

表 4. 韓国産のナナホシクドアの系統分類 (2013年11月1日受領検体)

サンプルNo.	kudoa 量	cox1遺伝子型	1-rRNA遺伝子型
Y-10	4.20×10 ⁵	1	1
Y-11	1.40×10 ⁵	1	1
Y-14	0.50×10 ⁴	1	1
661629090-1	1.74×10 ⁶	1	1
Y-15	1.23×10 ⁵	1	1
66167159	0.48×10 ⁴	2	1
66168525	0.93×10 ⁴	1	1
YC-17	4.10×10 ⁴	1	1
661682018	0.64×10 ⁴	1	1
66185653-3	1.54×10 ⁶	1	1
66195146-1	1.08×10 ⁵	1	1
66195627-1	3.44×10 ⁴	1	1
66198538-2	7.97×10 ⁴	1	1
66198716	1.72×10 ⁴	1	1
66199796-1	6.43×10 ⁴	1	1
66200104-3	1.16×10 ⁵	1	1

表 5. 愛媛事例のナナホシクドアの系統分類 (2013年11月1日受領検体)

サンプル No.	kudoa 量	食中毒症状	cox1遺伝子型	I-rRNA遺伝子型
1-2	5.83×10^6	有症	1	2
2-2	2.78×10^6	有症	2	2
2-3	2.20×10^6	有症	1	1
3-3	1.48×10^6	有症	2	2
3-4	1.80×10^6	有症	2	2
3-5	9.63×10^6	有症	1	1
6	3.78×10^6	有症	1	1
7	2.00×10^4	有症	1	1
8	3.78×10^6	有症	2	2
9	1.43×10^6	有症	2	2
10	7.20×10^5	有症	2	2
15-2	4.62×10^5	無症	1	1
16-1	7.03×10^4	無症	2	2
16-4	7.64×10^5	無症	1	1
17-1	9.49×10^4	無症	2	2
172	1.24×10^6	無症	mixed	2
17-6	2.29×10^5	無症	2	2
19-1	8.50×10^5	無症	2	2
19-2	4.73×10^4	無症	1	1
19-3	1.38×10^5	無症	2	2
21-2	1.27×10^6	無症	2	2
21-3	4.63×10^6	無症	2	2
22-1	1.36×10^4	無症	mixed	2
25-5	6.19×10^4	無症	2	2
27-1	5.13×10^6	無症	1	1
27-2	3.75×10^4	無症	1	1

図 1. *cox1*, *I-rRNA* 核酸配列の多型

```

                20                40                60                80
cox1-1 TATGGCAAAG AAGGTCTGAT TTCCTCAGTC TCTTGCCTAG GAGTTCTAGG CTATCTAGTC TAGGCACACC ATATGTTTAC 80
cox1-2 TATGGCAAAG AAGGTCTGAT TTCCTCAGTC TCTTGCCTAG GAGTTCTAGG CTACCTAGTC TATGCACACC ATATGTTTAC 80

                100                120                140                160
cox1-1 TGTAGACTTG GAGCTAGAAG TGAAACTGCT TTTCTCTTCT GGTACTATGG CTATTGCAGT TCCTACTGGC GTAAAAAGTCT 160
cox1-2 TGTAGATTTG GAGCTAGAAG TGAAACTGCT TTTCTCTTCT GGTACCATGG CTATTGCAGT TCCTACTGGC GTAAAAAGTCT 160

                180                200                220                240
cox1-1 ACAGTTGAAT GGTGAGTGT AGGCTGGTA GCCTAGATAC TCTCCAAACC TTCCTTCCTC TTCTTTGTTT TCTCGCCACT 240
cox1-2 ACAGTTGAAT GGTGAGTGT AGGCTGTTA GCCTAGATAC TCTCCAAACC TTCCTTCCTC TTCTTTGTTT TCTCGCCACT 240

                260                280                300                320
cox1-1 TTTATAGGTG GAGGTTTAAC AGGAATCATG CTTTCTTCTT CTACAGCAGA TGTTTTGTTA CACGACACCT ATTTCTGAGT 320
cox1-2 TTTATAGGTG GAGGTTTAAC AGGAATCATG CTTTCTTCTT CTACAGCAGA TGTTTTGTTA CACGACACCT ATTTCTGAGT 320

                340                360                380                400
cox1-1 GGCTCATTTT CACCAGGTAA TGGCTATAGC AGCCTTTTTA GCCTTTGCTT GTGGAGTACA CTGGTTAGGA ATGATGAGTC 400
cox1-2 GGCTCATTTT CACCAGGTAA TGGCTATAGC AGCCTTTTTA GCCTTTACTT GTGGAGTACA CTGGTTAGGA ATGATGAGTC 400

                420                440                460                480
cox1-1 ATGGTGGAGC AATTATACTT TTTACTATTG CTACCATGAC TAITTTTCCTT CCTTTGTACG GAGCAGGTCT TTGTGGAATC 480
cox1-2 ATGGTGGAGC AATTATACTT TTTACTATTG CTACCATGAC TAITTTTCCTT CCTTTGTACG GAGCAGGTCT TTGTGGAATC 480

cox1-1 CCTAGA 486
cox1-2 CCTAGA 486

