

A. 研究目的

K. septempunctata が寄生するヒラメの生食により嘔吐・下痢が起こることは、疫学的に明らかであり、細胞や動物の実験からも裏付けられている。しかし、*K. septempunctata* が消化器のどこでどのように作用して食中毒を引き起こすかについての細胞生物学的な機序は未解明である。解明の基盤を整えるために、本研究では *K. septempunctata* のゲノム解読を目的とした。全遺伝子の一覧が作れば、*K. septempunctata* の表面タンパク質や分泌タンパク質の解析を効率的に行うことができる。

K. septempunctata が属する粘液胞子虫については、ゲノムが全く解読されていない。その進化系統的位位置については二説ある。左右相称動物とする説は、核のリボソーム RNA 遺伝子配列から支持されており、刺胞動物とする説は、幾つかのハウスキーピング遺伝子と形態的類似性により支持されている。*K. septempunctata* のゲノム配列を他の生物と比較することにより、粘液胞子虫の系統的位位置も解明できる。

B. 研究方法

1. 核酸配列解読

食中毒事例で残されたヒラメ刺身片から *K. septempunctata* を抽出し、DNA と RNA を精製した。次世代シーケンサ Illumina GAIIx を用いて、DNA および、RNA の相補的 DNA を配列解読した。ABYSS プログラムを用いて、ミトコンドリアゲノムの

配列をアセンブルした。BWA 及び samtools プログラムを用いて、解読した RNA をミトコンドリアゲノム配列に対してマッピングした。

2. 遺伝子解析

タンパク遺伝子の候補を網羅的に抽出し、SSEARCH プログラムにより既知遺伝子と配列比較することにより、タンパク遺伝子を決定した。リボソーム RNA 遺伝子については、解読した RNA のマッピングと配列比較により決定した。転移 RNA 遺伝子は、tRNAscan-SE, DOGMA, Rfam, BLAST プログラムで検索した。

3. 系統解析

ミトコンドリアゲノム上の遺伝子のそれぞれについて、他の後生動物の配列を DDBJ/EMBL/NCBI から取得し、MAFFT プログラムにより多重アライメントを行った。系統解析には PhyloBayes プログラムを用いた。

C. 研究結果

K. septempunctata は、19425 bp の環状ミトコンドリア DNA を持っていた。タンパク遺伝子としては、cytochrome c oxidase subunits I, II (*COX1*, *COX2*), cytochrome b (*CYTB*), NADH dehydrogenase subunits 1, 5 (*ND1*, *ND5*) の 5 つが存在した (図 1)。大小のリボソーム RNA 遺伝子は高い RNA 転写量から明確に識別できた。転移 RNA 遺伝子は検出できなかった。

ミトコンドリアの 5 つのタンパク質のアミノ酸配列について、系統解析を行ったと

ころ、後生動物は大きく二つ、左右相称動物とそれ以外（刺胞動物・板形動物・海綿動物）に分類できた（図2）。左右相称動物は、さらに新口動物と旧口動物に分類でき、*K. septempunctata* は後者に属した。従って、粘液胞子虫の起源については、刺胞動物説ではなく、左右相称動物説を支持する結果となった。

D. 考察

本年度のミトコンドリアゲノム解読は、*K. septempunctata* の検出系に応用できる。ミトコンドリアゲノムのコピー数は、核ゲノムの約300倍と高コピーであるため、高感度のPCR検査系の開発が期待できる。これにより、夾雑物の多い便検体などでも *K. septempunctata* が検出し易くなるかもしれない。

また、高精度の検出系の開発にも応用できる。*Kudoa* 属には様々な種があり、様々な魚に寄生している。適切な検査をするためには、食中毒を起こす種のみでの判定が必要である。今回解読した *K. septempunctata* の配列を足がかりにすれば、*Kudoa* 属の他種の配列も比較的容易に解読できる。その配列の異同をもとに、種特異的なPCR検査系が開発できる。

次年度の核ゲノム解読が実現すれば、応用として、食中毒の機序の解明のみならず、*K. septempunctata* の発達段階に応じた検査系の開発も期待できる。例えば、孢子状態の *K. septempunctata* は食中毒を起こすが、原形質状態のものは起こさないとし

