

平成 24 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」  
分担研究報告書

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

ヒラメの喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

要旨

1990 年代頃より報告されたヒラメ喫食による原因不明食中毒は *Kudoa septempunctata* (クドア) の寄生が原因であることが報告された。一方、クドアが寄生したヒラメの喫食についての疫学情報については十分な情報が得られていない。そこで、本研究はクドアが寄生したヒラメを喫食した食中毒の 1) 発生状況の季節性(ベースラインデータの収集)、2) 発症に至るクドアの摂取量の検討を行った。季節性の解析の情報は 2009 年 6 月から 2012 年 12 月までの食中毒統計を使用した。発症に至るクドアの摂取量は 2011 年 6 月から 12 月までに発生したクドアに関連する食中毒事例で、事例が発生した自治体から厚生労働省に提供された情報を利用した。季節性は 2009 年、2011 年が 9 月にピークであり、2010 年が 8 月であったため、9 月前後がピークになる可能性が考えられた。クドアの 1g あたりの孢子数を最小値 ( $9.4 \times 10^5$  個/g) では 76.6g 以上の摂取でこれまでに推定した閾値 ( $7.2 \times 10^7$  個) 以上となったが、中央値 ( $1.1 \times 10^7$  個/g) 以上では閾値を超えていた。ヒラメに規制しているクドアの孢子数とヒラメの喫食により発症との関連が示唆された。

A. 研究目的

これまで、1990 年代後半に生鮮食品の喫食による原因不明食中毒の事例が報告され始めた。その原因としてヒラメ及び馬刺しの喫食者が関連する可能性が指摘された。2011 年に *Kudoa septempunctata* (クドア) が寄生したヒラメの喫食が原因であることが報告された。

一方で、クドアが寄生したヒラメの喫食についての疫学情報については十分な情報が得られていない。そこで、本研究はクドアが寄生したヒラメを喫食した食中毒に

関して 1) 発生状況把握として季節等の検討(ベースラインデータの検討)、2) 発症に至るクドアの摂取量に関する検討を行った。

B. 研究方法

方法は発生状況の把握には厚生労働省より、食中毒統計よりクドア関連の食中毒の発生報告が始まった 2009 年 6 月から 2012 年 52 週までのデータを利用し、発生の報告の推移を検討した。発症に至るクド

アの摂取量は 2011 年 6 月から 12 月までに発生したクドアに関連する食中毒事例で、事例が発生した自治体から厚生労働省に提供された原因食品であるヒラメの喫食量(g)、病因物質(クドア)、ヒラメ 1g あたりのクドアの孢子数、ヒラメの身の喫食量(g)よりヒラメを喫食した際に摂取した孢子数を算出し、喫食した孢子数の中央値、範囲(最小値、最大値)よりクドアの孢子摂取量の算出を行った。

### C. 研究結果

2009 年 6 月から 2012 年 12 月までのクドアの食中毒発生報告件数は 2009 年及び 2011 年が 9 月にピークがあり、2010 年が 8 月にピークがあり、2012 年が 6 月にピークがあった。各年の食中毒発生報告件数は 2010 年が 18 件(9 月)で最も多く、次いで 2009 年(9 月)及び 2011 年(8 月)が 14 件、2012 年が 11 件(6 月)であった。

34 事例から喫食量の情報が得られた事例が 15 事例(44.1%)であった。また、クドアの孢子数の情報が得られた事例が 12 事例(35.3%)であった。喫食量及びクドアの孢子数の情報が得られた事例が 12 事例(35.3%)であった。ヒラメの喫食量(図 2)は中央値が 25.1g(範囲:11.3-88.0g)で、1g あたりのクドア孢子数(図 3)の孢子数の分布は中央値が  $1.1 \times 10^7$ (範囲: $9.4 \times 10^5$ - $2.0 \times 10^8$ )であった。ヒラメの喫食量と孢子数は有意な相関( $r=0.093$ ,  $P=0.773$ )がなかった(図 4)。

ヒラメに寄生したクドアの 1g あたり孢子数の最小値( $9.4 \times 10^5$  個/g)、中央値( $1.1 \times 10^7$  個/g)、最大値( $2.0 \times 10^8$  個/g)とヒラメの喫食量(10g~90g)よりクドアの摂取量を推定し、過去に算出した閾値

( $7.2 \times 10^7$  個)と比較をした。クドアの汚染が中央値以上であればクドアの摂取量は閾値を超えていた。クドアのヒラメ 1g あたりの孢子数が最小値であれば、ヒラメの喫食が 76.6g 以上でないと閾値を超えなかった。

### D. 考察

クドアが寄生したヒラメの流通は 2009 年 6 月から 2012 年 12 月までのクドアが寄生したヒラメに関連する食中毒発生報告件数は 2009 年及び 2011 年が 9 月にピークであり、2010 年が 8 月にピークであった。クドアに汚染されたヒラメは 9 月を中心にピークとなり流通している可能性が考えられた。従って、季節性がある可能性が示唆された。一方で、2012 年は 6 月に発出された通知により、報告されたクドアが寄生したヒラメに関連する食中毒の発生報告方法が通知の発出以前と通知の発出以降で異なっている可能性があると考えられ、2012 年の食中毒発生報告件数が 6 月にピークとなった原因の可能性が考えられた。

食中毒事例ごとのヒラメの摂取量とクドアの孢子数にもとづいて相関係数を算出したが、有意な相関はなかった。また、閾値を超えるクドアの摂取量はヒラメがクドアに汚染された最小値では 76.6g 以上の喫食であったため、ヒラメに寄生するクドアの孢子数に依存することが示唆された。今後の対策として、ヒラメのクドアの孢子数が少ないあるいはクドアが存在しないような養殖ヒラメの生産が重要であると考えられた。ヒラメにクドアが寄生を防ぐあるいは方指数を少ない状況を維持するための対策としては、例えば大分県のようなヒラメの種

苗の時点でのスクリーニングや養殖業者から出荷前の段階でのスクリーニングなどを行い、十分な品質管理をすることで、ヒラメの喫食による食中毒事例の発生を予防できることが考えられた。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## E. 結論

クドアが寄生したヒラメの流通は9月前後がピークである可能性が考えられた。また、発症にはヒラメに規制するクドアの孢子数とヒラメの喫食量との関連が示唆された。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 大西 真, 黒田 誠, 八幡 裕一郎.  
ゲノムから見た感染症 網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索. NEUROINFECTION. 2012;17(1): 35-41.

