

9. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704
10. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J-M, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36: 465-469
11. Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-552
12. Konagaya S (1982) Histological observation of jellied yellowfin tuna meat. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab* 106: 55-75 (in Japanese with English summary)
13. Konagaya S (1984) Studies on the jellied meat of fish, with special reference to that of yellowfin tuna. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab* 114:1-101 (in Japanese with English summary)
14. Abollo E, Novoa B, Figueras A (2005) SSU rDNA analysis of *Kudoa rosenbuschi* (Myxosporea) from the Argentinean hake *Merluccius hubbsi*. *Dis Aquat Org* 64: 135-139
15. Whipps CM, Diggles BK (2006) *Kudoa alliaris* in flesh of Argentinian hoki *Merluccius magellanicus* (Gadiformes; Merlucciidae) *Dis Aquat Organ* 69: 259-263
16. Funk VA, Raap M, Sojonky K, Jones S, Robinson J, Falkenberg C, Miller KM (2007) Development and validation of an RNA- and DNA-based quantitative PCR assay for determination of *Kudoa thyrsites* infection levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Org* 75: 239-249
17. Funk VA, Olafson RW, Raap M, Smith D, Aitken L, Haddow JD, Wang D, Dawson-Coates JA, Burke RD, Miller KM (2008) Identification, characterization and deduced amino acid sequence of the dominant protease from *Kudoa paniformis* and *K. thyrsites*; a unique cytoplasmic cysteine protease. *Comp Biochem Physiol B* 149: 477-489
18. Zhou LS, Li-Chan ECY (2009) Effect of *Kudoa* spores, endogenous protease activity and frozen storage on cooked texture of minced Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chem* 11: 1076-1082
19. Whipps CM, Kent ML (2006) Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). *J Eukaryot Microbiol* 53: 364-373

20. Burger MAA, Adlard RD (2011) Low host specificity in the Kudoidae (Myxosporea: Multivalvulida) including seventeen new host records for *Kudoa thalassomi*. *Folia Parasitol* 58: 1-16

F. 研究発表

・論文発表

1. 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
2. 佐藤 宏 (2012) 連載「動物病理学の今」第5回 最近話題の人獣共通寄生虫病. *病理と臨床* 30(8): 2-6
3. 佐藤 宏 (2012) 随伴侵入生物としての脊椎動物寄生蠕虫. *地球環境* 17(2): 183-192
4. 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
1. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食中毒. 公益法人愛知県獣医師会公衆衛生部会学術勉強会, 愛知県蒲郡市三谷町(サンヒルズ三河湾), (2012. 08. 05).
2. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食品—粘液胞子虫、住肉胞子虫、アニサキスを中心として—. 岡崎市保健所開設10周年記念事業(食品衛生月間)特別講演会, 愛知県岡崎市(岡崎市福祉会館), (2012. 08. 06).
3. 佐藤 宏: 生鮮海産魚の生食を原因とするクドア食中毒. 平成24年度獣医学術学会北海道地区学会シンポジウム, 江別市(酪農学園大学), (2012. 09. 06).
4. 佐藤 宏: 生活環境と寄生虫症. 山口県獣医師会平成24年度公衆衛生講習会, 山口市(山口県獣医師会館), (2012. 11. 17).
5. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食品—粘液胞子虫、住肉胞子虫、アニサキスを中心として—. 岐阜市保健所: 食の安全に関する講演会, 岐阜市(岐阜市福祉健康センター), (2012. 11. 22).