```

```

                20                40                60                80
I-rRNA-1 GTTCCAACAA GTCCATGAAA CTCTGTCCTT ATTAGGTTTC CAGGAGTTTT TGCCTGGAGT TGCGAATAAA GCTTATGAGG 80
I-rRNA-2 GTTCCAACAA GTCCATGAAA CTCTGTCCTT ATTAGGTTTC CAGGAGTTTT TGCCTGGAGT TGCGAATAAA GCTTATGAGG 80

                100                120                140                160
I-rRNA-1 ATTTTGCCCTT TTAAGTTGGG CGTAAAATGC CCTCTGAAAA GTAAGCTTTT TGGAAAATTC TAAGCAACTA GATCAGGTTT 160
I-rRNA-2 ATTTTGCCCTT TTAAGTTGGG CGTAAAATGC CCTCTGAAAA GTAAGCTTTT TGGAAAATTC TAAGCAACTA GATCAGGTTT 160

                180                200                220                240
I-rRNA-1 TCTACGAACT GGAAAAATAT TCCTCTTTTT CACTTTATGT CCTGATTGGA CTAGAGTGAA AGTGGACTTG TTTTCTGCA 240
I-rRNA-2 TCTACGAACT GGAAAAATAT TCCTCTTTTT CACTTTATGT CCTGATTGGA CTAGAGTGAA AGTGGACTTG TTTTCTGCA 240

                260                280                300                320
I-rRNA-1 CCTGTTCCGT AAGGGAAAAAG GTGAACTAGG CGTAGCCTTG AGGAAAACCA GGTGAGCAAC TAATTCTTTT CTAGGCTTAA 320
I-rRNA-2 CCTGTTCCGT AAGGGAAAAAG GTGAACTAGG CGTAGCCTTG AGGAAAACCA GGTGAGCAAC TAATTCTTTT CTAGGCTTAA 320

                340                360                380                400
I-rRNA-1 GACCAGCTAA ACCTCGTCAT AGTCTTGAAT TTCCTTGGAT CAGCTCGTCC TCTTTTTAGT AGAACCCACC ATTTTCTG 400
I-rRNA-2 GACCAGCTAA ACCTCGTCAT AGTCTTGAAT TTCCTTGGAT CAGCTCGTCC TCTTTTTAGT AGAACCCACC ATTTTCTG 400

                420                440                460                480
I-rRNA-1 GTGAGGAAAA GGTGGGTTG AGTATCGAGC TTGTGAGACT CTTTTAATT CCTTTCITGT TAGAGTTAG CTGAGTTGTC 480
I-rRNA-2 GTGAGGAAAA GGTGGGTTG AGTATCGAGC TTGTGAGACT CTTTTAATT CCTTTCITGT TAGAGTTAG CTGAGTTGTC 480

I-rRNA-1 CATAAAGTC 489
I-rRNA-2 CATAAAGTC 489