### 2. 学会発表

- 1) Yahata, Y., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Toyokawa, T., Nakamura, N., Taniguchi, K., Okabe, N. : Kudoa septempunctata caused outbreak in humans with raw flounder ingestion. IMED 2013 (Vienna, Austria, 15-18 February, 2013)

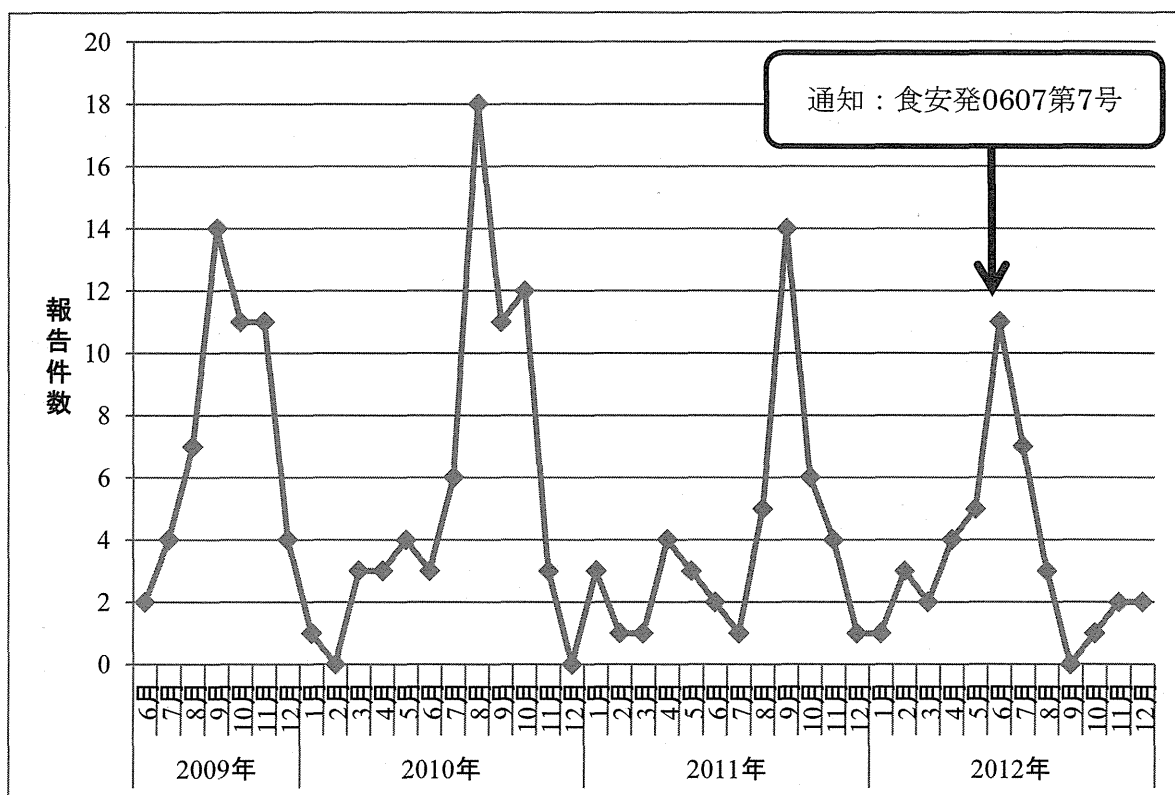


図1. 年別クダア関連の食中毒報告数(2009年6月～2012年12月)

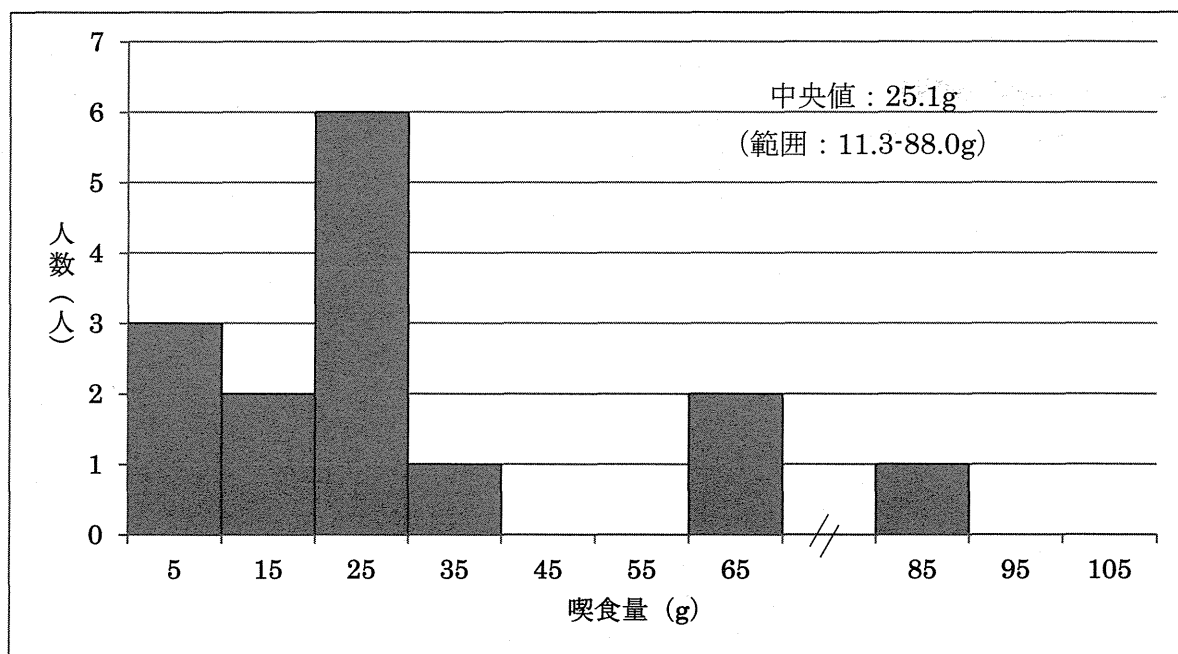


図2. ヒラメの平均喫食量(N=12)