・講演・シンポジウム発表



図1 フィリピン国ミンダナオ島の Davao 市の生鮮魚市場に並ぶキハダマグロ

(上) 冷凍マグロは夜中に売り場に持ち込まれ自然解凍される

(下) 手頃な大きさに切り捌かれ売り場に並ぶマグロブロック。採材は尾部（矢印）から行い、調査における個体の重複を避けた。

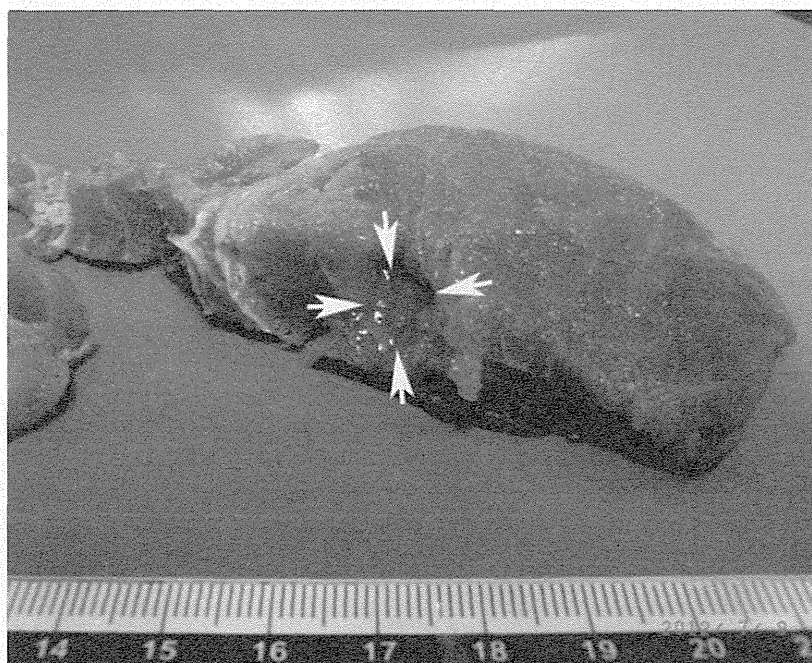


図2 キハダマグロ筋ブロックに見られた部分的
筋肉融解（矢印で囲む）。検体 Nos.27/28。

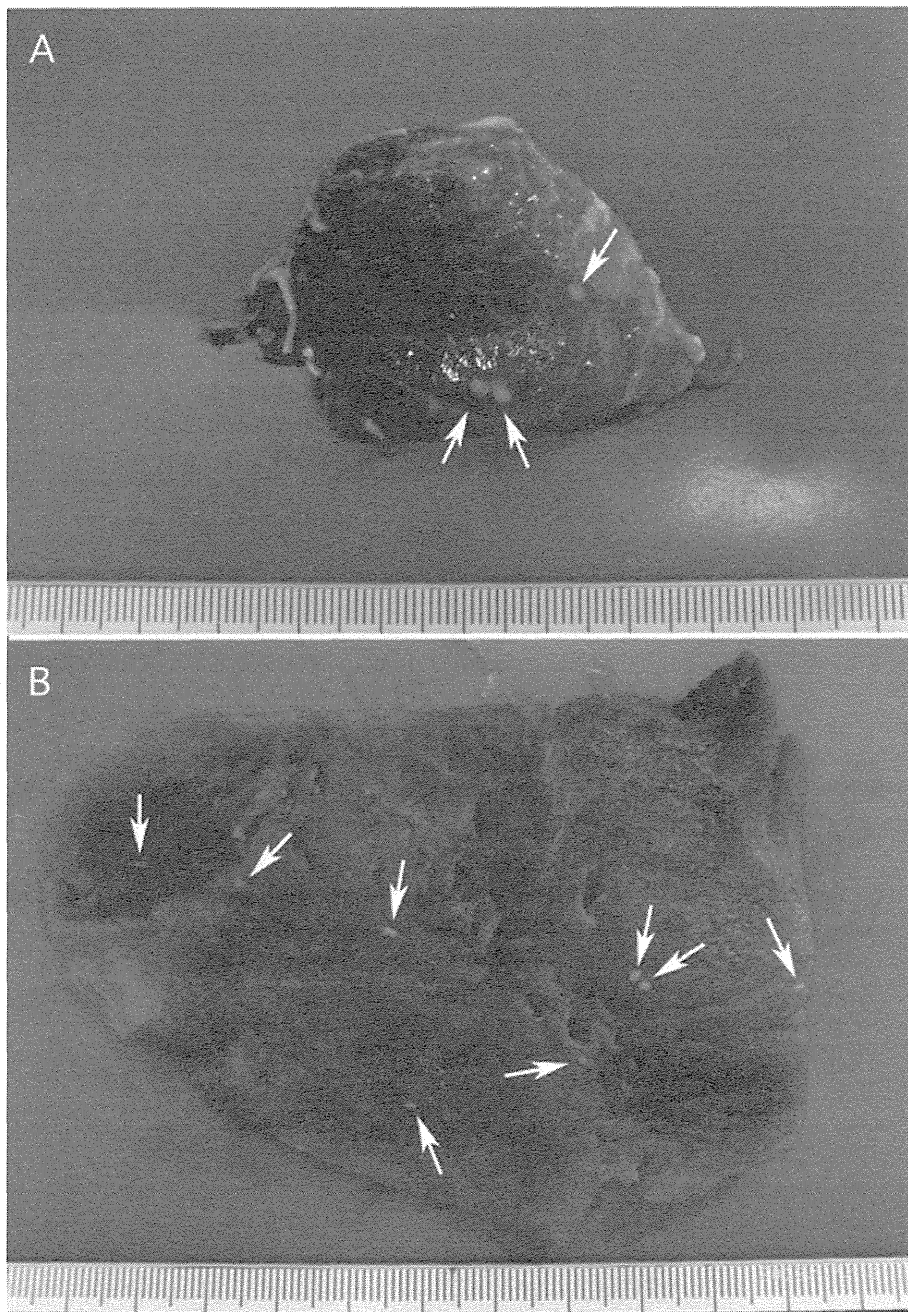


図3 キハダマグロ検体に見られたクドアによるシスト。
(上) 検体 30、(下) 検体 32。

1) ITS2 region

5' - CATTGTGTGT	TACAGGATCC	GAGTCCTTCT	TACATACTT	ACAT(1-2)	ACTT(1-2)
CAT(1-2)	ACTT(3-7)	AATGAGATGC	TTGACACGAC	ATTTTTTGAA	AGATGTTGAG
TTGAGTTGAG	TTGAGTAGTT	CTGTTATGTA	TGTGTGTTAT	GTTATGTTGT	TATGTATGTT
GAGTTGGAGG	GATGTTGGAT	AATGTAATGT	GGAGTTGGAG	TGGTCAAGAT	TGAGTTGATT
TATATATATAG	TGACTTTGCC	ATCACATGAA	TTGAATTAAC	TCACGAAGTG	ATACTTATGT
ATCATGTCAA	ATCAAATGAC	CACGCTCG	ACTG(3-5)	TTTTGTATTT	ACACACTTAT
TGTGTGGTGA	ACCGGTTGGT	GTCCTTTGAG	GTGTCACCG	GGCTGGCGCC	TATGCGCTGG
ATGTCCTAGT	ACGTGATCTA	CGATCTACGT	TACATTCATA	CAAATACAAC	GCAACGCATT
AATATAAAAA	TATCGGATTG	TCTGACTCTG	ACTTTGCTCC	TTGGAGTAAT	TA
AGTTG(2-3)	TTGAAGTGTA	GTTGATTGGC	GGATGTTTGA	ATGTTGTTGT	GTA
GTA(6-8)	ATAGTAGTAGC	GTGGATGTAC	TTTGGAGGTT	ATTGTATTTA	TAAATAAAAA
AATA -3'					