た場合、前者のみの検出系が望ましいことになる。核ゲノム解読により、*K. septempunctata* の表面タンパク質の候補を絞り込み、孢子状態の表層タンパク質が同定できれば、孢子状態のみを検出する抗体キットも開発可能になると期待される。研究を行っていきたい。

E. 結論

K. septempunctata のミトコンドリアゲノムは退化しており、5つのタンパク質と2つのリボソームRNAの遺伝子しかなかった。遺伝子系統解析により、*K. septempunctata* を含む粘液胞子虫は、左右相称動物に属することが分かった。核ゲノムの解読は次年度に行う予定である。*K. septempunctata* のゲノム解読により、食中毒の機序の解明とともに、高感度・高精度の検出系の開発が期待できる。

F. 研究発表

・論文発表

1. T. Kawai *et al.*, 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 (Apr, 2012)

・講演・シンポジウム発表

1. 第81回日本寄生虫学会大会シンポジウム講演「新下痢原性寄生虫クドアの発見」
(平成23年3月23日)

G. 健康危害情報

なし

図1. (A) *K. septempunctata* ミトコンドリアの遺伝子。 (B) 解読RNAのミトコンドリアゲノムへのマッピング。横軸はゲノム配列での位置、縦軸はマップされた解読配列の深さ。大小サブユニットリボソームRNAの遺伝子は、豊富なRNA量から明確に認識できる。