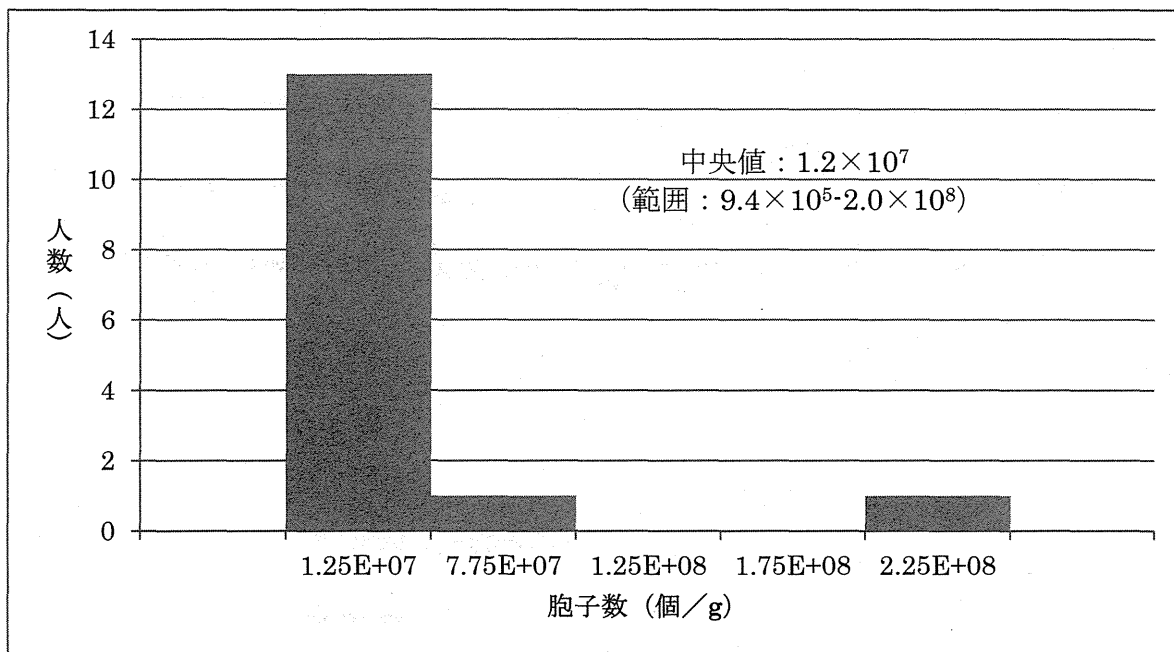
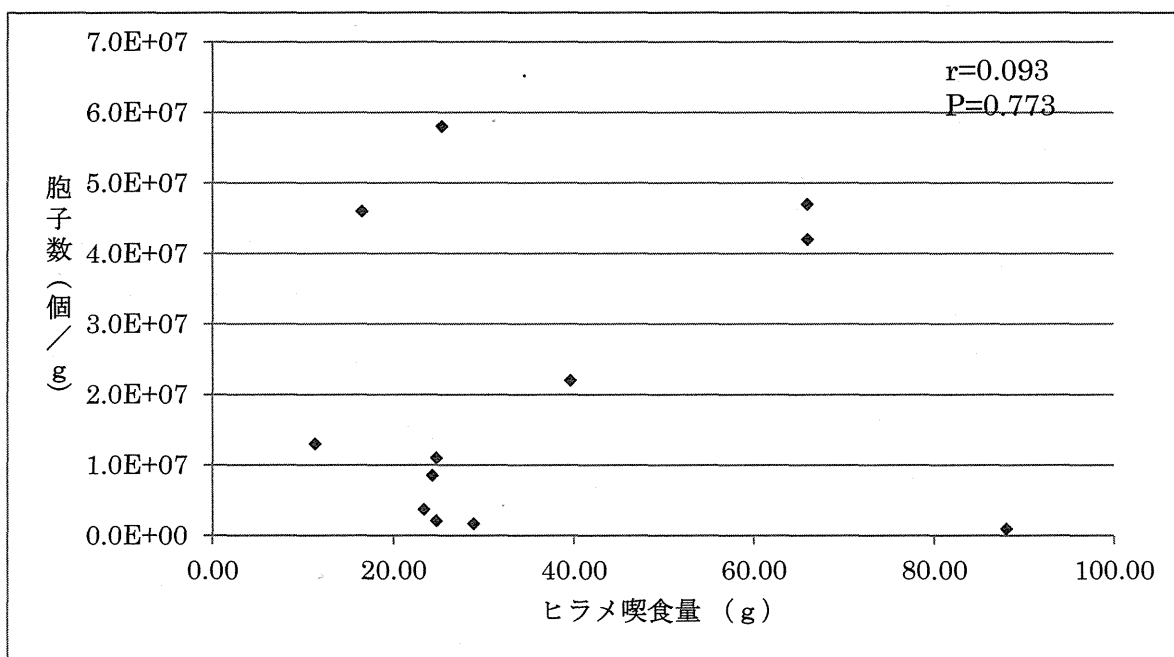


図 3. クドア孢子数 (N=15)



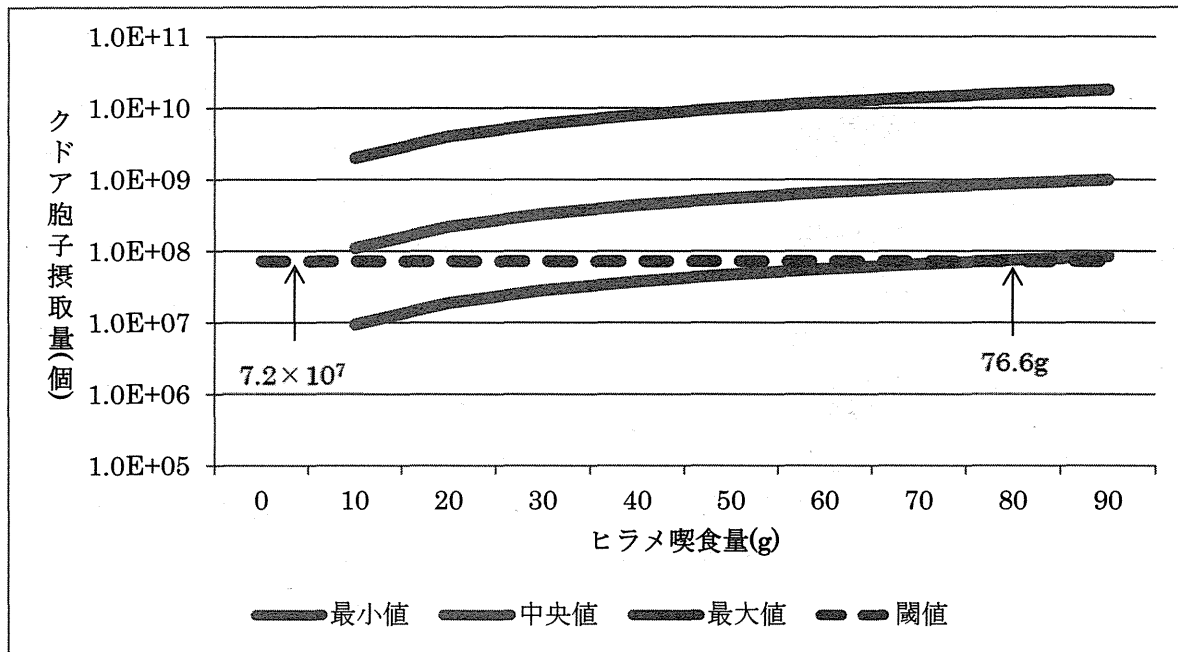


図 5. ヒラメの喫食量とクドア

[[Insert tables into the main text.]]