```

図 2. ナナホシクドア検体0904と検体201204のミトコンドリアゲノム配列の比較

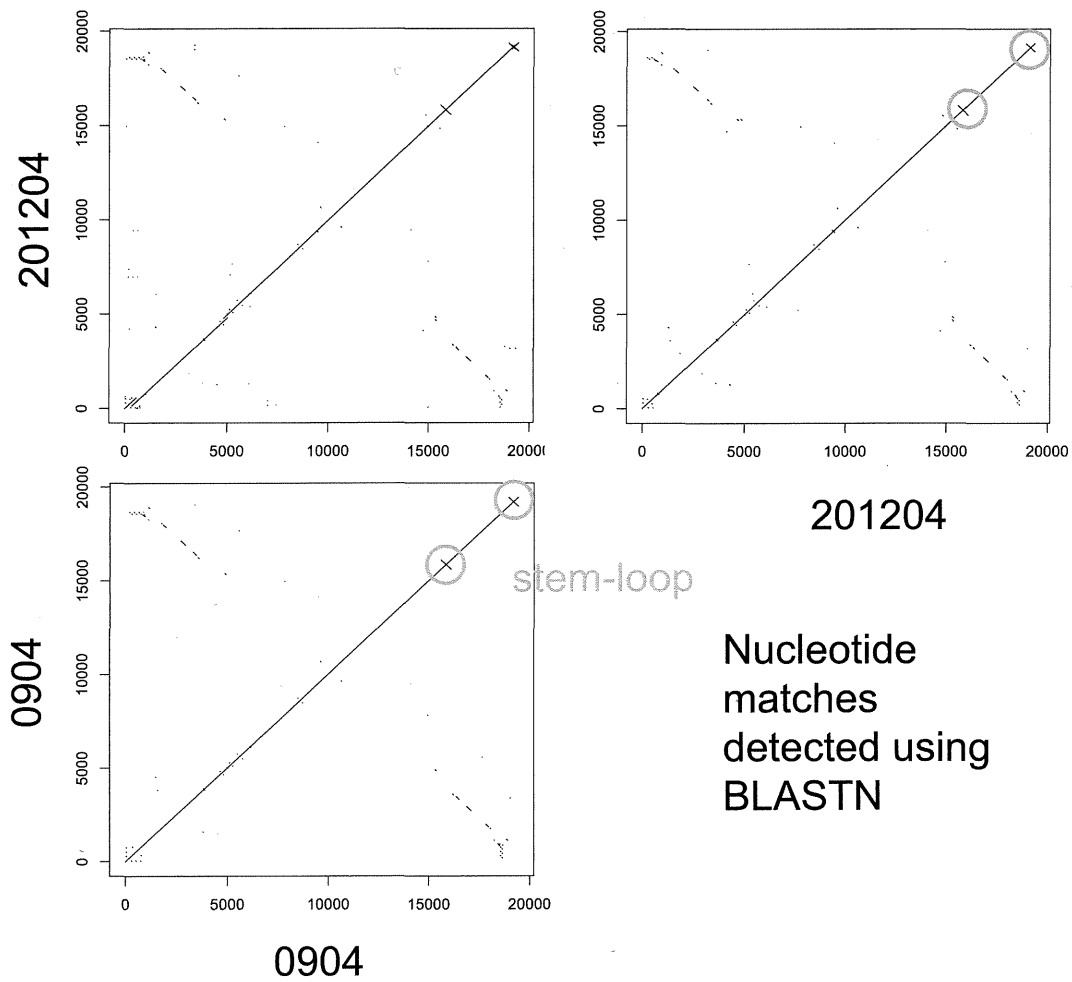


図3. ミトコンドリア遺伝子に基づくクドア3種の系統推定

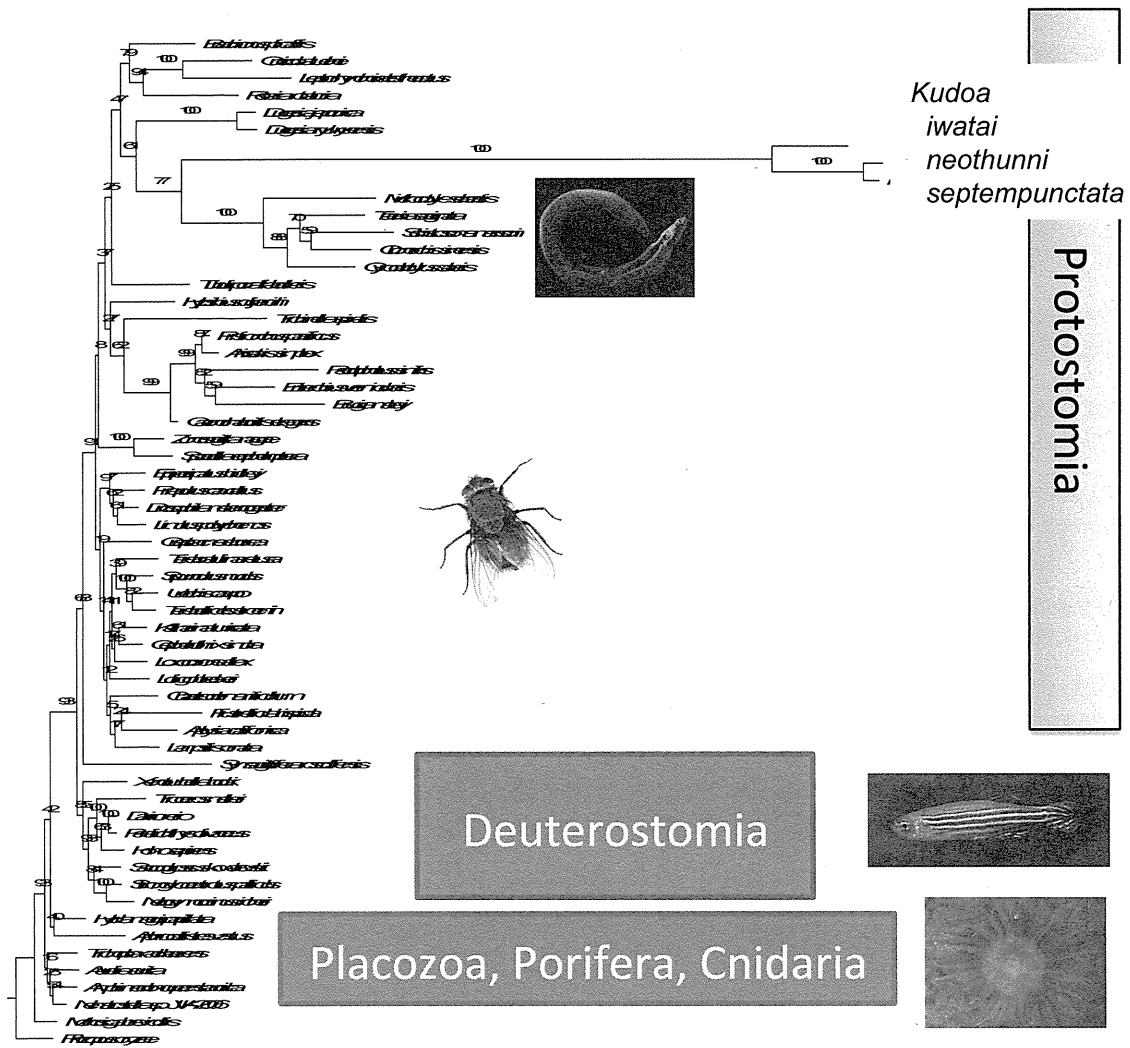
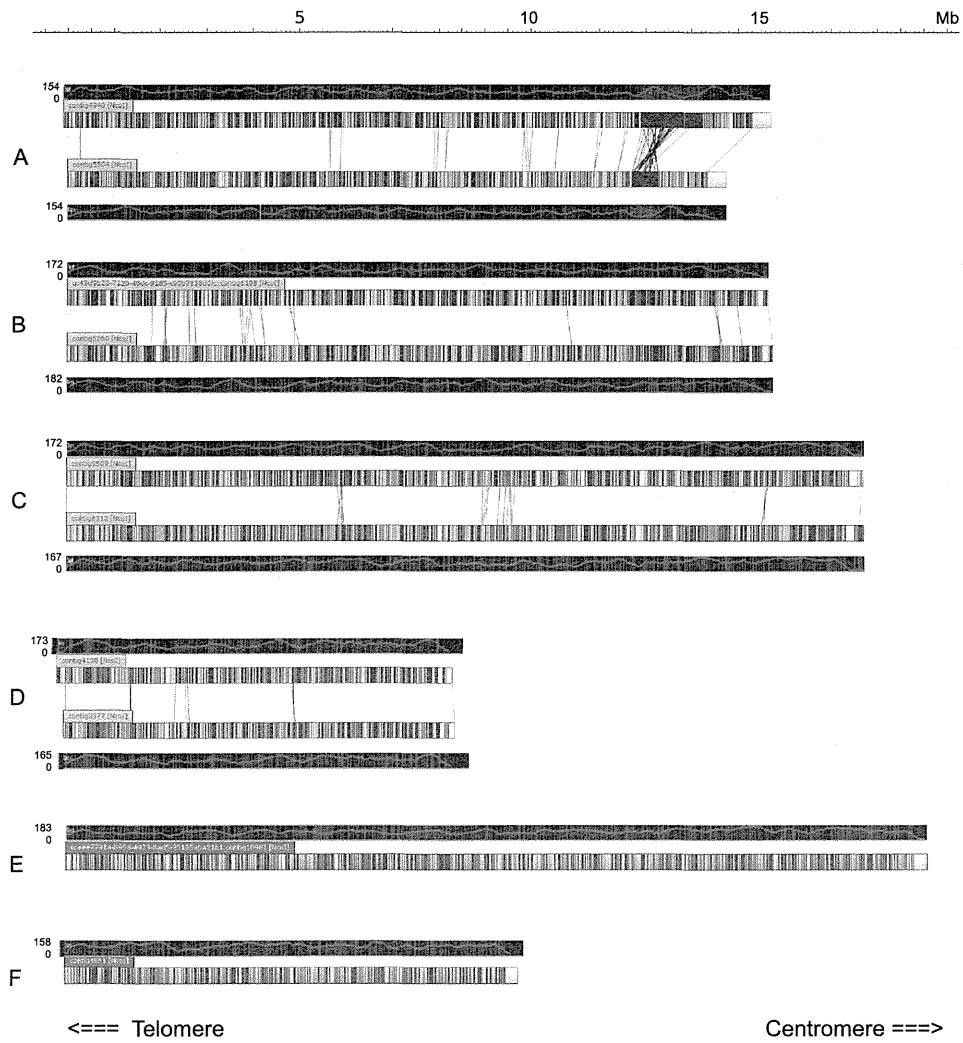