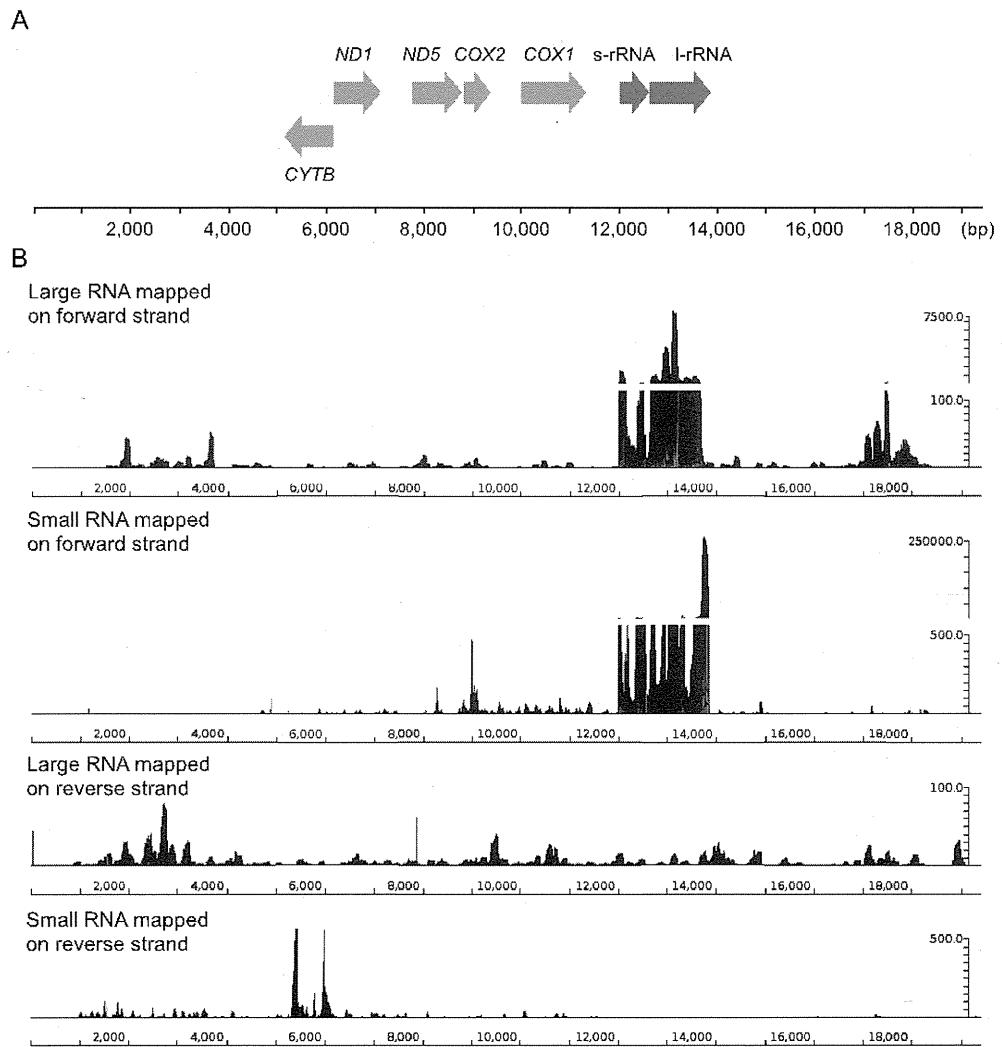
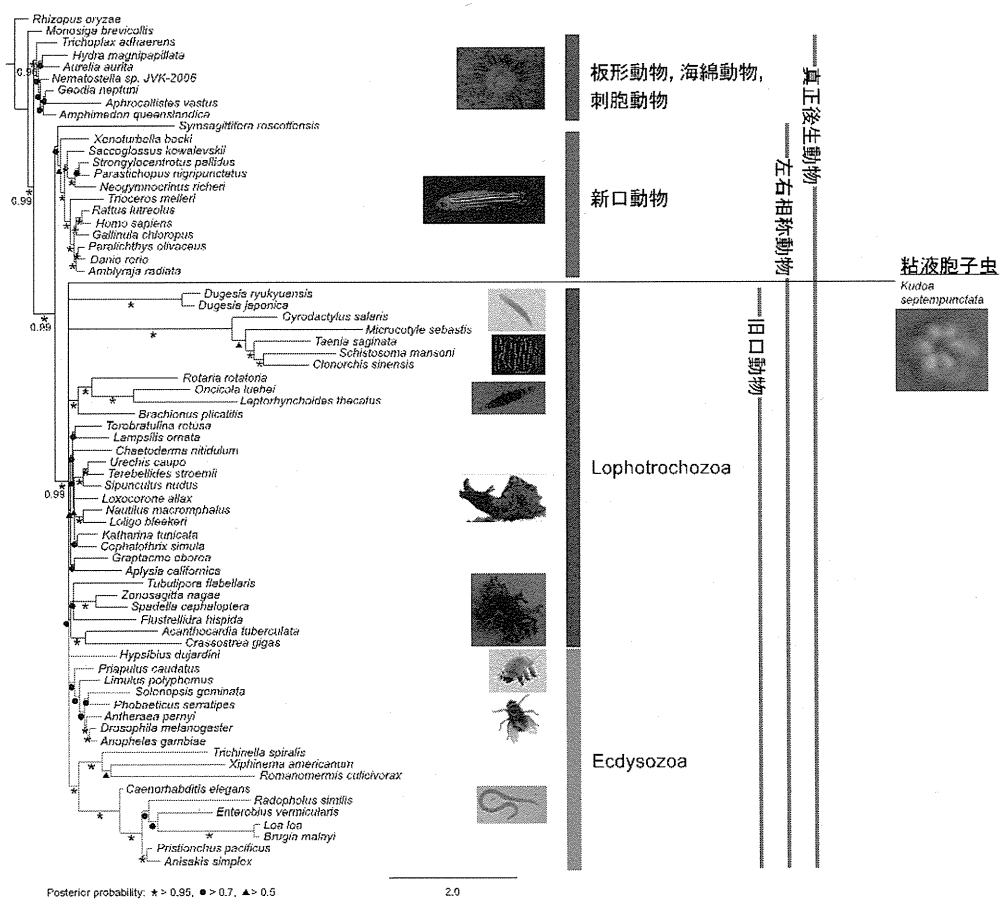


図2. ミトコンドリアの5つのタンパク遺伝子による後生動物の系統樹。系統樹中のそれぞれの枝について、事後確率が記号で示されている。粘液胞子虫の左右相称動物への帰属が強く支持されている。渦虫類と緩歩動物の写真はバイオサイエンスデータベースセンターより転載。



分 担 研 究 報 告 書

ヒラメの喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

八幡 裕一郎

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

ヒラメの喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討
研究分担者 八幡裕一郎（国立感染症研究所感染症情報センター）