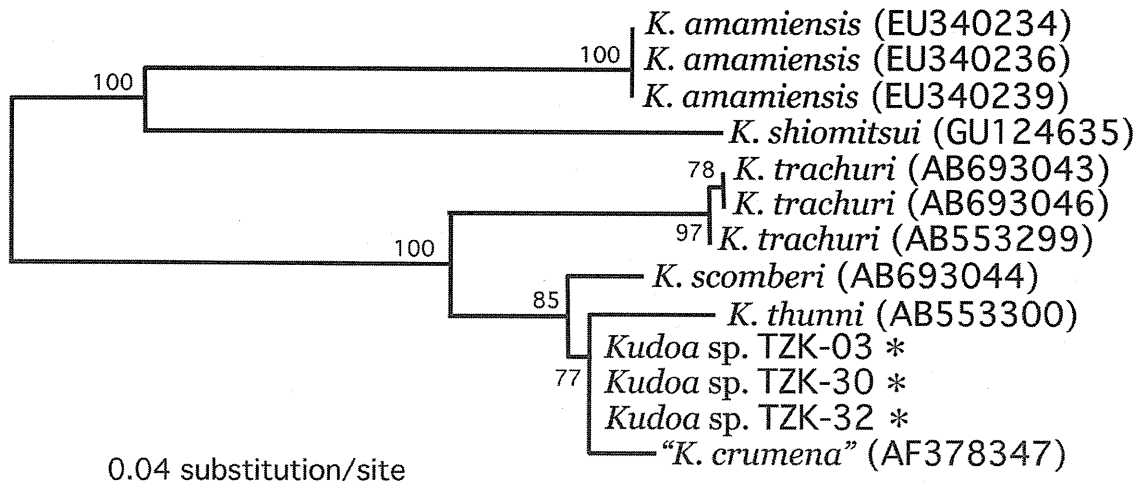
2) 5.8S rDNA

5' - TGACAACCGT	TAGCGGTGGA	TCACTCGGTT	CGTGTATCGA	TGAAGAACGC	GGCCAACCTGC
GATAATTGGT	GCGATTCGCA	GCGCCTAGTG	AGTCATTGAA	ATTTTGAATG	CAAATGGCAT
GCTGGATCTA	AACCCAGCAT	ATGTCTGGTT	GAGTGTGTC -3'		

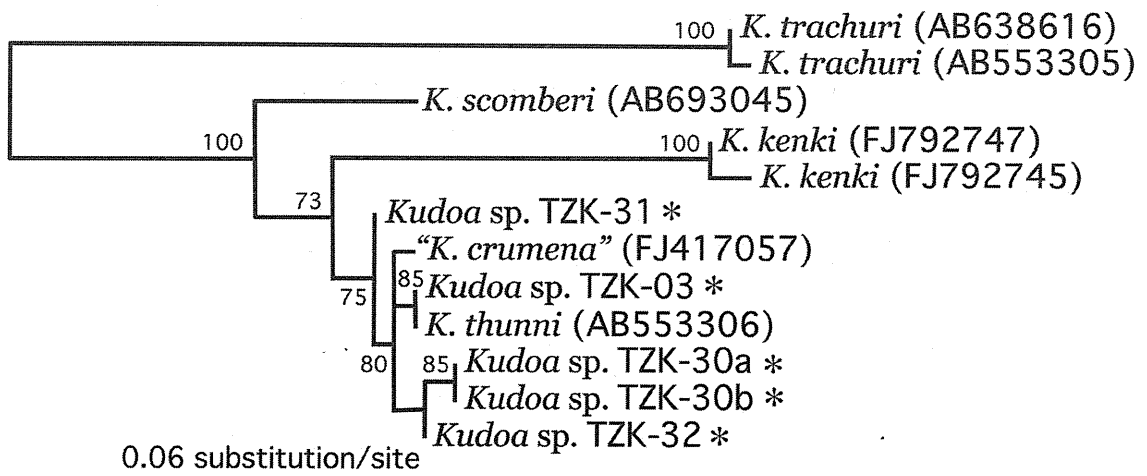
3) ITS2 region

5' - TGTATGTATA	CCTACACAAG	CTAAGCTGAT	CTGATGATTT	ATTCTACTAT	TCAGACGGTT
GTGTTGGACA	TGATCATTTG	TATTTGTGAG	TGTTGGCGAA	TGTGCGTTTT	GTGTGGTCAT
GTTCAGTGGG	ATTGGTGGTG	TGATTTGACG	GTCACCTCCAC	TCAAGTGTAT	CGATAGTACC
GCGGCGTCAA	CAAAGGCTCT	AAATCTAAAT	AAGCAATGTT	AATATTTATT	ATATTACATT
GGAGGCGAGG	TGAGGTGATT	GTTGAATGTG	TGATGTGTGG	CTAGATTAGA	TTTTAGAAAG
TCGAGTTCCT	GTCGTCGTTG	GACTATTGAC	AAATTACTTT	ATATTGTATG	ATGGATGGAT
GCATGGATGC	ATGG	TG(7-9)	AAGTGATTTG	TACACGGCTT	TTGATTTTGT
GTGGAATGTC	GTTTAAAT	GT(5-6)	TGGGAAGCAT	AGCGTGTATT	CAAATCGACT
TCAGGTGAGG	TGAGGAAGGA	GAATATACAT	GTAATGATGAA	TGAATGAATT	-3'