図4. ナナホシクドア (検体201204) の*NotI*についての制限酵素地図



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 25 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疫学センター）

平成 10 年頃より西日本を中心にヒラメを喫食と下痢または嘔吐を呈する食中毒が報告されるようになった。本研究は *Kudoa septempunctata* が寄生したヒラメの喫食による発病とその要因の関連について検討を目的とした。研究デザインは地域相関研究を利用した。利用したデータは平成 24 年度に厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課食中毒被害情報室にヒラメを喫食し、*Kudoa septempunctata* が原因として報告された事例のうち、ヒラメの喫食量及びヒラメ 1g あたりの *K. septempunctata* の孢子数を報告した 12 事例の情報を利用した。解析は重回帰分析を行った。本研究は *K. septempunctata* が寄生したヒラメ喫食による下痢または嘔吐の発病との関連はヒラメの個体の重量とヒラメの喫食量が発病と関連し、12 事例における *K. septempunctata* 摂取量の中央値がこれまで報告した発病の閾値の推定値と同程度であった。

A. 研究目的

平成 10 年頃より西日本を中心にヒラメを喫食で下痢または嘔吐を呈する食中毒の報告がなされるようになった。平成 22 年に西日本で景品として送付されたヒラメを喫食した約 400 人のうち、約 100 人が消化器症状（少なくとも下痢あるいは嘔吐のいずれか一つ）を呈し、*K. septempunctata* が寄生したヒラメの喫食の対策が始まった。

一方で、ヒラメを喫食しても発病者と非発病者の存在する食中毒事例が報告され、*K. septempunctata* が寄生したヒラメの喫食が発病をきたすこ

とだけではなく、ヒラメに *K. septempunctata* が寄生しているだけではなく、ヒラメの喫食量や、ヒラメ個体の重量に関する検討はなされていない。

本研究は *Kudoa septempunctata* が寄生したヒラメの喫食による発病とその要因の関連について検討を目的とした。

B. 研究方法

本研究の研究デザインは地域相関研究で行った。

利用したデータは平成 24 年度に厚生労働省医薬食品局食品安全部食中

毒被害情報室に自治体から報告されたヒラメを提供し、食中毒として報告された事例とした。症例定義はヒラメを喫食し、24時間以内に下痢または嘔吐の消化器症状を呈した者とした。

事例のうち、患者のヒラメの喫食量、ヒラメの1gあたりの*K. septempunctata*の孢子数の情報が揃った12事例を利用した。

利用した情報は事例毎の発症率、ヒラメの個体の重量(Kg)(ヒラメ重量)、ヒラメ喫食量(g)、ヒラメの*K. septempunctata*孢子数とした。解析方法は発症に関連する要因の検討を相関係数及び重回帰分析を行った。

発症率とヒラメ喫食との関連は相関係数を算出した。相関係数が0.200以上の項目は多重共線性の可能性も検討し、重回帰分析を行った。

C. 結果

1. 事例の記述統計(表1)

12事例の発症率は中央値が72.5%(範囲:37.1-100.0%)であった。ヒラメの重量は中央値が1.2kg(範囲:0.8-1.5kg)であった。ヒラメの喫食量は中央値が25.1g(範囲:11.3-88.0g)であった。1gあたりの*K. septempunctata*の孢子数は対数をとった値で、中央値は 1.2×10^7 個/g(範囲: 9.4×10^5 - 5.8×10^7)であった。*K. septempunctata*孢子摂取数は1gあたりの*K. septempunctata*の孢子数とヒラメの喫食量を乗じ対数を取った値とした。*K. septempunctata*孢子摂取数の中央値は 2.4×10^7 個(中央

値: 4.9×10^7 - 3.1×10^9 個)であった。

2. 発症率とヒラメの喫食との相関(表2)

発症率とヒラメの重量($r=-0.611$, $P=0.035$)及び発症率とヒラメの喫食量($r=0.394$, $P=0.205$)は相関係数が0.300以上であった。そのうち、発症率とヒラメの重量は有意な相関であった。

3. 発症率とヒラメの喫食に関連する因子(表3)

発症率と関連する要因としてヒラメの個体重量、ヒラメの喫食量、*K. septempunctata*孢子数について重回帰分析を行った。重回帰分析はモデル1としてヒラメ重量、対数をとった*K. septempunctata*クドア孢子数、ヒラメ喫食量を独立変数とした。モデル2をヒラメ重量、ヒラメ喫食量を独立変数とした。

