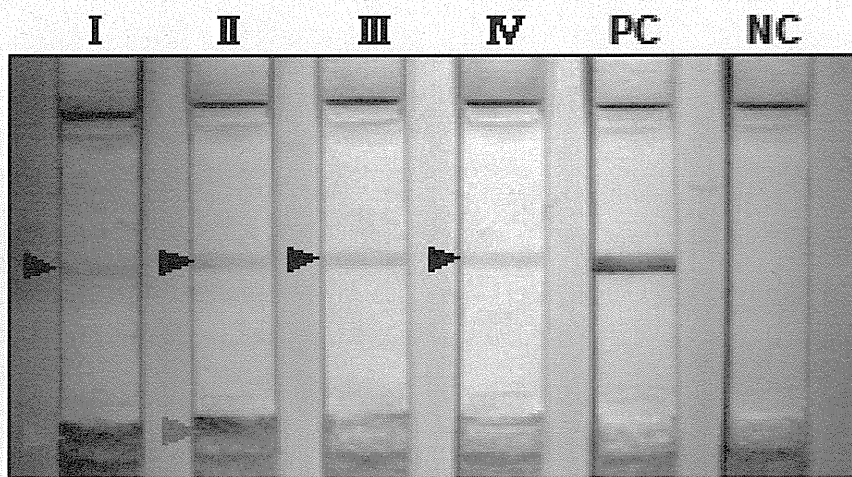


図5 抗ザルコシステイス抗体を用いたイムノクロマト法

I : 抗原 I の 10 倍希釈液

II : 抗原 II の 10 倍希釈液

III : 抗原 III の 10 倍希釈液

IV : 抗原 IV

陽性対象 (PC) : 抗ウサギ IgG 山羊抗体

陰性対象 (NC) : PBS

I ~ IV 何れも 165.5 万ブラディゾイド/mL 相当品を 150 μ L/test アプライ

分 担 研 究 報 告 書

- I. 乳のみマウスを用いた *Kudoa septempunctata* 胞子の
下痢原性に関する研究
- II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法によるヒラメからの
K. septempunctata 検出法の開発研究

久米田 裕子

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

分担研究報告書

- I. 乳のみマウスを用いた *Kudoa septempunctata* 孢子の下痢原性に関する研究
II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法によるヒラメからの *K. septempunctata* 検出法の開発研究

研究分担者 久米田裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

協力研究者 河合 高生（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

協力研究者 原田 哲也（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

平成 15 年から増加しているヒラメを共通食とする原因不明食中毒について、これまでの調査研究により *Kudoa* 属粘液孢子虫の *Kudoa septempunctata* が原因物質の一つであることが明らかとなった。本年度は、昨年度構築した乳のみマウスを用いた *K. septempunctata* 孢子の下痢原性評価法を使用し、pH の変化や加熱・凍結などの不活化処理に対して *K. septempunctata* 孢子の腸管内液体貯留活性が消失するか否かを調べた。同時に、細胞の生死判定に使用される染色液であるトリパンブルーで *K. septempunctata* 孢子を染色した結果、*K. septempunctata* 孢子が腸管内液体貯留活性を示すには、トリパンブルー色素排除能を有する、いわゆる「生きた」孢子が必要であると考えられた。

また、ヒラメには *K. lateolabracis* や *K. thyrsites* など他種の *Kudoa* 属粘液孢子虫が寄生することが知られているため、*K. septempunctata* の同定にはこれらの種との鑑別が重要である。さらに、ヒトの発症には少なくとも 10^6 個/g 以上の孢子が必要と推測されていることから、喫食残品のヒラメからの *K. septempunctata* の検出およびヒラメの安全性の評価には定量性も重要である。そこで、本年度は、食中毒の喫食残品のヒラメから *K. septempunctata* を特異的に検出できる定量リアルタイム PCR (QPCR) 法を開発することを試みた。その結果、感度、定量性、特異性、繰り返し精度および再現性においてすべて良好な QPCR 法を開発できた。検出限界値は、18S rDNA コピー数で約 10 コピー/反応であり、 10^6 個/g 以上の孢子感染が確認されたヒラメ検体では、検体採取部位による定量性への影響は認められなかった。

A. 研究目的

平成 22 年度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」の報告書において、平成
15 年から増加している生鮮魚介類、