図4 Kudoa neothunni メジマグロ分離株(4検体)でみられたITS領域の変異
太文字で示した反復塩基単位が括弧内に示した回数繰り返される。



(A) PhyML phylogenetic tree based on 18S rDNA



(B) PhyML phylogenetic tree based on 28S rDNA

図5 シストを形成する4極囊/殻片をもつクドア種の最尤法系統樹

(A) 18S rDNA による (B) 28S rDNA による

表1. クドア粘液胞子虫の18S rDNA/28S rDNAの増幅とシーケンスに用いたプライマー一覧

増幅断片 番号	プライマー名 ^a		塩基配列	アニーリング 温度	5'末端 塩基位置 ^b
	増幅用	シーケンス用			
1	F: NSF4/18		5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	64°C	4
	R: KUDOA-SSU926R		5'-AAACACTCTTGGCGAATGCT-3'		933
		R: NSR581/18	5'-TCTCAGGCTCCCTCTCCGG-3'		382
2	F: NSF573/19		5'-CGCGGTAATCCAGCTCCA-3'	64°C	555
	R: S.r.18S-SSU18R		5'-TGATCCTTCYGCAGGTTAC-3'		1,740
		F: NSF1419/20	5'-ATAACAGGTCTGTGATGCCC-3'		1,380
3	F: NSF1419/20		5'-ATAACAGGTCTGTGATGCCC-3'	62°C	1,380
	R: Kudoa-28S-113R		5'-TCCGGGAAGATTAAACGATG-3'		3,263
		NC13R(ITS2)/F	5'-ATCGATGAAGAACGCAGC-3'		2,482
		NC13R(ITS1)/R	5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'		2,499
4	F: NSF1419/20		(see above)	62°C	1,380
	R: Kudoa-28S-275R		5'-AGGTTGCAGTCCCAAACAAC-3'		3,429
		NC13R(ITS2)/F	(see above)		2,482
		NC13R(ITS1)/R	(see above)		2,499
5	F: KUDOA-Kt28S1F		5'-CAAGACTACCCTGCTGAAC-3'	62°C	3,150
	R: KUDOA-28S-795R		5'-CTGTSTTTCAAGACGKGTCTG-3'		3,927
5'	F: KUDOA-Kt28S2F		5'-AGGCAAGACTACCTGCTGAAC-3'	62°C	3,147
	R: KUDOA-28S-795R		5'-CTGTSTTTCAAGACGKGTCTG-3'		3,927
6	F: KUDOA-Kt28S1F		(see above)	64°C	3,150
	R: NLR2362/20		5'-ACATTCAGAGCACTGGGCAG-3'		5,641
6'	F: KUDOA-Kt28S2F		(see above)	64°C	3,147
	R: NLR2362/20		5'-ACATTCAGAGCACTGGGCAG-3'		5,641
		R: 28S-1284R	5'-GTTGATTCGGCAGGTGAGTT-3'		4,566
		R: 28S-2132R	5'-AGAGGCTGTTACCTTGGAG-3'	5,221	
7	F: NLF3090/24		5'-AGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGAC-3'	62°C	-194
	R: Mbseq2r		5'-CCTTGGTGAGCCACTACCTC-3'		330

^a 増幅用プライマーは"for amplifying"で示し、シーケンス用のみのプライマーを"for sequencing"で示した。

^b *Kudoa neothunni* rDNA sequence (DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号AB693042)上でのプライマー5'末端の塩基位置。

表2. キハダマグロ体側筋に形成されたクドア粘液胞子虫シストのサイズ

Sample No.	Species	収集者	収集日	個体番号	宿主	場所	検体重量(g)	確認されたシスト数	シストサイズ (mm)*
3	<i>Kudoa cf. thunni</i>	都築	2011.8.25	—	キハダマグロ	?	—	1	—
29	<i>Kudoa cf. thunni</i>	都築	2011.8.17	0-1	キハダマグロ	不明	70	1	1.65 × 1.50 (n=1)
30	<i>Kudoa cf. thunni</i>	都築	2011.4.12	0-2	キハダマグロ	不明	19	14	2.04±0.27 (1.70-2.39) × 1.55±0.22 (1.36-1.93) (n=5)
31	<i>Kudoa cf. thunni</i>	都築	2009.2.5	0-3	キハダマグロ	不明	206	>11	0.83±0.34 (0.44-1.42) × 0.60±0.17 (0.44-0.87) (n=7)
32	<i>Kudoa cf. thunni</i>	都築	2011.7.25	0-4	キハダマグロ	不明	40	>25	1.25±0.29 (0.76-1.98) × 0.97±0.22 (0.59-1.48) (n=14)

* 平均±標準偏差(範囲)

表3. メジマグロならびにキハダマグロから検出した*Kudoa neothunni*の18S rDNA塩基配列の比較

Sample No.	Species	収集者	収集日	個体番号	宿主	場所	備考	18S rDNA											遺伝子型		
								32	83	99	185	324	424	650	661	675	859	1032		1321	1667
1	<i>Kudoa neothunni</i>	小西	2011.12.9		メジマグロ	?		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	B
2	<i>Kudoa neothunni</i>	小西	2011.12.22		メジマグロ	?		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	B
4	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.1.19		キハダマグロ	?		T/C (8:4)	A	A	G	A	A	T	T	C/T (21:3)	T	C	G	A	B
5	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D4	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T			T	Y
6	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D5	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	G(7)	T	T	C	T			A	B
7	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D8	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	A	T/C (4:4)	T	C	T	C	A	T	Y
8	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D10	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T			T	Y
9	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D12	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T			T	Y
10	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D14	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.			A	A	G	A	A	T	T/G (4:6)	C	T				?
11	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D21	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.														T	Y
12	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T2	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		T	A	A/G (12:4)	G	A	A	T	T	C	T			T	Y
13	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T18	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.			A	A	G	A	A	T	T	C	T	C			?
14	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T19	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T/C (9:3)	C			?
15	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T20	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T				
17	<i>Kudoa neothunni</i>	大西	2012.6.4		メジマグロ	?(金沢)		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	B
18	<i>Kudoa neothunni</i>	大西	2012.6.4		メジマグロ	?(金沢)		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	B
19	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	30	キハダマグロ	インドネシア		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C/T (3:1)	A	T	Y
20	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	30	キハダマグロ	インドネシア		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C/T (5:1)	A	T	Y
21	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	45	キハダマグロ	パプアニューギニア		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	?
22	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	46	キハダマグロ	パプアニューギニア		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	A	T	B
23	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	47	キハダマグロ	タイ		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	A	T	Y
24	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	47	キハダマグロ	タイ		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	A	T	Y
25	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	48	キハダマグロ	タイ		T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	A	T	Y
26	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.7	59	キハダマグロ	タイ		T	A/G (5:3)	A	G	A	A	T	T	C	T	C	A	T	Y
27	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2011.8.17	0-1	キハダマグロ	?	ジェリーミート	T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	B
28	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2011.8.17	0-1	キハダマグロ	?	正常筋線維内	T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	G	A	B
	<i>Kudoa neothunni</i>	Lih et al. (2013)		AB693042	メジマグロ	?		T	A	A	R	R	A	T	T	C	T	C	G	A	B
	<i>Kudoa neothunni</i>	Lih et al. (2013)		AB693049	キハダマグロ	Mindanao Is.	ジェリーミート	T	A	A	G	A	A	T	T	C	T	C	A	T	Y
	<i>Kudoa neothunni</i>	Abe et al (2013)		AB698884	キハダマグロ	?			A	G	A	A	A	T	T	C	T	C	A		Y