Kudoa Septempunctata（クドア）が寄生したヒラメを喫食し消化器症状を呈した事例について発生状況の把握を行った。把握はベースラインデータの収集（地域、産地、季節等の検討のため）、臨床像の検討として症状、潜伏期、症例定義等の検討、発症のリスク因子、予防因子の検討を行うことを目的とした。対象はクドアが寄生したヒラメを喫食し、原因不明食中毒として厚生労働省に報告があった事例で、食中毒速報に掲載された事例および標準調査票を用いて調査した事例より検討した。クドアが寄生したヒラメを喫食した事例はピークが9月であった。標準調査票による調査では、潜伏期の中央値は5.0時間で、範囲は1.8-15.0時間であった。相関分析では潜伏期は症例定義に合致した症例では喫食量が多いと潜伏期が短かった ($r=-0.531$)。ヒラメの個体の仕入日別に発症を検討したところ、仕入日よりヒラメの喫食が発症に有意に関連が異なっていた。仕入れ日で調整したオッズ比は22.7（95%信頼区間：2.3-221.3）でクドアに汚染されたヒラメの喫食が有意に発症と関連していた。クドアに汚染されたヒラメは9月がピークであったが、3年間のデータをもとにベースラインを検討する必要がある。症例定義は消化器症状（下痢、または嘔吐）を呈した時とすると、これまでの食中毒調査で利用されてきた症例定義と比べ精度の高い潜伏期となった。喫食量が多いと潜伏期が短くなり、クドアに汚染されたヒラメの喫食が発症と関連していた。また、仕入日別で調整したオッズ比がクドアに汚染されたヒラメの喫食で発症と関連しており、ロットによるクドア汚染の違いが考えられた。クドアの汚染を出来るだけ少なくすることが対策として考えられた。

A. 研究目的

これまでヒラメを喫食し、原因不明食中毒として西日本を中心に報告されてきた。しかしながら、発生についての季節性、ベースライン、臨床像、リスク因子、予防因子につ

いての検討は十分なされていない。

本研究の目的は *Kucoa Septempunctata*（クドア）が寄生したヒラメを喫食した食中毒の1）発生状況把握として地域、産地、季節等の検討のためのベースラインデータの収集、

2) 臨床像の検討として症状、潜伏期、症例定義等の検討、3) 発症のリスク因子、予防因子の検討を行った。

B. 研究方法

方法は発生状況の把握として原因不明食中毒として自治体から厚生労働省へ報告された食中毒速報の情報を収集し、発生の分布を検討した。臨床像の検討はヒラメを喫食しクドアの寄生が確認された事例について標準的(資料1)な調査票を作成し、自治体での調査した情報をもとにした。症例はヒラメを喫食し、何らかの消化器症状(下痢、腹痛、嘔吐、嘔気など)を呈した者とし、症例定義を検討することとした。発症時間は消化器症状のうち症状を呈する割合の高い症状を症例定義の候補として検討することとした。潜伏期等の分布については事例ごとに検討することとした。喫食量と発症の両反応関係の検討は Spearman の相関係数を算出した。クドアが寄生したヒラメの喫食と発症との関連はオッズ比を算出し、ロット別による調整オッズ比と Mantel-Haenszel カイ二乗検定を行った。

C. 研究結果

発生状況はヒラメを喫食し原因不明食中毒として速報で報告された報告数は9月にピークがあった(図1)。発生場所は西日本を中心に発生していた(図2)。特に瀬戸内海周辺の自治体からの報告が多かった。北日本は散発的な発生であった。発症者数は

中央値が9人(範囲:1-67人)で、喫食者数のうち発症者は中央値が49.3%(範囲:5.0-100.0%)であった(表1)。食中毒速報で情報が得られた事例から得られた性別は男が267人中105人(39.3%)で、年齢階級は男女合わせた場合60-69歳が29.6%で最も多く、次いで50-59歳(19.5%)であった。性別では男性の60-69歳が23.8%で最も多く、次いで30-39歳(21.9%)であった。女性では60-69歳(33.3%)で最も多く、次いで50-59歳(22.2%)であった(表2)。検討に利用した事例の対象者は対照群の性別が女で56.5%(13/23)、男で43.5%(11/18)であった(表3)。症例が喫食量と潜伏期の相関係数は $r=-0.531$ であった(表4)。仕入れ別での相関係数は -0.866 であった。ヒラメの仕入れ別の発症の調整オッズ比は22.7(95%信頼区間:2.3-221.3)で、Mantel-Haenszel カイ二乗検定が $P<0.001$ で有意であった(表5)。