モデル1では、 R^2 は0.446で、 $P=0.173$ であった。発症率をヒラメの個体重量、*K. septempunctata*孢子数、ヒラメの喫食量として重回帰分析を行った。回帰係数はヒラメの重量が-43.3($P=0.075$)、*K. septempunctata*孢子数が0.3($P=0.975$)、ヒラメの喫食量が0.2($P=0.336$)であった。

モデル2では、 R^2 が0.446で、 $P=0.070$ であった。発症率をヒラメの個体重量、ヒラメの喫食量として重回帰分析を行った。回帰係数はヒラメの重量が-43.3($P=0.058$)、ヒラメの喫食量が0.2($P=0.305$)であった。

D. 考察

1. 発症率とヒラメの重量、ヒラメ喫食量及び *K. septempunctata* 孢子数との関連

相関分析及び重回帰分析で、ヒラメの重量が増加すると発症率が減少し、ヒラメの個体の重量及びヒラメの喫食量が発症率と関連があった。ヒラメは成魚になるまでに3年程度かかる。養殖のヒラメは養殖開始から10ヶ月程度で出荷される。そのため、養殖されたヒラメは成魚になる前に出荷されている可能性が考えられ、ヒラメの個体そのものの免疫の状況などによる違いにより、個体の重量が増加すると発症率が減少する可能性が考えられた。一方で、本研究は地域相関研究であるため、交絡因子やバイアスに関する制御ができていない可能性がある。今後、個々の人を対象にしたヒラメの個体の重量、ヒラメの喫食量及び *K. septempunctata* の摂取量との関連を検討する必要がある。

2. ヒラメ喫食量と発症率の関連

ヒラメ喫食量と下痢あるいは嘔吐の症状を呈することとの関連は有意ではなかったが相関係数が0.394で中程度の関連がみられた。ヒラメが *K. septempunctata* に汚染されている量が異なっても、ヒラメの喫食量が増加することで *K. septempunctata* の摂取量が発病する閾値を超える事になるため関連が見られた可能性が考えられた。一方、*K. septempunctata* の汚染量は発症率との相関係数が

-0.023で、関連がみられなかったことから *K. septempunctata* によりヒラメが汚染された孢子数よりはむしろヒラメの喫食量が下痢あるいは嘔吐を発症するための寄与が高い可能性が考えられた。本研究は地域相関研究であるために個人の状況の情報が得られないため、今後個人の状況を加味した検討ができる研究デザインでの検討が今後の課題である。

3. *K. septempunctata* の摂取量

K. septempunctata 孢子の摂取量は中央値が 2.4×10^8 個（範囲： 4.9×10^7 - 3.1×10^9 個）であった。これまで、2010年に発生したアウトブレイク事例で推定された発病をきたす閾値の 7.2×10^7 と同程度のオーダーであることが考えられた。従って、本研究は地域相関研究ではあるが、バイアスや交絡因子の可能性は少ないことが考えられた。

4. 本研究の制限

本研究は研究デザインが地域相関研究のためバイアスや交絡についての検討が十分できない。また、事例数が12であるため、第一種の過誤及び第二種の過誤がパワー不足により所持している可能性も考えられた。

E. 結論

本研究は *K. septempunctata* が寄生したヒラメ喫食による下痢または嘔吐の発病との関連を検討し、ヒラメの個体の重量とヒラメの喫食量が発病

と関連し、12 事例における *K. septempunctata* 摂取量の中央値がこれまで報告した発病の閾値の推定値と同程度であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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.

学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 発症率、ヒラメの重量・喫食量、*K. septempunctata* の孢子数

	N	中央値	最小値	最大値	パーセンタイル		
					25	50	75
発症率	12	72.5	37.1	100.0	67.1	72.5	89.6
ヒラメ重量(kg)	12	1.2	0.8	1.5	0.9	1.2	1.4
ヒラメ喫食量(g)	12	25.1	11.3	88.0	23.6	25.1	59.4
クドア孢子数 ^{a)}	12	1.2E+07	9.4E+05	5.8E+07	2.5E+06	1.2E+07	4.5E+07
Log クドア孢子数	12	7.1	6.0	7.8	6.4	7.1	7.7
喫食孢子数	12	2.4E+08	4.9E+07	3.1E+09	8.4E+07	2.4E+08	1.3E+09
クドア喫食量 ^{b)}	12	8.4	7.7	9.5	7.9	8.4	9.1

a) クドア孢子数:ヒラメ 1g あたりの *K. septempunctata* 数

b) クドア喫食量:Log₁₀(クドア孢子数×ヒラメ喫食量)

表 2. 発症率との相関係数

		発症率	ヒラメ重量	ヒラメ喫食量	クドア孢子数 ^{a)}	クドア摂取量 ^{b)}
発症率	r	1.000	-0.611	0.394	-0.023	0.141
	P 値		0.035	0.205	0.945	0.661
ヒラメ重量	r		1.000	-0.21	0.00	-0.04
	P 値			0.505	1.000	0.900
ヒラメ喫食量	r			1.000	-0.112	0.277
	P 値				0.730	0.383
クドア孢子数 ^{a)}	r				1.000	0.918
	P 値					<0.001
クドア摂取量 ^{b)}	r					1.000
	P 値					

a) クドア孢子数:ヒラメ 1g あたりの *K. septempunctata* 数

b) クドア喫食量:Log₁₀(クドア孢子数×ヒラメ喫食量)