表4. メジマグロならびにキハダマグロから検出した*Kudoa neothunni*の28S rDNA塩基配列の比較

Sample No.	Species	収集者	収集日	個体番号	宿主	場所	備考	28S rDNA																遺伝子型
								1	178	216	259	297	504	554	566	567	587	638	664	670	682	723	726	
1	<i>Kudoa neothunni</i>	小西	2011.12.9		メジマグロ	?		A	T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B
2	<i>Kudoa neothunni</i>	小西	2011.12.22		メジマグロ	?		A	T	A/G (6:3)	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T/C (5:3)	G	C	G	B
4	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.1.19		キハダマグロ	?		T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
5	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D4	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
6	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D5	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
7	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D8	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
8	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D10	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
9	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D12	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
10	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D14	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
11	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2011.12.19-20	D21	キハダマグロ	Davao, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
12	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T2	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	A/G (4:2)	T	A	Y	
13	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T18	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A					B	
14	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T19	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
15	<i>Kudoa neothunni</i>	Sato & Lea	2012.2.12-13	T20	キハダマグロ	Mati, Mindanao Is.		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
17	<i>Kudoa neothunni</i>	大西	2012.6.4		メジマグロ	? (金沢)		A	T	A	A	A/G (5:4)	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B
18	<i>Kudoa neothunni</i>	大西	2012.6.4		メジマグロ	? (金沢)		A	T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B
19	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	30	キハダマグロ	インドネシア		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
20	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	30	キハダマグロ	インドネシア		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
21	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	45	キハダマグロ	パプアニューギニア		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
22	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	46	キハダマグロ	パプアニューギニア		T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
23	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	47	キハダマグロ	タイ		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
24	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	47	キハダマグロ	タイ		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
25	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.2	48	キハダマグロ	タイ		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
26	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2012.2.7	59	キハダマグロ	タイ		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	
27	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2011.8.17	0-1	キハダマグロ	?	ジェリーミート	T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
28	<i>Kudoa neothunni</i>	都築	2011.8.17	0-1	キハダマグロ	?	正常筋線維内	T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
	<i>Kudoa neothunni</i>	Lih et al. (2013)		AB693042	メジマグロ	?		A	T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B
	<i>Kudoa neothunni</i>	Abe et al (2013)		AB710385	メジマグロ	?		T	A	A	A	C	C	C	A	C	A	G	T	G	C	G	B	
	<i>Kudoa neothunni</i>	Lih et al. (2013)		AB693049	キハダマグロ	Mindanao Is.	ジェリーミート	G	A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y
	<i>Kudoa neothunni</i>	Abe et al (2013)		AB698885	キハダマグロ	?		A	A	G	A	T	T	T	G	G	G	A	T	G	T	A	Y	

表5. キハダマグロ体側筋にみられたシスト形成4極囊グドア種と近縁種のrDNA塩基配列の同一性比較 (%)

(a) 18S rDNA (1,629塩基長)

	1. <i>Kudoa</i> sp. TZK-3	2. <i>Kudoa</i> sp. TZK-30	3. <i>Kudoa</i> sp. TZK-32	6. ' <i>K. crumena</i> ' (AF378347)	5. <i>K. thunni</i> (AB553300)	4. <i>K. scomberi</i> (AB693044)	7. <i>K. trachuri</i> (AB693046)
1. <i>Kudoa</i> sp. TZK-3	—						
2. <i>Kudoa</i> sp. TZK-30	100	—					
3. <i>Kudoa</i> sp. TZK-32	100	100	—				
6. ' <i>K. crumena</i> ' (AF378347)	99.4	99.4	99.4	—			
5. <i>K. thunni</i> (AB553300)	98.7	98.7	98.7	98.1	—		
4. <i>K. scomberi</i> (AB693044)	98.7	98.7	98.7	98.0	97.7	—	
7. <i>K. trachuri</i> (AB693046)	94.8	94.8	94.8	94.1	93.5	94.8	—

(b) 28S rDNA (625塩基長)

	1. <i>Kudoa</i> sp. TZK-3	2. <i>Kudoa</i> sp. TZK-30a	3. <i>Kudoa</i> sp. TZK-30b	4. <i>Kudoa</i> sp. TZK-31	5. <i>Kudoa</i> sp. TZK-33	6. ' <i>K. crumena</i> ' (FJ417057)	7. <i>K. thunni</i> (AB553306)	8. <i>K. scomberi</i> (AB693045)
1. <i>Kudoa</i> sp. TZK-3	—							
2. <i>Kudoa</i> sp. TZK-30a	99.2	—						
3. <i>Kudoa</i> sp. TZK-30b	98.4	99.0	—					
4. <i>Kudoa</i> sp. TZK-31	99.5	99.5	98.7	—				
5. <i>Kudoa</i> sp. TZK-32	99.4	99.7	98.9	99.5	—			
6. ' <i>K. crumena</i> ' (FJ417057)	99.5	99.4	98.6	99.7	99.5	—		
7. <i>K. thunni</i> (AB553306)	99.8	99.4	98.6	99.7	99.5	99.7	—	
8. <i>K. scomberi</i> (AB693045)	95.8	95.7	95.0	96.5	95.7	96.0	96.0	—

分 担 研 究 報 告 書

シカ肉が共通食の有症苦情事例における原因病原物質としての
住肉胞子虫の同定と、捕獲ホンドジカにおける住肉胞子虫汚染調査

鎌田 洋一

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

シカ肉が共通食の有症苦情事例における原因病原物質としての住肉胞子虫の同定と、
捕獲ホンドジカにおける住肉胞子虫汚染調査

研究分担者 鎌田 洋一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）
研究協力者 青木 佳代（滋賀県衛生科学センター）
研究協力者 石川 和彦（滋賀県衛生科学センター）
研究協力者 林 賢一（滋賀県衛生科学センター）
研究協力者 斉藤 守弘（埼玉県食肉衛生検査センター）
研究協力者 小西 良子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）
研究協力者 渡辺 麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