D. 考察

ピークは9月でありその前後の月である7月および8月がクドアに汚染されたヒラメを喫食した者の消化器症状を呈する食中毒発生報告数が多かった。9月がピークであったが、発生報告は約1年分のデータを収集しただけであり、通常サーベイランスデータのベースラインとしては3年程度の情報収集を行い、ベースラインを検討する¹⁾。今後、更に2年分のデータを収集し、3年間のベースラインを決定し、発生時期の

ピークの有無や多発期の把握等を行い、今後の対策等に反映できることを期待している。

性別、年齢、治療中の疾患の有無、アレルギーの有無での症例発生に差はなかった。宿主側の要因による発症は考えられなかった。

症例定義に合致した症例からの潜伏期は中央値が5.0時間で、範囲が1.8-8.0時間であった。従来の食中毒調査では、症例が何らかの症状が出た場合を発症時間と定義しており、この方法で算出した潜伏期は中央値が5.0時間で範囲が1.8-15.0時間であった。このうち、潜伏期が15.0時間であった症例の症状は発熱のみであり、本研究で設定した症例定義に合致しなかった。このような者を除くと潜伏期は正規分布が仮定できた。本研究で採用した症例定義を採用した消化器疾患を呈した時刻を発症時刻とすることが妥当であると考えられた。従って、ヒラメにクドアが寄生していた場合の症例定義は消化器症状のみに絞ることが適切であると考えられた。

喫食量と潜伏期を検討したところ、相関係数が-0.531で、喫食量が多いと潜伏期間が短くなっていた。クドアによる汚染度については検討出来なかったが、クドアの汚染量が多いと症状を早く呈することが考えられた。

仕入れ日別に喫食と発症割合の差を比較したところ、仕入れ日が違う事で喫食者の発症に差があることが考えられた。汚染は

個体による差があることが考えられ、クドアに汚染度が高いヒラメの個体を喫食した場合には有意に発症し、汚染度の低いヒラメを喫食した場合は有意な発症はないと考えられた。従って、個体の汚染が発症の因子となる事が考えられた。汚染度の低いヒラメの流通をすることがクドアによる汚染の発生を予防する要因であると考えられた。

E. 参考文献

1. Lisa M. Lee, Steven M. Teutsch, Stephen B. Thacker, Michael E. St. Louis. Principles and Practice of Public Health Surveillance 3rd edition. 2010; Oxford University Press, USA.

F. 研究発表

・論文発表

1. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, et al. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw. Clin Infect Dis (in press).