**Table 1. Characteristics of Subjects**

	Case		Control		P-value	Total	
	No.	%	No.	%		No.	%
Sex							
Male	23/59	39%	73/172	42%	0.642 <sup>a)</sup>	96/231	42%
Female	36/59	61%	99/172	58%		135/231	61%
Ambulant treatment of illness	23/59	39%	51/167	31%	0.235 <sup>a)</sup>	74/226	33%
Hypertension	10/59	17%	21/167	13%	0.263 <sup>b)</sup>	31/226	14%
Diabetic mellitus	1/59	2%	6/167	4%	0.415 <sup>b)</sup>	7/226	3%
Hyperlipidemia	2/59	3%	2/167	1%	0.280 <sup>b)</sup>	4/226	2%
Stomach illness	3/59	5%	4/167	2%	0.265 <sup>b)</sup>	7/226	3%
Allergy	3/59	5%	13/167	8%	0.359 <sup>b)</sup>	16/226	7%
Symptom							
Fever	11/56	20%					
Emesis	34/59	58%					
Diarrhea	47/59	80%					
Abdominal pain	25/59	42%					
				<b>Median</b>	<b>Range</b>		<b>P-value</b>
Age (years)							
Case				62	13-90		0.462 <sup>c)</sup>
Control				61	1-91		
Amount of flounder fish ingested (g)							
Case				67	33-300		0.667 <sup>c)</sup>
Control				78	20-300		
Time from delivery to ingestion (h)							
Case				18	1-165		0.009 <sup>c)</sup>
Control				26	0-165		
Incubation period for symptoms (h) <sup>d)</sup>				5	1-22		
Emesis only (h) <sup>e)</sup>				5	4-19		
Emesis and diarrhea and/or abdominal pain (h) <sup>e)</sup>				5	4-19		
Diarrhea within 24 h (number of times)				3	1-20		
<i>K. Septempunctata</i> (number/g)				4.5×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>3</sup> -9.6×10 <sup>6</sup>		

- a) Chi-square test
- b) Fisher's exact test
- c) Mann-Whitney U test
- d) HC

**Table 2. Relationship between factors symptoms**

	Case		Control		P-value	OR <sup>b)</sup>	95%CI <sup>c)</sup>	
	N	%	N	%			-	-
Underlying disease	23/59	39.0	51/167	30.5	0.1177	1.45	0.78	- 2.70
Hypertension	10/59	43.5	20/167	39.2	0.1666	1.57	0.69	- 3.58
Allergy <sup>a)</sup>	3/59	5.1	13/167	7.8	0.3588	0.64	0.17	- 2.31
Flounder fish eating								
Raw flounder fish eating	59/59	100.0	156/174	89.7	0.0041 <sup>a)</sup>	NA <sup>d)</sup>		
Seasoning: soy sauce & wasabi	6/59	10.2	14/174	8.0	0.3074	1.29	0.47	- 3.54
Preserving of flounder fish								
Room temperature	5/58	8.6	9/171	5.3	0.2633 <sup>a)</sup>	1.70	0.55	- 5.29
Refrigerator	28/58	48.3	109/171	63.7	0.0279 <sup>a)</sup>	0.53	0.29	- 0.97
Chilled room	23/58	39.7	36/171	21.1	0.0026	2.46	1.30	- 4.68
Frozen	2/58	3.4	15/171	8.8	0.1463	0.37	0.08	- 1.68

a) Fisher's Exact Test

b) OR: Odds Ratio

c) 95%CI: 95% Confidential Interval

d) NA: Not Available



[[All images must have a minimum resolution of 300 dpi, width 107 mm.

\*For more information on how to prepare your figures for submission, visit

[http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/artwork\\_guidelines\\_flash.html](http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/artwork_guidelines_flash.html)]]

Figure 1 A.

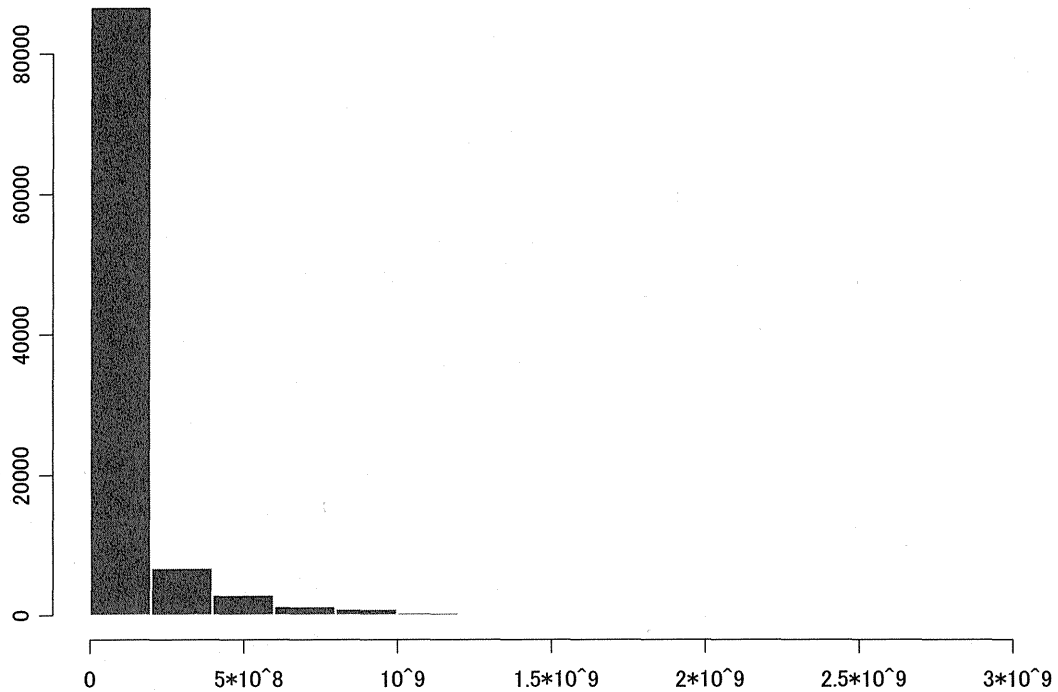


Figure 1 B.