表 3. 発症率と関連する要因の重回帰分析

	回帰係数	t 値	P 値	VIF	R ²	F 値	P 値
モデル 1							
ヒラメ重量	-43.3	1.81	0.075	1.048	0.446	2.146	0.173
Log クドア孢子数	0.3	0.03	0.975	1.013			
ヒラメ喫食量(g)	0.2	-2.05	0.336	1.062			
(定数)	114.0	1.02	0.108				
モデル 2							
ヒラメ重量	-43.3	-2.17	0.058	1.048	0.446	3.620	0.070
ヒラメ喫食量(g)	0.2	1.09	0.305	1.048			
(定数)	115.8	4.49	0.002				

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 25 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 大西貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 Binh Thi Tran（Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology）
研究協力者 李 迎春（山口大学大学院連合獣医学研究科）

ヒラメ体側筋寄生の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata*、メジマグロ（クロマグロ）寄生の *Kudoa neothunni* を中心に、海産魚の生鮮食材喫食を原因とする食中毒事例に関わる多殻目 (Multivalvulida) 粘液胞子虫の種特定を行うための形態学的、分子遺伝学的マーカーの検討を行ってきた。*Kudoa* 属 80 余種が多殻目の圧倒的多数を占める既知種であるが、この分類群には *Unicapsula* 属 11 種も分類され、形態学的特徴こそ異なるが、死後筋肉融解現象の原因となるなど性状の類似性を指摘する報告もある。*Unicapsula* 属の分子系統学的な位置づけと *Kudoa* 種との鑑別に必要な基本的な遺伝子情報はまだ部分的に知られている状態にとどまることから、多殻目未知種に関わる種鑑別が求められた場合に分子遺伝学的マーカーの有用性を明確に示すことが難しい。この現状を打破するために、ベトナム沖で採取したニホンイトヨリダイ (*Nemipterus japonicus*) に寄生する *Unicapsula pyramidata*、瀬戸内海防府沖で得たマハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) に寄生する *Unicapsula* sp. A、集団食中毒事例の原因食調査に際して入手したカンパチ (*Seriola dumerili*) に寄生する *Unicapsula* sp. B の 3 種を対象として *Unicapsula* 属の分子遺伝学的特徴づけを行った。リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の塩基配列は *Kudoa* 属と高い類似性をもつこと、*Unicapsula* 属の種確認がまだ進んでいない現状においては、顕微鏡検査による胞子形態の確認を併用することが食中毒事例の原因究明において重要であることが考察された。なお、*Unicapsula* sp. B は形態学的ならびに分子遺伝学的に *U. seriolae* と同定された。また、養殖水産業現場において、最近、新しい養殖魚種としてカワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) が注目され、積極的な取り組みが始まっていることから、市販のウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*) を調査対象として粘液胞子虫寄生の可能性を探ったところ、*Kudoa* 属 3 種の体側筋寄生が検出された。観察された *Kudoa* 種は、4 つの極囊/殻片をもつ 2 種 (*Kudoa* sp. A; *Kudoa thyrsites*) と 6~7 つの極囊/殻片をもつ *Kudoa septempunctata* であった。刺身食材として今後の流通が拡大する養殖カワハギについても粘液胞子虫調査を早急に実施し、養殖ヒラメと同様の感染魚流通を未然に防ぐ取り組みとともに、自然環境での保虫宿主としての役割を早急に検討することが望まれる。

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はヒラメ寄生の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* Matsukane et al., 2010 やメジマグロ(クロマグロ)寄生の *Kudoa neothunni* (Arai et Matsumoto, 1953)を中心に、養殖現場や集団食中毒現場での対応と研究が進められてきた(Matsukane et al., 2010; 佐藤, 2011; Harada et al., 2012; Kawai et al., 2012; 小西, 2012; 大西, 2012; Li et al., 2013)。 *Kudoa neothunni* の種記載は、インドネシア海域(Bunda Sea)で漁獲され、築地市場に持ち込まれたキハダマグロで、死後筋肉融解現象を起こしていたことから、その原因体として行われた (Arai & Matsumoto, 1953)。その後、本種はメバチマグロ、三陸沖のクロマグロの筋肉融解巢からも粘液胞子の形態学的種鑑別により確認されている。メジマグロあるいはキハダマグロからの *Kudoa neothunni* について18S~28S リボソーム遺伝子(rDNA)について検討し、前者からは1つの遺伝子型が、後者からは2つの遺伝子型が確認された(Li et al., 2013; Sato et al., 2013)。これらマグロ2種を共通宿主とする遺伝子型もあるが、流通的には、必ずしも2種が同様の感染危険性をもつとは言えない。また、メジマグロの成長期に一時的に重度の *Kudoa neothunni* 感染がみられることが、養殖現場での検査で判明しているが、出荷時期には感染が終息する(白樫, 2013)。

上記の種を中心に、海産魚の生鮮食材喫食を原因とする食中毒事例に関わる多殻目(Multivalvulida)粘液胞子虫の種特定を行うための形態学的、分子遺伝学的マーカーの検討に取り組んできた。*Kudoa* 属80余種が多殻目の圧倒的多数を占める既知種であるが(佐藤, 2011)、この分類群には *Unicapsula* 属11種も分類され、形態学的特徴こそ異なるが、死後筋肉融解現象の原因となるなど性状の類似性を指摘する報告もある (Miller & Adlard, 2013)。*Unicapsula* 属の分子系統学的な位置づけと *Kudoa* 種との鑑別に必要な基本的な遺伝子情報はまだ部分的に知られている状態にとどまることから、多殻目未知種に関わる種鑑別が求められた場合に分子遺伝学的マーカーの有用性を明確に示すことが難しい。この現状を打破するために、本研究では3種の *Unicapsula* spp. を用いて、本属の分子遺伝学的特徴づけを行った。