G. 謝辞

本研究の調査ご協力いただきました地方自治の本庁並びに保健所の関係各位に厚く御礼申し上げます。

H. 健康危険情報

厚生労働省からの情報収集等のため既に

厚生労働省が把握済みである。

I. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

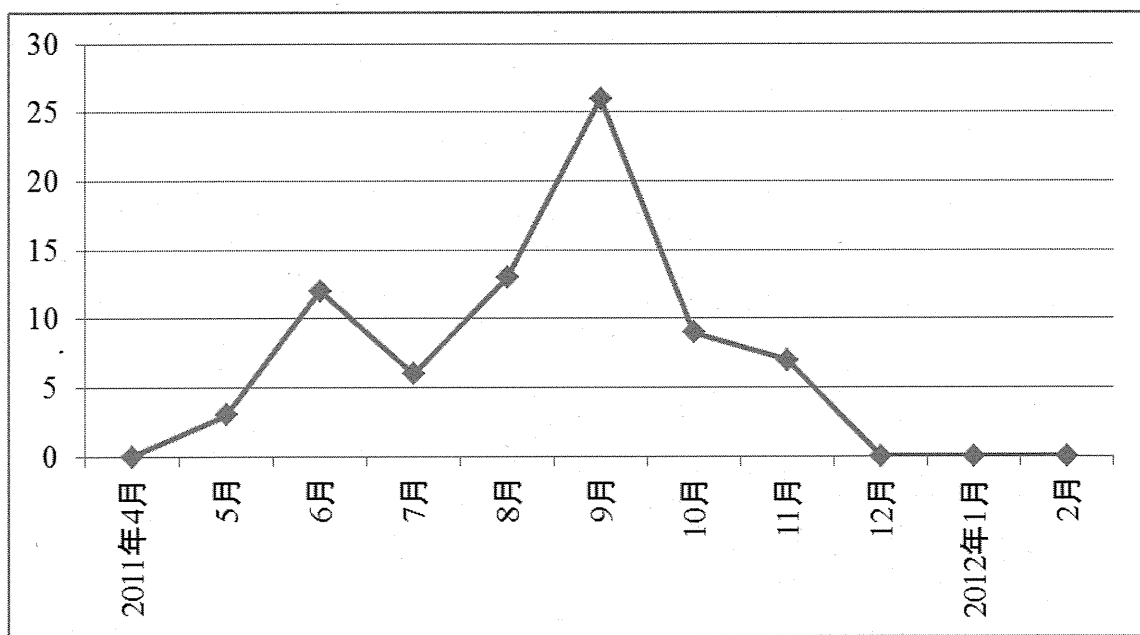


图 1. 原因不明食中毒報告数 (2011 年 4 月-2012 年 2 月)

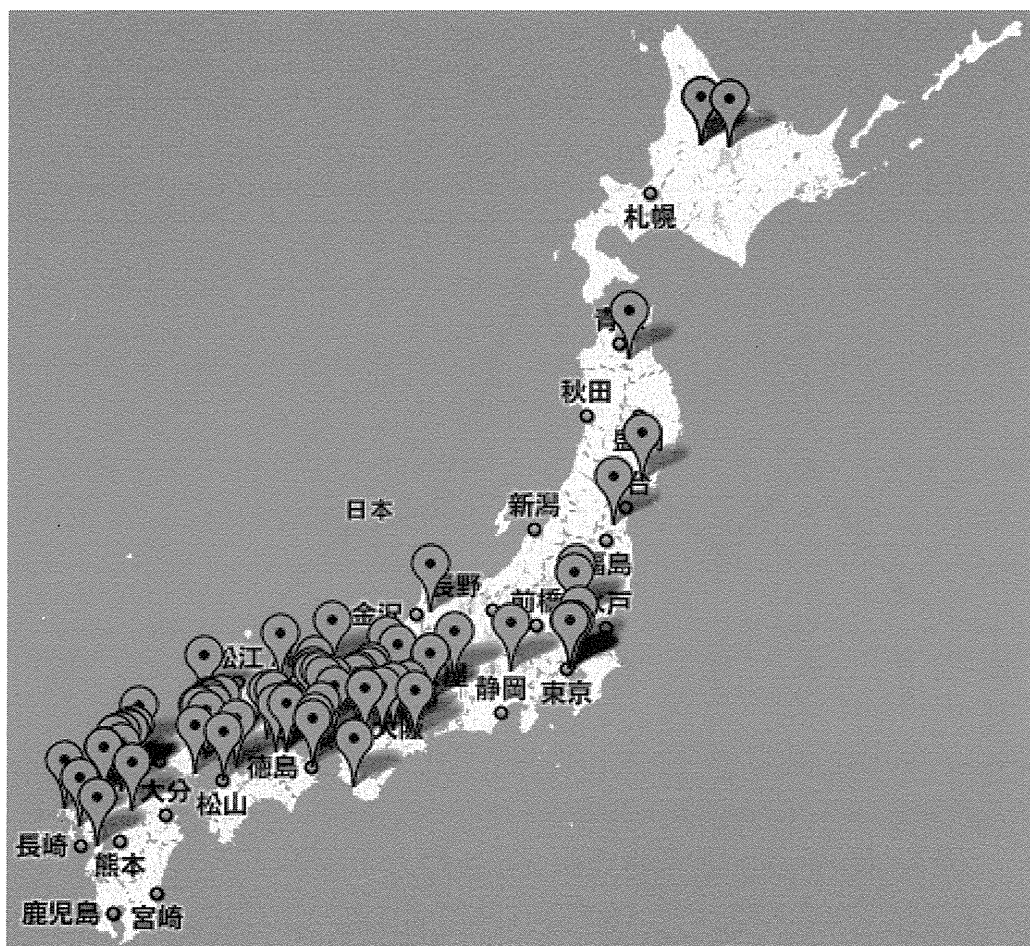


図2. ヒラメ喫食後の原因不明食中毒発生場所 (2011年4月-2012年2月)

表 1. 喫食者の発症割合 (2011 年 4 月-2012 年 2 月)

	合計	中央値	範囲
発症者数 (人)	769	9	1-67
喫食者数 (人)	2302	21	1-359
発 症 割 合 (%)	33.4	49.3	5.0-100.0

表 2. 食中毒速報に報告された事例の性年齢階級別分布 (2011 年 4 月-2012 年 2 月)