Percentile	Number of <i>K. Septempunctata</i>
0 <sup>th</sup>	$2.00 \times 10^4$
25 <sup>th</sup>	$7.50 \times 10^4$
50 <sup>th</sup>	$3.00 \times 10^5$
75 <sup>th</sup>	$7.20 \times 10^7$
100 <sup>th</sup>	$2.89 \times 10^9$

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

平成 24 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

*Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定に関する研究

研究分担者 佐藤 宏（山口大学 共同獣医学部）

研究協力者 Lea Angsinco JIMENEZ（Davao Oriental State College of Science and Technology, Republic of the Philippines）

研究協力者 田中秀平（山口大学 農学部）

研究協力者 都築秀明（愛知県食品衛生検査所）

ヒラメ体側筋寄生の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が食中毒原因として特定されたが、マグロ等他種食用海産魚が関わることで推測される食中毒様事例については、その原因種の特定が今後の課題として残されている。本研究では、まず、メジマグロ（クロマグロ）ならびにキハダマグロから分離された 6 つの極囊/殻片をもつクドア種について形態学的、分子遺伝学的マーカーの比較検討を行い、*Kudoa neothunni* としての特徴づけを進めた。メジマグロ分離株は食中毒様事例の原因食調査において入手した 3 検体、キハダマグロ寄生クドアはフィリピンミンダナオ島に水揚げされた 11 検体と国内市場で入手した 10 検体である。なお、キハダマグロでの寄生率は、前者で 22.6%（53 個体材料を検査）、後者で 13.4%（67 個体材料を検査）であった。これらのクドア種の 18S-28S rDNA について解析したところ、メジマグロ寄生種は単一系統であり、キハダマグロ寄生種には 2 系統が確認され、うち 1 系統はメジマグロ寄生系統（DDBJ/EMBL/GenBank accession no. 693042）と同一の塩基配列をもっていた。今回キハダマグロからのみ確認された系統は、昨年度の研究でキハダマグロにジェリーミートを引き起こしていた系統（DDBJ/EMBL/GenBank accession no. 693049）であったが、今回の寄生では散発性に筋線維内にシュードシストを形成して寄生する像のみが見られた。また、ビンチョウマグロに寄生する 4 つの極囊/殻片をもつクドア種として *Kudoa thunni* を本研究グループが種記載しているが、今回検査したキハダマグロの 5 個体に同様のシスト形成種を確認した。この種は、*Kudoa neothunni* が体側筋線維内シュードシスト形成種であることや極囊/殻片数が明らかに異なることから 2 種間の種同定上の問題はないが、2 種が同一個体に感染していることもあることから、肉眼・顕微鏡検査を並行しない検査法では原因種確定の上で混乱を招く可能性がある。また、4 つの極囊/殻片をもつクドア種は各種海産魚から種記載が最近増えつつあり、類縁種の鑑別においても精査が必要となってきた。生鮮魚介類を共通食とする原因不明食中毒の発症機構を明らかにする上で、原因食とその病原体の理解も対策立案上必要となることから、病原体の種もしくは系統の把握、それに適した種・系統マーカーの解明には今後とも取り組みが必要である。

## A. 研究目的

全国的に増加する生鮮魚介類を共通食とする原因不明食中毒様事例の原因究明が進められ、少なくとも原因食をヒラメとする場合には粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* がその病原体であることが確認された<sup>1, 2)</sup>。このことを受け、我々も国内で市販される各種海産魚について、粘液胞子虫の寄生状況について調査を行った<sup>3, 4)</sup>。瀬戸内海産スズキやクロダイの体側筋に小シストを作って寄生する *Kudoa iwatai*、同様に、日本海産マアジや太平洋産ビンナガマグロ (*Thunnus alalunga*) の体側筋に白色小シストをつくる *Kudoa trachuri* および *Kudoa thunni* の確認<sup>3)</sup>、あるいは、クロダイの消化管壁や体腔漿膜に白色微小シストをつくる *Henneguya ogawai* や *Henneguya yokoyamai*、イシガキダイの食道壁に小シストをつくる *Myxobolus machidai* 等を検出した<sup>4)</sup>。上記の種の多くは新たに確認された粘液胞子虫として新種記載するとともに、日常的に、各種粘液胞子虫を生鮮海産魚とともに喫食する機会が多いことが認識された。

また、食中毒事例の原因食と考えられたメジマグロ(クロマグロ; *Thunnus thynnus*) から6つの極囊/殻片をもつクドア種が分離されることから、その種を検討したことは前年の報告書でも記述した。形態学的にはインドネシア近海で漁獲され築地市場に入荷したキハダマグロ (*Thunnus albacares*) にジェリーミート(死後筋肉融解)を

起こし新種記載された *Kudoa neothunni* (Arai and Matsumoto, 1953)<sup>5)</sup> と近似していることから、新たにジェリーミートが見られたキハダマグロを入手し、メジマグロからの分離株と 18S~28S リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)塩基配列を比較した。これら2分離株の 18S ならびに 5.8S rDNA 塩基配列の同一性は高かったが(1,720 塩基対で 99.9%、あるいは、158 塩基対で 100%)、一方、ITS1 領域(705 塩基対)での同一性は 62.4%、ITS2 領域(529-588 塩基対)では 66.9%、28S rDNA では 2,245 塩基対で 99.0% であった<sup>6)</sup>。

それぞれのマグロ種から分離された2分離株間の比較では、両者の関係が明確に示せないことから、本年の研究では、多くの分離株を集め、これらについて詳細な rDNA 塩基配列の確認を進めることにした。また、キハダマグロにはシュードシストを形成して寄生する *K. neothunni* のみでなく、白色シストを形成して寄生する *K. thunni* タイプの寄生もみられたことから、この種の確認も合わせて実施した。

## B. 材料と方法

### (1) メジマグロからのクドア検体の収集

食中毒事例発生の折に原因食の1つとして国立食品医薬品衛生研究所衛生微生物部(小西良子部長、大西貴弘室長)に寄託されたメジマグロの体側筋ブロックを用いた。採集日は2011年12月9日、同年12月22日、2012年6月7日で、冷凍状態で