また、養殖水産業現場において、最近、新しい養殖魚種としてカワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) が注目され、宮崎県、大分県、熊本県、長崎県等で積極的な取り組みが始まっていることから (<http://www.jf-net.ne.jp/mzgyoren/magazine/201210/category05/index.html> 参照)、類縁の市販のウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*) を調査対象として粘液胞子虫寄生の可能性を探った。生鮮食材(刺身)として今後の流通が拡大する養殖カワハギの粘液胞子虫感染

の可能性を検討する予備観察としての取り組みである。

B. 材料と方法

1. *Unicapsula* 検体の収集

2013年2月2日にベトナム北部のハロン湾沖カットバ島にてニホンイトヨリダイ (*Nemipterus japonicus*) 5尾を入手した(図1A)。また、2012年12月7日に山口市内の生鮮魚売り場においてマハゼ (*Acanthogobius flavinmanus*) 17尾をパック包装で購入した(図1B)。加えて、2013年12月中旬に九州北部にて発生した集団食中毒発生事例において原因食調査食の1つとして収集されたカンパチ (*Seriola dumerili*) の刺身片を冷凍で入手した。

2. ウマヅラハギからの *Kudoa* 粘液胞子の収集

2013年12月3日～2014年1月23日に、山口市内の生鮮魚売り場で、ウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*) 8尾を購入した(図1C)。山口県下関水揚げが6尾、山口県仙崎水揚げが2尾であった。

3. 胞子の形態学的観察

入手した検体について、肉片として入手したカンパチ材料を除き、体側筋を薄切し、生理食塩水を入れたシャーレに入れて実体顕微鏡下で筋肉組織に埋まる粘液胞子虫シストもしくはシュードシストを精査した。粘液胞子虫シュードシストをもつ筋線維が確認された際には、それを分離し生

理食塩水に胞子を浮遊させた。微分干渉光学顕微鏡下400倍で胞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 & Arthur (1989)に従って胞子の計測に供した。特に断らない限り、数値は範囲(平均 ± 標準偏差)で表す。値が過分散である場合には幾何平均も用いるが、その際にはそのように断る。

4. 寄生虫 DNA 抽出、遺伝子増幅とシーケンス

粘液胞子虫からの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 Polymelase chain reaction (PCR) による遺伝子増幅は、Li et al. (2013) に示すプライマーペアを用いて 20µl 容量で行った。なお、*Unicapsula* 属粘液胞子虫を対象とした遺伝子増幅において従前 *Kudoa* 属を対象とする場合に 18S rDNA の 5' -末端プライマーとして用いてきた NSF4/18 (5' -CTGGTTGATCCTGCCAGT -3') が機能しない可能性があったことから、次の4つのプライマーを新たに検討した。

1) Unicap18S_03F:

(5' -GGTTGATTCTGCCAGTGATC-3')

2) Unicap18S_04F:

(5' -GTTGATTCTGCCAGTGATCAT-3')

3) Unicap18S_05F:

(5' -TCTGCCAGTGATCATATGCT-3')

4) Unicap18S_06F:

(5' -CCAGTGATCATATGCTCGTC-3')

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、63°C 1 分間、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、Li et al. (2013) と同様にダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスがうまくいかない場合には、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 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。

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 に登録された近縁粘液胞子虫の rDNA 塩基配列について、

CLUSTAL W multiple alignment program (Thompson et al., 1994) 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 (Guindon & Gascuel, 2003; Dereeper et al., 2008) を用いた。信頼性検証には、aLRT (approximate likelihood-ratio test) 法 (Anisimova & Gascuel, 2006) を用いた。

C. 結果

1. *Unicapsula* spp. ならびに *Kudoa* spp. の検出状況

ベトナム産ニホンイトヨリダイ 5 尾のうち 3 尾の体側筋の筋線維内に *Unicapsula* 属粘液胞子虫の細長いシュードシスト (代表的 1 つの計測値は 1.20mm x 0.11mm) を検出した (図 2)。1 尾あたりの感染筋線維は 2、3、11 本とごく少数であった。瀬戸内海 (防府沖) 産マハゼ 17 尾のうち 7 尾の体側筋の筋線維内に *Unicapsula* 属粘液胞子虫のシュードシストを検出した。検出数は 1 尾あたり 1-28 (幾何平均 6.5) 本で、シュードシストのサイズは 0.43-3.62 (1.01 ± 0.70) mm x 0.09-0.22 (0.15 ± 0.04) mm であった。北九州地方の料理店で入手したカンパチの刺身の小片にごく少数の筋線維内シュードシスト

を確認した。そのうちの1つは 2.89mm x 0.15mm であった。

検査を行ったウマヅラハギ 8 尾のうち 6 尾は山口県下関で水揚げされているが、うち 2 尾(いずれも 2013 年 12 月 3 日購入)の体側筋の筋線維内にシュードシストを確認した。1 尾(No. 1 とする)においてはややサイズの異なる 2 種のシュードシストが確認された。1 本だけ、やや大きめのものがあり、サイズは 2.71 x 0.09mm であった。他の複数のシュードシスト (n=5) は 0.75-1.60 (1.04 ± 0.33) x 0.04- 1.10 (0.07 ± 0.02) mm であった。もう 1 尾(No. 2 とする)のシュードシスト (n=3) は 0.25-0.57 (0.43 ± 0.17) x 0.03-0.10 (0.07 ± 0.04) mm であった。

2. 光学顕微鏡所見

ベトナム産ニホンイトヨリダイ、瀬戸内海産マハゼ、産地不明のカンパチから検出された粘液胞子には 3 つの極囊と殻片が観察されるが、3 つの極囊のうち 2 つは痕跡的であったことから *Unicapsula* 属に分類された。ニホンイトヨリダイから分離された胞子は高さ 6.0 - 6.5 μm の正三角形状で(図 2)、殻片それぞれに円形の極囊が確認できるが、うち 2 つは形成不全で(径 1.0 μm)、1 つのみが類円形で 2.5 x 2.1 μm とよく発達していた。また、鈍となる先端に対する底辺角からはそれぞれ 1 本の小毛が植えていた。この形態学的特徴はインド