馬肉を喫食しての食中毒の原因が、*Sarcocystis fayeri* 住肉胞子虫であることが明らかになった。*S. fayeri* の特定のタンパク質が食中毒症状を誘起することも明らかとなっている。同胞子虫は中間宿主として草食動物に寄生する。野生動物も例外ではない。馬肉、すなわち馬刺しと同様の喫食形態をもつ動物種にシカがある。シカにも住肉胞子虫は寄生する。平成 23 年に発生したシカ肉を喫食しての有症苦情事例を分析した。食中毒細菌およびウイルス検査を実施したが、病原体は特定できなかった。厚労省の指示にあった、馬肉中の住肉胞子虫検査法を同患者喫食シカ肉に適応した。その結果、遺伝子検査陽性、顕微鏡検査陽性だった。組織標本を作製し、抗毒性タンパク質で免疫染色を行ったところ、同タンパク質の局在が確認された。患者喫食シカ肉は、エゾシカ肉で冷蔵流通されていた。本事例を、住肉胞子虫を含んだ冷蔵シカ肉が原因の苦情事例と診断した。当該シカ肉には 9~25 シスト/cm² の寄生が見られた。このシカ肉喫食住肉胞子虫食中毒事例は、本邦初の報告となる。

シカは数が過剰となり有害獣でもある。駆除と同時にシカ肉の有効利用が特定の自治体では推奨されている。本州の 2 地域で捕獲され、食用に供されているシカについて、住肉胞子虫の寄生状況を調査した。50 頭および 30 頭の検査を行ったが、すべての個体の横隔膜肉片中に、住肉胞子虫のシストを確認した。シスト数を計測したところ、2~90 シスト/cm² を示した。事例の馬肉や上記シカ肉中のシスト数を上回る個体があり、シカ肉には住肉胞子虫の危害があると判断された。今後詳細なシカ肉の住肉胞子虫寄生調査が必要である。

A. 研究目的

近年、食後数時間程度（4～8時間）で一過性の下痢や嘔吐が起こり、翌日には回復するといった比較的軽症の有症事例が全国的に報告されている¹²⁾。厚生労働省がこのような事例について全国調査を実施したところ、患者が摂取した共通食として生食用鮮魚介類以外では馬刺しが含まれていた事例があり、有症事例に関連した馬刺しの残品から住肉胞子虫の1種である *Sarcocystis fayeri* の感染が認められた¹¹⁾。これを受けて、*S. fayeri* が原因と考えられる有症事例は、新たに食中毒事例として取り扱う旨の通知が、平成23年6月に厚生労働省医薬食品局食品安全部長から出されたところである⁶⁾。*S. fayeri* の腸管毒性を説明する物質として、同住肉胞子虫がもつ15kDaタンパク質が同定されている³⁾。

住肉胞子虫は筋肉内にシストを形成する原虫で、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ等の家畜の筋肉部位に寄生している⁵⁾。住肉胞子虫の寄生は家畜に限られたものではなく、イノシシやシカ等野生動物にも寄生する。野生のシカについては *Sarcocystis* 属の寄生状況が報告されている^{1, 12, 14)}。最近では、シカなどの野生動物を食肉として有効活用する取り組みも活発化しているが、一方ではE型肝炎ウイルス等、ヒトに健康被害を与える病原体の存在も指摘されている⁷⁾。今回、一過性の嘔吐、下痢の食中毒様症状を呈した有症苦情で、エゾジカに寄生している *Sarcocystis* 属の関与が疑われ

た事例について報告する。

B. 研究方法

B-1. 疫学情報の収集と検体採取

滋賀県彦根保健所および長浜保健所の協力で、事例情報が収集された。また、患者喫食残品が採取された。

B-2. シカ肉中の病原物質探査

1. 各種検査の対象検体

報告された施設厨房のふきとり10検体、検食19検体と原材料（シカ生肉）1検体を含む食品20検体、従事者便17検体および患者便3検体を材料とした。

2. 検査項目と検査方法

2-1. 細菌検査

すべての対象検体について、既法の方法^{4, 10)}により、病原ビブリオ属菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、腸管出血性大腸菌0157、病原大腸菌、エロモナス、プレシオモナス、カンピロバクター、ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌、およびセレウス菌の検査を実施した。

2-2. ノロウイルス検査

患者および従事者便について、厚生労働省通知⁸⁾のリアルタイムPCR法に準拠してノロウイルスの検査を行った。

2-3. *Sarcocystis* 属遺伝子検査

原材料のシカ肉については、厚生労働省通知⁹⁾中の「生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法（暫定法）」に準拠して *Sarcocystis* 属のPCRおよび顕微鏡による

検査を行った。搬入されたシカ肉は3ブロックあり、それぞれのブロックを個別に検査した。すなわち、1ブロックあたり、3ヵ所以上から肉片を切り出し、それらをミンチ状(約3g)にした。各々からDNAを抽出とした。DNA抽出精製はQIAmp DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いた。そのDNA抽出用肉片1試料についてDNAの抽出精製を2検体実施し、PCRを行った。陰性対照は精製水を用いた。陽性対照のテンプレートは国立感染症研究所 八木田健司博士より分与を受けた。

2-4. *Sarcocystis* 属シストおよびブラディゾイトの顕微鏡検査

シカ肉中のシストおよびブラディゾイトの確認検査は暫定法⁹⁾の顕微鏡による検査に従い、ストマッキングした肉片を検鏡し、シストおよびブラディゾイトの確認を試みた。

別法として、ピンセットを用いてごく少量の肉片を摘出し、肉片をスライドグラス上のPBS(一滴)に浮遊させ、カバーグラス上から圧弊後、光学顕微鏡で観察した。

2-5. シカ肉の組織標本作製

シカ肉片を切り出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した組織標本作製した。光学顕微鏡下で、シカ肉1平方センチメートル当たりのシスト数を計測した。

2-6. *Sarcocystis* 属が有する毒性タンパク質の検査

*S. fayeri*の病原性が15kDaタンパク質に

よって担われていることが明らかになっている。同タンパク質に対するウサギ抗血清を用いて、シカ肉の薄切切片について、ベントナXTシステム(Roche)およびI-VIEW DABユニバーサルキット(Roche)による免疫組織化学染色を実施し、シストおよびブラディゾイト中に同毒性タンパク質が存在するか否か検討した。

3. 患者便からの *Sarcocystis* 属遺伝子検査

患者便は、QIAmp DNA Mini KitでDNAを抽出精製し、シカ肉と同様、馬肉の暫定法⁸⁾に準じて *Sarcocystis* 属に対するPCRを行った。