送付を受けた。冷凍ブロックを薄く板状に切り、生理食塩水に浸して実体顕微鏡下でクドア寄生筋線維を分離し、シュードシスト内の孢子形態の確認を行った。

## (2) キハダマグロからのクドア検体の収集

2011年12月、2012年2月にフィリピンミンダナオ島のDavao市およびMati市の生鮮魚市場にてキハダマグロの体側筋ブロックを収集した(図1)。採集において個体を重複させないために、店頭で売られる尾部からブロックを購入し、小片を10%中性緩衝ホルマリン液ならびに70%アルコール液で固定して国内に持ち帰った。Davao市では29検体、Mati市では24検体を確保した。ホルマリン固定した筋ブロックについて細切して、蒸留水を用いた簡易沈澱法を行い、底部に集まる孢子の確認を行った。孢子を確認できた検体については、アルコール固定したブロックを細切し、70%アルコールを用いた簡易沈澱法を行い、底部に集まった孢子懸濁液をDNA抽出材料として用いた。

また、東南アジア近海産キハダマグロで国内生鮮魚市場(愛知県内)にて2012年1月から9月に冷蔵状態で売買された67個体から体側筋のブロックを確保し、その一部を実験室で細切し、PBSに懸濁したのち200 $\mu$ mメッシュ、次に100 $\mu$ mメッシュを通して、濾過液を遠心沈澱させ、沈渣中の孢子の有無を確認した。陽性検体は冷凍状態で保存するとともに、薄く板状に切った冷

凍筋肉片を生理食塩水に浸して解凍し実体顕微鏡下で精査した。

また、今回の一連のキハダマグロでの調査前後に、体側筋に散発する白色の小シストを有していることで冷凍保存されていた5検体についても、その病変形成の原因となるクドア種の形態学的検査とDNA解析を実施した。

## (3) 孢子の形態学的観察

体側筋ブロックの実体顕微鏡下での観察において、粘液胞子虫シュードシスト形成が見られた筋線維あるいは白色シストを分離し、生理食塩水に孢子を浮游させた。微分干渉光学顕微鏡下400倍で孢子の形態観察を行うとともに、撮影した写真をAdobe Photoshop ver. 11.0 (Adobe Systems, San Jose, California, USA)にデジタルデータとして取り込んだ。この画像データについて高倍率下で、Lom and Arthur (1989)<sup>7)</sup>に従って孢子の計測に供した。

## (4) 寄生虫DNA抽出、遺伝子増幅とシーケン

粘液胞子虫シストからのDNA抽出は添付された指示書に従い Illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK) を用いて行った。粘液胞子虫 rDNA 断片の増幅反応は表1に示すプライマーペアを用いて20 $\mu$ l容量で行った。なお、28S rDNA断片の増幅には、5'-末端用に

## KUDOA-Kt28S1F

(5'-CAAGACTACCCTGCTGAAC-3')を用いていたが<sup>9)</sup>、シーケンスを進めるに伴い、このプライマーの塩基配列合致がよくないことが判明した。そのため、KUDOA-Kt28S2F(5'-AGGCAAGACTACCCTGCTGAA C-3')を使ったPCRに切り替えた。Polymelase chain reaction (PCR)のポリメラーゼとしては Blend Taq—Plus— (TOYOBO, Dojima Hama, Osaka, Japan)を用い、94°C 3分間の酵素活性化後、94°C 45秒、64°Cもしくは62°C 1分間 (表1参照)、72°C 1分のサイクルを40回、最後に、72°Cで7分間の反応を行った。PCR増幅産物は High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いて精製し、表1に示したプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスで1箇所でも塩基多型性が見られた場合には、PCR産物をプラズミッドペクターpTA2 (TARget Clone™; TOYOBO)に組み込み、*Escherichia coli* JM109 (TOYOBO)を用いてクローニングを行った。クローニング大腸菌を液体培地で増殖させ、Nucleo-Spin<sup>®</sup> Plasmid kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Germany)を用いてプラズミッドDNAを精製し、ユニバーサル M13 forward/reverse プライマーを用いてシーケンスした。個々の検体毎にできるだけ多数のクローンについて塩基配列を検討した。

## (5) 分子系統樹解析

今回の研究を通して得られた rDNA 塩基配列と DDBJ/EMBL/GenBank に登録された近縁 *Kudoa* 属粘液胞子虫の rDNA 塩基配列について、CLUSTAL W multiple alignment program<sup>8)</sup>を用いてアライメントした。最終的に目視にて修正し、いずれかの検討塩基配列に塩基の挿入欠失がある塩基部位を除き、系統樹解析に用いるデータとした。最尤法(ML [maximum likelihood])解析には、'phylogeny.fr' ウェブサイト (<http://www.phylogeny.fr/>)で公開されている PhyML 法<sup>9)</sup><sup>10)</sup>を用いた。信頼性検証には、aLRT (approximate likelihood-ratio test)法<sup>11)</sup>を用いた。

## C. 結果

### (1) 感染状況

フィリピンミンダナオ島 Davao 市の市場で収集したキハダマグロ 29 検体中 7 例 (24.1%)、Mati 市の市場で収集したキハダマグロ 24 検体中 5 例 (20.8%) にクドア胞子を確認した。また、国内市場で収集したキハダマグロ 67 検体中 9 例に (13.4%) にクドア胞子を確認した。後者の冷凍片について実体顕微鏡下で観察した限りでは、クドアによるシュードシスト形成が見られる筋線維の頻度はごく稀であった。すなわち、肉片 0.2~0.6g の 5 検体で確認されたクドア寄生筋線維は 1~7 本程度であった。感染個体の水揚げ地はインドネシア、パプアニューギニア、タイであった。また、1 検体では部分的な筋肉融解(ジェリーミート)が

みられ(図2)、この病巣からの孢子とともに、周辺の正常な形態を保つ筋線維内に形成されたシュードシストからも孢子を分離し、両者について分子生物学的な解析を実施した。

また、国内市場に持ち込まれたキハダマグロに白色シストが散見されたために冷凍保存されていた体側筋ブロック5検体であるが、その内部には4つの極囊/殻片をもつクドア孢子が確認された。70gのブロックに1ヶ、19gの筋肉ブロックに14ヶ、206gの筋肉ブロックに11ヶ、40gの筋肉ブロックに20ヶ余といった寄生状況であった(図3)。シストのサイズも検体により異なっていた(表2)。すなわち、 $0.83\pm 0.34\text{mm}\times 0.60\pm 0.17\text{mm}$ (平均±標準偏差、 $n=7$ )と小さなシストが散発する検体から $2.04\pm 0.27\text{mm}\times 1.55\pm 0.22\text{mm}$ (平均±標準偏差、 $n=5$ )とやや大きめのシストが散発する検体もあった。これら感染個体の漁獲地の詳細は不明であった。