洋産ニホンイトヨリダイから原記載された *U. pyramidata* とよく一致していた。マハゼから分離した胞子は 5.6 - 6.9 μm 径の球形で(図 3)、3 殻片から構成され、発達した極囊は 1.9 - 2.5 μm であった (n=20)。カンパチから分離した胞子は 6.7 - 7.4 μm 径の球形様であった(図 4)。発達した 1 つの極囊は 3.4 - 3.7 μm 径で、他の 2 つの極囊は形成不全で点状に観察された。後 2 者の 2 つの殻片は 1 つの殻片に対して対称的に二等辺三角形を作るかのように位置していた。生鮮時に顕微鏡観察で極糸が弾出した胞子が多数観察され、極糸長は 23.3 - 25.7 μm であった。

ウマヅラハギ No. 1 の大きめのシュードシストから分離された胞子は 6 - 8 個の殻片と極囊を放射状にもつが、それぞれの大きさに幾分の変異があり、放射対称性を欠いて不定形である(図 5)。100 個の胞子について観察したところ、極囊数(以下、殻片数も同様とする) 5ヶが 1 個、6ヶが 20 個、7ヶが 73 個、8ヶが 6 個であった。胞子 (n=30) の幅は 13.2 - 16.4 (14.8 ± 0.8) μm、厚さは 10.9 - 14.8 (13.1 ± 1.1) μm、長さは 8.1 - 10.6 (9.6 ± 0.8) μm で、その胞子の中で最も大きい極囊のみを選ぶと極囊長 3.8 - 5.4 (4.7 ± 0.4) μm で極囊幅は 1.7 - 2.6 (2.1 ± 0.2) μm であり、その他の極囊長は 3.2 - 5.4 (4.3 ± 0.5) μm

で極囊幅は 1.6 - 2.6 (2.1 ± 0.3) μm であつた。すなわち、最大の大きさの極囊に比べると、その他の極囊のサイズは 77.3 - 100.0 (89.8 ± 6.2) % でやや小さいといった印象を与えた。極囊から弾出した極糸の長さは 16.5 - 29.6 (22.4 ± 3.5) μm ($n=12$) であつた。

同魚 (No. 1) のその他のシュードシストから分離された胞子は 4 つの極囊と殻片をもち、角の殻片部分が伸びた四角錐であるが、頂上部は丸味を帯びていた (図 6)。胞子 ($n=8$) の幅は 14.0 - 16.8 (15.2 ± 0.9) μm 、厚さは 9.7 - 13.3 (11.5 ± 1.0) μm 、縫合線部厚さは 7.7 - 10.5 (9.1 ± 0.7) μm 、長さは 8.1 - 10.9 μm であつた。4 つの極囊の大きさはやや異なり、大きいものから平均値としてのサイズ比率は 1:0.8:0.7:0.6 であつた。それぞれの実際のサイズは順に、4.0 - 6.7 (5.1 ± 0.9) $\mu\text{m} \times 1.8 - 2.9$ (2.5 ± 0.4) μm 、3.7 - 4.6 (4.1 ± 0.4) $\mu\text{m} \times 1.6 - 2.6$ (2.1 ± 0.4) μm 、3.3 - 3.9 (3.6 ± 0.2) $\mu\text{m} \times 1.5 - 2.1$ (1.7 ± 0.2) μm 、2.5 - 3.0 (2.8 ± 0.3) $\mu\text{m} \times 1.3 - 1.9$ (1.7 ± 0.3) μm であつた。

ウマヅラハギ No2 のシュードシストにみられた胞子は、No. 1 の同魚から分離された 4 つの極囊/殻片をもつ胞子によく似ているが、四角錐の角の殻片下部がより鋭く尖る (図 7)。また、4 つの極囊のうちの 1 つ

が特に大きく、中等度の大きさの極囊が 2 つ、そしてやや小さな極囊をもっていた。極囊の大きさの違いを反映するかたちで、殻片の大きさが若干異なるため、四角錐もやや歪んでいた。胞子 ($n=12$) の幅は 14.8 - 18.2 (16.5 ± 0.8) μm 、厚さは 10.8 - 13.5 (12.5 ± 0.6) μm 、縫合線部厚さは 8.9 - 10.8 (10.0 ± 0.5) μm 、長さは 8.5 - 9.0 (8.7 ± 0.2) μm であつた。4 つの極囊の大きさが異なることは上述した通りで、サイズ比率は 1:0.7:0.6:0.5 であつた。それぞれの実際のサイズは順に、5.2 - 6.2 (5.7 ± 0.3) $\mu\text{m} \times 2.6 - 3.2$ (2.9 ± 0.2) μm 、3.7 - 4.6 (4.1 ± 0.3) $\mu\text{m} \times 1.1 - 2.6$ (1.9 ± 0.4) μm 、3.4 - 4.0 (3.7 ± 0.2) $\mu\text{m} \times 1.5 - 2.0$ (1.7 ± 0.2) μm 、2.3 - 3.7 (3.0 ± 0.4) $\mu\text{m} \times 1.2 - 1.7$ (1.5 ± 0.2) μm であつた。

3. 分子系統学的解析

1. *Unicapsula* spp. の 18S/28S rDNA 解析
Unicapsula spp. の一連の 18S/28S rDNA 遺伝子増幅は *Kudoa* spp. において用いてきたプライマーペア (Li et al., 2013) で概ねよく反応したが、18S rDNA の 5' 末端側の約 930-bp 長を増幅するプライマーペア (NSF4/18・KUDOA-SSU926R) による反応がみられなかった。そこで図 8 に示すように、NSF4/18 の 3' 末端部を 4~15-bp ずらした Unicap18S_03F~06F の 4 つのプライマー