4. シカ肉についての聞き取り調査

提供されたシカ肉の調理状態について聞き取り調査を行ったところ、シカ肉は加熱不十分であったことが推察された。

B-2 野生シカの住肉胞子虫汚染

1. シカ肉の入手

本州で捕獲されたホンドシカが、地元シカ肉処理場に搬入され処理され通信販売されていた。同シカ肉処理場は、自治体のシカ肉処理マニュアルに沿って設置されたもので、解体についてもマニュアルに従って行なわれていた。同シカ肉処理場を見学調査したところ、適切な衛生的な処理が実施されていた。検体は、シカの横隔膜部分の肉片で、50頭分を入手した。肉片は冷凍状態で送付された。

上記とは異なる地域で捕獲されたホンドシカ30頭が、埼玉県食肉衛生検査所に搬

入された。同シカより横隔膜部分を採取した。

2. *Sarcocystis* 属シストの計数

横隔膜肉片を解凍後、あるいは解体処理後、ホルマリン固定し、常法に従い、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した組織標本を作製した。1個体のシカ肉片から五カ所を切り出した。各カ所の1平方センチメートル当たりのシスト数を計数し、平均値としてシストの総数を得た。

C. 研究結果

C-1 有症苦情事例の概要

平成23年12月2日に滋賀県内の飲食店で食事をしたグループの中に、食中毒症状を呈している者が複数名いると滋賀県の所管保健所に連絡があった。調査を行ったところ、1グループの18名中4名が食後5時間から15時間後に下痢や嘔吐等の食中毒症状を呈していることが判明した。有症者4名については、12月1日の当該施設の喫食以外に共通行動はなかった。

共通の食事は前菜(ほうれん草、しめじ、ベーコン蒸し、鯖寿司、生姜、柿なます)、椀盛り(うずらしんじょう、焼きネギ)、造り(ヨコワ、鯛、あしらい)、焼き物(天然エゾジカ、コブ高菜、信長ネギ、いぶりがっこ、生姜あん)、なめこおろし手打ちそば、蒸し物(鯛骨蒸し、九条ネギ、椎茸、豆腐)、カニご飯、赤だし、香の物、デザート(冷製完熟柿、生クリーム)で、会食時間は平

成23年12月1日の12時30分から14時の間であった。

有症者の発症日時、潜伏期間、症状等をTable 1に示す。本事例は潜伏時間が短く、症状も比較的軽く翌日午後には、全員回復していた。

施設の状況は、食品衛生監視員が立入調査を実施したが、衛生状況は特に問題はなかった。従事者17人についても全員健康であった。また、他の利用者からの苦情はなかった。

原材料のシカ肉の流通と取扱いは、平成23年11月26日に提供施設が北海道内の精肉店からエゾシカのロースブロック肉(50cm×15cm×15cm程度)を直接仕入れていた。提供日(平成23年12月1日)の午前中に1人分(10cm×5cm×2cm程度)にカットして下味をつけ冷蔵庫に保管し、提供直前に串打ちし、炭火で焼き、スライス(5~6枚)して盛りつけられ、提供されており、流通から調理直前までチルド(冷蔵)で温度管理されていた。

C-2 シカ肉中の病原物質探査

1. シカ肉の微生物検査

すべての検体で、既知の食中毒原因菌およびノロウイルスは検出されなかった。

2. シカ肉の *Sarcocystis* 属検査

シカ肉より抽出したDNAから定性PCRを行った。搬入されたシカ肉の3ブロックすべてから、約1,100bpの位置に *Sarcocystis* 属遺伝子の増幅を確認した(図1)。

シカ肉が PCR 陽性となったので、顕微鏡による検査を行った。暫定法にしたがって、シカ肉をストマッキングし、その上清について、光学顕微鏡下でブラディゾイドの確認検査を実施したが、夾雑物が多くブラディゾイドは確認できなかった。次に、肉片について実体顕微鏡下で *Sarcocystis* 属シストの検索を行ったが、シストを判別・分離することはできなかった。そこで、筋束を分離し、その一部（ごく少量）の小片をスライドグラスにのせ、PBS を滴下したのち、カバーグラスで覆って圧斃し、光学顕微鏡下でシストおよびブラディゾイドを探索したところ、シストおよびブラディゾイドを検出した（図 2）。また、シカ肉の組織標本作製、顕微鏡検査を行ったところ *Sarcocystis* 属のシストを確認した（図 3）。検出された *Sarcocystis* 属のシストは複数種の形態を示していた。光学顕微鏡による生鮮シストおよび組織標本の形態的特徴から、一つは、シスト壁が厚く、柵状構造物が観察され、*S. sybillensis* と同定された。もう一つは、シスト壁が薄く、表面に毛状突起を有しており、*S. wapiti* と同定された。さらに、新種と推察される *Sarcocystis* 属のシストが組織標本から発見された。組織標本からのシスト数の計測結果を表 2 に示す。*S. wapiti* の寄生が多く、総シスト数は 9~25/cm² で、ブロック毎のシストの分布にばらつきがあった。

S. fayeri の 15kDa タンパク質に対するウサギ抗血清による免疫組織化学染色を行っ

たところ、シカ肉中の *S. sybillensis* および *S. wapiti* のブラディゾイドが染色され、*S. fayeri* と同様の 15kDa タンパク質の存在が確認された。

C-3 ホンドシカの住肉胞子虫汚染

本州の 2 地域で捕獲されたホンドシカ、50 および 30 頭について、横隔膜肉片中の *Sarcocystis* 属のシスト数を計数した。*Sarcocystis* 属の種は勘案せず、その平均総数を求めた。表 2 にシスト数を示す。2 地域におけるシカの、合計 80 個体すべてから、住肉胞子虫のシストが検出された。その総シスト数は、平方センチメートル当たり 2 から 93 と大きくばらついていた。50 頭を検査した地域のシカについて、10 個体あたりのピッチでシスト数と個体数の関係をみると、10 シスト以下が最多グループとなっていた。中央値は 11-20 シストとなった。41 から 70 シストおよび、91 から 100 シストのグループにそれぞれ一頭ずつ分布していた。