	男		女		合計	
	人	%	人	%	人	%
0-9 歳	2	1.9	0	0.0	2	0.7
10-19 歳	0	0.0	2	1.2	2	0.7
20-29 歳	11	10.5	12	7.4	23	8.6
30-39 歳	23	21.9	18	11.1	41	15.4
40-49 歳	13	12.4	14	8.6	27	10.1
50-59 歳	16	15.2	36	22.2	52	19.5
60-69 歳	25	23.8	54	33.3	79	29.6
70-79 歳	14	13.3	23	14.2	37	13.9
80-89 歳	0	0.0	1	0.6	1	0.4
90-99 歳	0	0.0	1	0.6	1	0.4
不明	1	1.0	1	0.6	2	0.7
計	105	100.0	162	100.0	267	100.0

表 3. 対象者の属性

	対照		症例		合計	
	人	%	人	%	人	%
性別						
女	13	56.5	11	61.1	24	58.5
男	10	43.5	7	38.9	17	41.5
年齢階級						
0-9 歳	1	8.3	0	0.0	1	3.6
10-19 歳	1	8.3	0	0.0	1	3.6
20-29 歳	1	8.3	0	0.0	1	3.6
30-39 歳	3	25.0	7	43.8	10	35.7
40-49 歳	6	50.0	3	18.8	9	32.1
50-59 歳	0	0.0	2	12.5	2	7.1
60-69 歳	0	0.0	2	12.5	2	7.1
70-79 歳	—	—	—	—	—	—
80-89 歳	0	0.0	2	12.5	2	7.1
治療中の疾患						
なし	11	84.6	13	86.7	24	85.7
あり	2	15.4	2	13.3	4	14.3
アレルギー						
なし	12	100.0	12	75.0	24	85.7
あり	0	0.0	4	25.0	4	14.3

表 4. 喫食量と潜伏期

	N	中央値	範囲
喫食量 (切れ)	12	2	1-3
潜伏期 (症例定義) ^{a)}	11	5	1.8-8.0
潜伏期 (通常) ^{b)}	12	5	1.8-15.0
		Spearman	P 値
相関係数	9	-0.531	0.141
仕入日別相関係数	3	-0.866	0.333

- a) 潜伏期 (症例定義) : 喫食後消化器症状 (下痢、腹痛、嘔吐、嘔気のいずれか) を呈すまでの時間
- b) 潜伏期 (通常) : 喫食後何らかの症状を呈すまでの時間 (通常の食中毒事例調査で利用)

表 5. 仕入日別発症リスク

仕入日	喫食	発症		非発症		OR	95%CI	P 値
		人	%	人	%			
A	あり	17	45.9	20	54.1	NA ^{a)}		<0.001
	なし	0	0.0	18	100.0			
B	あり	1	50.0	1	50.0	2.3	0.1-43.8	0.545
	なし	6	30.0	14	70.0			
		発症		非発症		調整		P 値 ^{b)}
		人	%	人	%	OR	95%CI	
全体	あり	18	46.2	21	53.8	22.7	2.3-221.3	<0.001
	なし	6	15.8	32	84.2			

a) NA: Not Available

b) Mantel-Haenszel

症例調査票

都道府県名 (_____)、市町村名 (_____)、
 保健所名 (_____ 保健所)
 本票記入者：氏名 (_____)、役職 (_____)
 記入者連絡先：電話番号 (_____)、
 Eメールアドレス (_____)

● 今回の調査および検体採取に関する事項

調査日 _____ 月 _____ 日 情報収集方法 (対面調査・自己記入)
 回答者の続柄 (本人・父・母・祖父・祖母・おじ・おば・兄・姉・その他 _____)

● 症例個人に関する事項

氏名 _____ 年齢 (_____ 歳 _____ か月) 性別 (男・女)
 自宅住所 (市町村まで) (_____)
 自宅の郵便番号上三ケタ (_____)
 職業 (農業・漁業・会社員・自営業・公務員・パート・学生・その他 _____)

● 通院・治療中の疾患の有無についてご記入ください。(2010年10月1日以降、2週間以上の医療機関への通院や内服を続けている(いた)ものがあれば「有る」、無ければ「無い」を選んで下さい)

現在通院治療中の疾患が 無い ・ 有る (病名: _____)

● これまで医療機関にて医師から食物もしくは薬物に対してアレルギーの診断を受けたことがありますか。(無い ・ 有る)

有ると応えた方は具体的な食物、薬物名を記入して下さい (複数回答可)

食物 (例、卵黄、サバ、etc) _____

薬物 (例、ペニシリン、アスピリン etc) _____

その他 _____

● ひらめ喫食に関する事項

景品を受け取ったのはいつですか?