## (2) 光学顕微鏡所見

メジマグロおよびキハダマグロの体側筋線維に形成されたシュードシスト内の孢子は *Kudoa neothunni* と同様で6つの極囊/殻片をもち、キハダマグロの体側筋組織に白色シストを作る孢子は *Kudoa thunni* と同様の4つの極囊/殻片をもつ粘液孢子虫であった。

## (3) 分子系統学的解析

### i. メジマグロとキハダマグロから検出された *K. neothunni* の 18S/28S rDNA 解析

表3・4に示した28検体、すなわちメジマグロ由来クドア孢子3検体(Sample Nos.1, 2, 17, 18; No. 17とNo.18は同一材料について別ロットを用意)およびキハダマグロ由来クドア孢子22検体(Samples nos. 4-15, 19-28; 但し、No. 27とNo. 28は同一個体からジェリーミート病巣内の孢子と正常な外観をもつ筋線維内孢子の2つを用意)について、18S rDNA 1,699塩基長を増幅しシークエンスした。塩基多型性を確認するために、クローニングにより得たシークエンスを比較し、表3に示す13箇所での塩基多型が確認された。これまでに DDBJ/EMBL/GenBank に登録されたメジマグロ寄生 *K. neothunni* (accession no. AB693042)とキハダマグロ寄生 *K. neothunni* (AB693049とAB698884)の2分離株間での違いは1,321塩基目(G vs. A)と1,667塩基目(A vs. T)の2箇所にあるが、今回の検体もこの2箇所の塩基は常に同一のペアとなっており、メジマグロ由来検体ではすべてが‘GA’タイプ系統、キハダマグロ由来検体では‘GA’タイプと‘AT’タイプの2系統が混在していた(表3)。部分的なジェリーミート病巣がみられたSample Nos. 27/28は‘GA’タイプであり、顕著なジェリーミートがみられたキハダマグロからの *K. neothunni* (AB693049)が‘AT’タイプであったことから、これまでに確認された2系統のいずれもがジェリーミートの原因となる可能性が示唆された。



18S rDNA と同様に 28S rDNA 741 塩基長を増幅し、クローニング後にシーケンスした。表 4 に示す 16 箇所塩基多型が確認された。うち 11 塩基部位の違いは、これまでに DDBJ/EMBL/ GenBank に登録されたメジマグロ寄生 *K. neothunni* (accession no. AB693042) とキハダマグロ寄生 *K. neothunni* (AB693049 と AB698884) の 2 系統間での違いと一致していた。これらを仮に当初の登録塩基配列の宿主にちなんで、メジマグロタイプ(B 系統)とキハダマグロタイプ(Y 系統)とすると、今回検討したメジマグロ寄生 *K. neothunni* の 28S rDNA 塩基配列はすべて B 系統と一致し、一方、キハダマグロ寄生 *K. neothunni* の 28S rDNA 配列は Y 系統が 15 検体、B 系統が 7 検体であった(表 4)。部分的ジェリーミートがみられた検体では、その採取部位にかかわらず B 系統が確認された。また、28S rDNA でのタイプ分けと 18S rDNA でのタイプ分けは完全に一致していた。以上の結果を再確認するために、改めて孢子 DNA を調整して PCR 増幅とシーケンスを繰り返したが、2 回の解析結果は一致した。

## ii. メジマグロから検出された *K. neothunni* rDNA ITS 領域の塩基配列解析

昨年の本研究報告書でも言及しているように、メジマグロ寄生 *K. neothunni* (accession no. AB693042) とキハダマグロ寄生 *K. neothunni* (AB693049) の 2 分離株間では ITS 領域に大きな違いがみられた<sup>6)</sup>。すなわち、

両分離株間の ITS1 での同一性は 62.4%、ITS2 領域では 66.9%であった。今回の検体について同様の比較を計画しているが、これまでに得た結果はメジマグロ寄生 *K. neothunni* 4 検体に限られる。これら 4 検体毎に ITS 領域の増幅産物をクローニングして精査すると、ITS1 領域では 'ACAT'、'ACTT'、'CAT'、'ACTT'、'ACTG'、'AGTTG'、'GTA' の 7 つの塩基組が 1~8 回反復されること、ITS2 領域では 'TG' および 'GT' が 5~9 回反復され、ITS 領域でのこれら反復単位の繰り返し回数は同一ロットの検体でも異なった(図 4)。この反復配列が ITS 領域に散在していることから、当該領域のダイレクトシーケンスでは塩基配列がうまく読み取れない原因となっていることが判明した。

## iii. キハダマグロ体側筋に白色シストを作るクドア種の塩基配列解析

表 2 に示すシスト形成クドア孢子 5 検体 (Nos.3, 29, 30, 31, 32) について rDNA の増幅を試みた。3 検体について 18S rDNA 1,763 塩基長を、4 検体について 28S rDNA 685~802 塩基長の塩基配列を決定した。これら相互の塩基配列同一性と近縁種との相同性を表 5 に示した。ビンナガマグロから記載された *K. thunni* (AB553300 [18S rDNA]; AB553306 [28S rDNA]) ならびにキハダマグロあるいはミナミマグロ (*Thunnus maccoyii*) から塩基配列登録された '*Kudoa crumena*' (AF378347 [18S rDNA]; FJ417057 [28S

rDNA])との高い塩基配列同一性がみられた。18S rDNA および 28S rDNA 塩基配列に基づく最尤法分子系統樹を図5に示した。

#### D. 考察

*Kudoa neothunni* は、インドネシア近海で漁獲され築地市場に入荷したキハダマグロ (*Thunnus albacares*; syn. *Neothunnus macropterus*)に死後筋肉融解を引き起こした種として記載された<sup>5)</sup>。本種は筋細胞内にシュードシストを形成し、6ヶの極囊/殻片が放射状に配置されている。