一方、上記とは別地域の 30 個体の調査では、最少 5、最大 32 シストと、50 個体を調査した地域に比べ、シストの数が少なく、かつ、最多シスト数も小さかった。中央値は 11 から 20 シスト内となった。全体に、30 個体を調査した地域の、住肉胞子虫汚染度は、50 個体調査地域のそれにくらべ低かった。

D. 考察

D-1 エゾシカ肉中の病原因子

野生動物であるイノシシやシカの肉を生で喫食したことによる食中毒としては、これまでにE型肝炎ウイルスの感染事例が報告されており、喫食する際の注意および啓発について通知されている⁷⁾。

Sarcocystis 属については以前から、ヒトを終宿主とし牛肉から感染する *S. hominis*、豚肉から感染する *S. suihominis* が食品衛生上重要な寄生虫とされている。また、*S. cruzi*、*S. miecheriana* などイヌ科を終宿主とし、ウシ、ブタを中間宿主とするものなど、多くの動物に寄生していることが知られている^{2, 14)}。さらに、馬肉に寄生している *S. fayeri* には、食中毒症状を呈する物質が含まれていることが確認され、馬刺しの食中毒原因物質として取り上げられたところである。

今回、潜伏期間が短く（約5～15時間）、症状も一過性の下痢や嘔吐で、馬刺しと同様の食中毒症状を呈していたことから、原材料のシカ肉の残品について *Sarcocystis* 属の検査を実施したところ *Sarcocystis* 属が確認された。Table 2 に示すように、同一個体のブロックであるにもかかわらず、シストの分布はバラツキがあるので、検査には、できるだけ多くの箇所から肉片を切り出し、均一にした試料で PCR を実施することが望ましいと考えている。

Sarcocystis 属の検査は、馬肉の暫定法⁹⁾にしたがって行ったが、実体顕微鏡検査法

では、脂肪や繊維組織とシストの分別は困難であった。また、ストマッキングした検体は、組織由来の夾雑物が多く、光学顕微鏡でブラディゾイドの確認が困難であった。今回、シストおよびブラディゾイドの確認は、肉片を少しずつ剥がすようにとり、スライドグラスにのせ、少量のPBSまたは生理食塩水を滴下し、カバーグラスの上から、軽く肉片を圧迫し、光学顕微鏡で観察することにより、シストを発見することができた。この方法では、組織や脂肪などの夾雑物とシストおよびブラディゾイドとの区別が比較的容易であった。したがって、PCR陽性検体については、できるだけ多くの肉片を圧弊後、光学顕微鏡で観察することにより、シストおよびブラディゾイドを確認することが可能であると思われる。

S. cruzi や *S. fayeri* で、ウサギに下痢等の腸管毒性を引き起こすタンパク質が、同じ分子量 15kDa タンパク質であり、*Sarcocystis* 属に共通して含まれる毒性タンパク質である可能性があること、またその15kDa タンパク質は原虫が保有するタンパク質と相同性があることが明らかとなっている³⁾。*S. fayeri* の15kDa タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の反応から本事例のシカ肉中の *Sarcocystis* 属にも病原性を担っている15kDa タンパク質があることが示唆された。

このことから、シカ肉に寄生している *Sarcocystis* 属の腸管毒性を引き起こすタンパク質により、食中毒様症状を呈したこと

が強く示唆される。シカ肉は生食として提供されていたのではなく、「焼き物」（天然エゾシカのロースステーキ）として提供されていた。*Sarcocystis* 属の毒性は、シストを構成するタンパク質であり、冷凍、加熱により失活するとされている³⁾。ステーキとして提供されたシカ肉は、調理されるまで新鮮さを保つためにチルド状態で輸送・保存されていた。また、提供されたステーキの加熱状態は聞き取り調査から加熱不十分であったことが推察できた。加熱が十分されていた場合、病原性タンパク質の毒性が保持されている可能性は低いと思われる。したがって、喫食されたシカ肉の中心部まで十分に加熱されていなかったために病原性タンパク質が失活せず、毒性が保持され、食中毒様症状を引き起こした可能性が呈したものと考えられる。また、3 ブロックのシカ肉はシストの分布にバラツキがあったことから、同じ個体であっても、シストおよびブラディゾイドの量が異なるため、発症率などに差がでることが考えられる。

病原性を担っている *S. fayeri* の 15kDa タンパク質に対する抗体を用いた分析によると、*S. fayeri* 以外の *Sarcocystis* 属にも同種のタンパク質が存在することが明らかになっている（斉藤ら、私信）。今回、シカ肉から検出した *Sarcocystis* 属にも免疫組織化学染色の反応から同種のタンパク質の存在が確認できた。しかしながら、今回の事例は、エゾシカ肉に寄生している *Sarcocystis* 属の関与が強く疑われたものの、食中毒原因物

質に指定された *S. fayeri* とは異なった種類であったこと、単一グループのみの発症で症状が軽度であり、回復も早かったことから、この施設で提供された食事による食中毒であると断定はできず、有症苦情として処理された。

本事例のエゾシカ同様、ホンシュウジカにも *Sarcocystis* 属が寄生していることが報告されている^{1, 15)}。シカ肉および馬肉に限らず、獣肉類には *Sarcocystis* 属の寄生が疑われ、*Sarcocystis* 属が寄生した肉を生食あるいは不十分な加熱調理で喫食することにより、食中毒様症状を呈する可能性が示唆される。

最近では、鳥獣被害対策のひとつとしてシカなどの野生動物の肉がジビエ料理として有効利用されており、今後、それらの肉の摂取に関連した有症事例について、馬肉と同様に食中毒事例として認知されるよう、病因物質の特定や検査法などの研究が必要である。

また、肝炎ウイルスや *Sarcocystis* 属を含めた寄生虫の感染防止および食肉としての安全性を保つためには、肉の生食を避け、十分に加熱調理することが重要であると考えられる。

D-2 野生シカの住肉胞子虫汚染

本州における2地域の、50 および 30 頭のシカの横隔膜肉片について、組織標本作製した。住肉胞子虫の種は問わず、その総数を計測した。2地域の合計 80 頭すべて