_____ 年/ _____ 月/ _____ 日 午前・午後 _____ 時 頃

受け取った景品を最初に喫食するまでどのように保管していましたか?

(室温 ・ 冷蔵 ・ チルド ・ 冷凍)

受け取った景品を最初に喫食したのはいつですか?

_____ 年/ _____ 月/ _____ 日 午前・午後 _____ 時 頃

複数に分けて召し上がられた場合、その日時とそれ以前の保管方法もお答え下さい。

____年/____月/____日 午前・午後 _____ 時 頃 保管 (室温 ・ 冷蔵 ・ チルド ・ 冷凍)

____年/____月/____日 午前・午後 _____ 時 頃 保管 (室温 ・ 冷蔵 ・ チルド ・ 冷凍)

受け取った景品は何名で何柵召し上がりましたか? _____ 名で _____ 柵

同じ景品のヒラメを召し上がった方の中で、喫食後 48 時間以内に嘔吐、下痢、腹痛、あるいは 37.5℃以上の発熱のいずれか一つでも症状を呈した人はいましたか?

もし“はい”ならば、どなたでしょうか?

回答者本人 ・ 配偶者 ・ 父 ・ 母 ・ 祖父 ・ 祖母 ・ 子供 ・ 孫 _____

受け取った景品をどのように召し上がりましたか(複数回答可)? (生(刺身など) ・ 加熱(揚げ物として) ・ 加熱(汁物・鍋として) ・ その他 [_____] ・ 覚えていない)

生で召し上がった方にお聞きします。

生のひらめを召し上がったときにどの調味料を使用されましたか? (醤油(わさび無) ・ 醤油(わさび有) ・ ポン酢(景品として同封されていたもの) ・ ポン酢(自宅にあったもの) ・ その他 _____)

- ここからは症状に関する質問です。今回伊予銀行から送付された景品であるヒラメ喫食後 48 時間以内に嘔吐、下痢、腹痛、あるいは 37.5℃以上の発熱を認めた方のみご回答下さい。

各症状の有無 (20 ____ 年 ____ 月 ____ 日以降)

37.5℃以上の発熱 無 不明 有 → (有の人は全員回答) 最高体温は (_____ °C)

嘔吐 無 不明 有

無 不明 有

下痢※ → (有の人は全員回答) 24 時間で一番排便回数が多かったのは (_____ 回)

腹痛 無 不明 有

※水様性下痢または軟便は 1 回以上認められれば「あり」とする

嘔吐、下痢、腹痛、発熱 (37.5 度以上) の 4 つの症状のうち、最初にみられた症状は何か:

・嘔吐 ・下痢 ・腹痛 ・発熱

嘔吐、下痢、腹痛あるいは発熱の発生日はいつですか、またいつまで認めましたか:

嘔吐 年/ 月/ 日 午前・午後 時 頃～ 年/ 月/ 日 午前・
午後 時 頃

下痢 年/ 月/ 日 午前・午後 時 頃～ 年/ 月/ 日 午前・
午後 時 頃

腹痛 年/ 月/ 日 午前・午後 時 頃～ 年/ 月/ 日 午前・
午後 時 頃

発熱 年/ 月/ 日 午前・午後 時 頃～ 年/ 月/ 日 午前・
午後 時 頃

あなたは医療機関を受診しましたか

はい いいえ

もし“はい”ならばいつ・どの医療機関を受診しましたか？

年/ 月/ 日 ・名前 ()

注意事項

- 「調査日」とは、本調査を実施した日となります。自己記入式の場合は、記入日を書いてください。
- 「発症者」とは、腹痛、下痢、嘔吐、発熱（37.5 度以上）のいずれか一つ以上の症状を示したものとし、下痢は、水様便もしくは軟便が 1 回以上認められた状態とします。

ご協力ありがとうございました。

分 担 研 究 報 告 書

Kudoa 属粘液胞子虫の種同定に関する研究

佐藤 宏