*K. neothunni* は死後筋肉融解の見られたキハダマグロから記録されただけでなく<sup>5)</sup>、台湾近海太平洋産のメバチマグロ (*T. obesus*)や東北沖の太平洋産クロマグロの筋肉融解巣からも報告されている<sup>12,13)</sup>。前年度の本研究報告で記述しているように、キハダマグロ筋肉融解巣ならびに正常所見をもつクロマグロ筋組織から分離した *K. neothunni* 2分離株は形態学的に同一の胞子をもち、18S rDNA の違いは1,720塩基長で2箇所の塩基置換のみであり、今回の検討でもこの2箇所での塩基置換が確認された(表3)。同様の低頻度での塩基置換率ながら、アルゼンチン沖の海域で取れる海産魚の死後に筋肉融解を引き起こす *K. rosenbuschi* と筋肉融解を引き起こさない *K. alliaris* は別種とされているが<sup>14,15)</sup>、筋肉融解はクドアの発育や保存環境など様々な要因に左右されることを考慮する必要性がある<sup>13,16-18)</sup>。すなわち、生物集団を扱う際の

指標としては有用性がある特徴であっても、個別の感染例に適用して種診断の指標として使うには困難がある<sup>6)</sup>。今回、部分的な筋肉融解がみられた検体を得たことから、病巣の内外に局在する胞子を別々に検討し、両者が同一の18S rDNAならびに28S rDNA 遺伝子型をもつことを確認した。更に、今回検討したメジマグロ検体では前に塩基配列登録したメジマグロ分離株(AB693042)と同一の配列をもつ系統のみが、キハダマグロからは前にジェリーミートを起こしたキハダマグロから塩基配列登録した分離株(AB693049)と同一の系統とともにメジマグロ分離株系統(AB693042)も確認されたが、部分的筋肉融解の見られた検体から分離した胞子は後者、メジマグロ分離株系統であった(表3,表4)。この事実は、筋肉融解を種鑑別の指標として用いることの危険性を実際に示したと言えるだろう。

メジマグロ分離株(AB693042)系統とジェリーミートの見られたキハダマグロ分離株(AB693049)系統の両者間では ITS1 で62.4%、ITS2 では66.9%の塩基配列同一性であったことは前にも記した<sup>6)</sup>。この低い塩基配列同一性をもつ意義については、今回の検体を用いて解析を進めるべく計画していたが、現在までに解析が終了したのはメジマグロからの4検体に限られる。図4に示す通り、いくつかの反復配列単位が見つかった。これらは同一ロット内でも反復回数がばらつくため、ITS領域のダイレクトシーケンスが行えない要因を作ってい

ることが判明した。

世界的な分布をもち、死後筋肉融解を起こす種として知られる *K. thyrsites* では、18S rDNA での塩基の変異は 0.2—1.0% であるが、28S rDNA では 3.0—9.6%、ITS1 では 65.6% であると報告され<sup>19)</sup>、多くの研究者が複合種としての可能性を考えている。18S rDNA に比べて 28S rDNA において塩基変異がより頻発することは、よく知られるようになってきた<sup>20)</sup>。オーストラリアの Great Barrier Reef で実施された調査の際に 6 科 18 種の海産魚から分離した *K. thalassomi* 18 分離株では、18S rDNA の同一性は 99.7%、28S rDNA は 98.5% であった<sup>20)</sup>。

海産魚体側筋に線維性の被膜をもつシストを形成するクドア種として、私たちの研究グループはマアジからの *K. trachuri*、ビンナガマグロからの *K. thunni*、マサバからの *K. scomberi* を新種記載してきた<sup>3,6)</sup>。これらの粘液胞子について、光学顕微鏡下で形態学的特徴のみに基づいて種鑑別を行うことは難しい。図 5 に示すように、18S rDNA あるいは 28S rDNA でも類似性の高い塩基配列をもっている。今回、キハダマグロから得た 5 検体について分子遺伝学的解析を試み、4 検体について結果を得た。形態学的には *K. thunni* と区別することが不可能であったが、18S/28S rDNA の塩基配列でも *K. thunni* との類縁性の高さが示された(表 5)。なお、カリフォルニア沖のキハダマグロおよびタスマニア近海のミナミマグロから得たとされる「*K. crumena*」が塩基

特録されているが(AF378347, FJ417057)、これらは当該種の模式宿主(大形のサバ *Scomberomorus maculatus*)からではなく、マグロ類から分離された胞子について形態学的な観察記録がない登録されていることに注意が払われねばならない。すなわち、いずれもマグロ類から分離されたクドア胞子が図 5 に示す 18S/28S rDNA 系統樹において同一クレードに収まっている。*K. thunni* の地理学的分離株として、このクレードに入る塩基配列をもつクドアを扱うのが妥当かもしれない。

筋肉細胞内にシュードシストを形成して寄生するヒラメの *K. septempunctata* やマグロの *K. neothunni* の場合には、例え重度の感染が魚肉にあっても、そのことを肉眼的に検知することは難しく、喫食を通して多量の胞子が一気に消化管に入る可能性が高い。本研究を通して、これまでに食中毒事例発生時に回収されたメジマグロから分離されている *K. neothunni* と同一系統の粘液胞子が、キハダマグロにも高率に感染していることが確認された。今回の調査では、キハダマグロでの感染度は低く、食中毒原因食としての可能性が考えられたメジマグロでの感染度とは明確に異なっていた。この両マグロ種で異なる感染度が宿主—寄生虫関係に基盤をおいた傾向として考えられるのか、あるいは、偶発的な感染度の偏りを観察しているだけで、いずれのマグロ種でも重度の感染が起こりえるのか、食中毒発症において経口的に取り込む胞子数が大

きな要因となっていることから、今後ともマグロ類での感染度に感染度の基礎データの収集が望ましい。このことが、予防対策を考える上でも大いに参考になるだろう。

食中毒と関係した種の特定を進め、また、その種の高産魚での感染を簡易に、そして信頼性における方法で診断する技術が求められている。粘液胞子虫類については、種鑑別の基盤となる研究もまだまだこれからの充実が必要な状況である。

#### E. 参考文献

1. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2010) *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitol Res 107: 865-872
2. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T (2012) 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
3. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2011) *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
4. Li Y-L, Sato H, Kamata Y, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y (2012) Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. Parasitol Res 111: 819-826
5. Arai Y, Matsumoto K (1953) On a new sporozoa, *Hexacapsula neothunni* gen. et sp. nov., from the muscle of yellowfin tuna, *Neothunnus macropterus*. Bull Jpn Soc Sci Fish 18: 293-299
6. Li Y-L, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol Res 112: 1991-2003
7. Lom J, Arthur JR (1989) A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. J Fish Dis 12: 151-156
8. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: