

投与によるアレルギー誘導の有無を確認する必要がある。そのためには、クドア破砕物精製物を分子量で分画し、各分画をマウスに経口投与してのIgE抗体誘導実験を行う。また、マウス腸管組織の病理学的診断を実施する予定である。

E. 結論

今回行った結果から、カンパチを原因食とする有症状事例がヒラメを原因食とする *K. septempunctata* による食中毒に匹敵する頻度で発生していることが明らかになった。また、これらのカンパチから *U. seriolae* が高率に分離された。*U. seriolae* が原因微生物と同定するためには情報収集を行い、詳細な疫学調査を行うとともに、毒性試験を行い *U. seriolae* の毒性を決定する必要がある。毒性試験を行うためには、大量の検体が必要である。そのためにはヒラメの食中毒の時のように農林水産省をはじめとする各機関の協力が必要となる。今後さらに情報を収集し、得られた情報をもとに関係各機関に協力を求めていくつもりである。

K. septempunctata の食中毒症状の発症機序について、アレルギー反応によるものと予測し、マウスに *K. septempunctata* 破砕物を免疫して、血清中におけるIgE抗体誘導の確認を行った。その結果、クドア免疫原の腹腔内および皮下投与においては、アナフィラキシーショックを誘導するほどの強いアレルギー反応は現れなかったが、クドア破砕物には、腹腔内に投与した場合に、代表的な食物アレルギーである卵白アルブミンと同等またはそれ以上のIgE抗体産生誘導能があることが確認された。今後、分子生物学的、免疫学的、病理学的に *K. septempunctata* のアレルギー性について証明する研究を継続する予定である。

F. 参考文献

1. Ohnishi T, Oyama R, Furusawa H, Ohba N, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. *Kudoa*

septempunctata was recognised by toll-like receptor 2 produced by a RAW 264 macrophage-like cell line. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2013, 30:1365-9.

2. Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. Am J Respir Crit Care Med. 2006, 164:514-523.
3. Jarrett EE, Haig DM. Time course studies on rat IgE production in *N. brasiliensis* infection. Clin Exp Immunol. 1976, 24:246-351.
4. Munoz LL, Cole RL. Effect of *Trichinella spiralis* infection on passive cutaneous anaphylaxis in mice. Infect Immun. 1977, 15:85-90.
5. Yuuki Matsukane, Hiroshi Sato, Shuhei Tanaka, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi. *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporidia: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. Parasitol Res. 2011, 108:913-926
6. 坂本裕美子, 廣地 敬, 大西麻実, 伊藤はるみ, 高橋広夫, 佐々木泰子, 八木欣平, 孝口裕一, 石澤明子. 札幌市中央卸売市場に流通する鮮魚介類の粘液胞子虫寄生状況について. 札幌市衛研年報. 2012, 39:48-52
7. Saegusa Y, Tabata H. Usefulness of infrared thermometry in determining body temperature in mice. J Vet Med Sci. 2003, 65:1365-7.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshiko Sugita Konishi, Yutaka Fukuda, Koh ichiro Mori, Toru Mekata, Toyohiko Namba, Makoto Kuroda, Akiko Yamazaki, Takahiro Ohnishi: New Validated Rapid Screening Methods for Identifying *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), JJID, Vol.68, 145-147, 2015
- 2) Yahata Yuichiro, Sugita-Konishi Yoshiko,

- Ohnishi Takahiro, Toyokawa Takao Nakamura Naomi, Taniguchi Kiyosu, Okabe Nobuhiko: *Kudoa septempunctata* induced gastroenteritis in humans after flounder consumption in Japan: A case-control study, JJID, Vol. 68, 119-123, 2015
- 3) Takahiro Ohnishi, Hiroko Furusawa, Rie Oyama, Saki Koike, Tomoya Yoshinari, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi : Molecular epidemiological analysis of *Kudoa septempunctata* by random amplified polymorphic DNA analysis , JJID 2015;68(3):235-8.2015
 - 4) Takeuchi F, Ogasawara Y, Kato K, Sekizuka T, Nozaki T, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Kuroda M.: Genetic variants of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease., J. Fish. Dis. (in press)
 - 5) Fumihiko Takeuchi, Yumiko Ogasawara, Kengo Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Tomoyoshi Nozaki, Yoshiko Sugita-Konishi, Takahiro Ohnishi, Makoto Kuroda, Nucleotide sequence typing for *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease , PLOS ONE, 2015 Jul 6;10(7):e0132030. doi: 10.1371/journal.pone.0132030. eCollection
2. 学会発表
- 1) 大西貴弘, クドア属粘液胞子虫による食中毒, 第 84 回日本寄生虫学会 (2015.3) 東京
 - 2) Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Kamata, Y., Sugita Konishi, Y.: Electron Microscopic Study on *Kudoa septempunctata* Infecting Olive Flounder, IAFP European Symposium on Food Safety, 2015.4 イギリス
 - 3) Takeuchi F, Sekizuka T, Ogasawara Y, Yokoyama H, Kamikawa R, Inagaki Y, Nozaki T, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Kuroda M: Phylogenetic analysis of a Myxozoan Genus *Kudoa* Mitochondrial Genomes, and the modulation of host innate immunity by *Kudoa* infection., 2nd International Symposium Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells 2015.9, Tsukuba, Japan
 - 4) 大西貴弘, 都丸亜希子, 吉成知也, 鎌田洋一, 小西良子: 原因不明有症苦情事例検体からの粘液胞子虫の検出, 日本食品微生物学会, 2015.11, 川崎
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

490nmで測定時の
吸光度

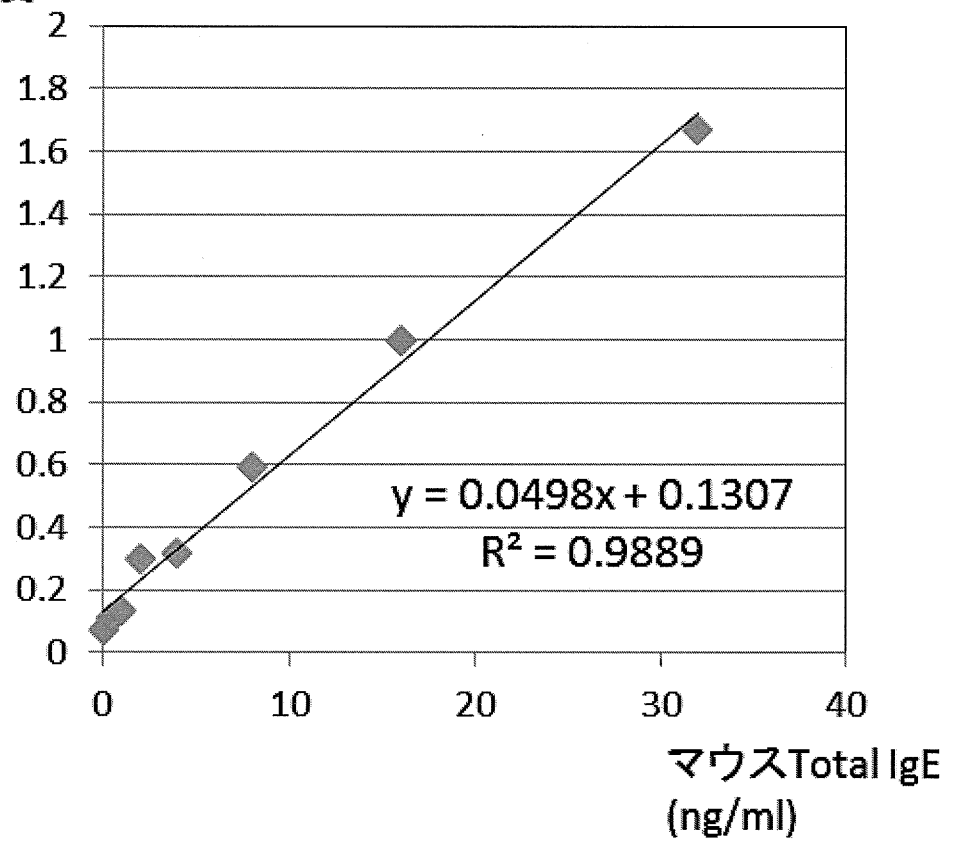


図1. 供試したマウス Total IgE 測定キットにおける ELISA 標準曲線

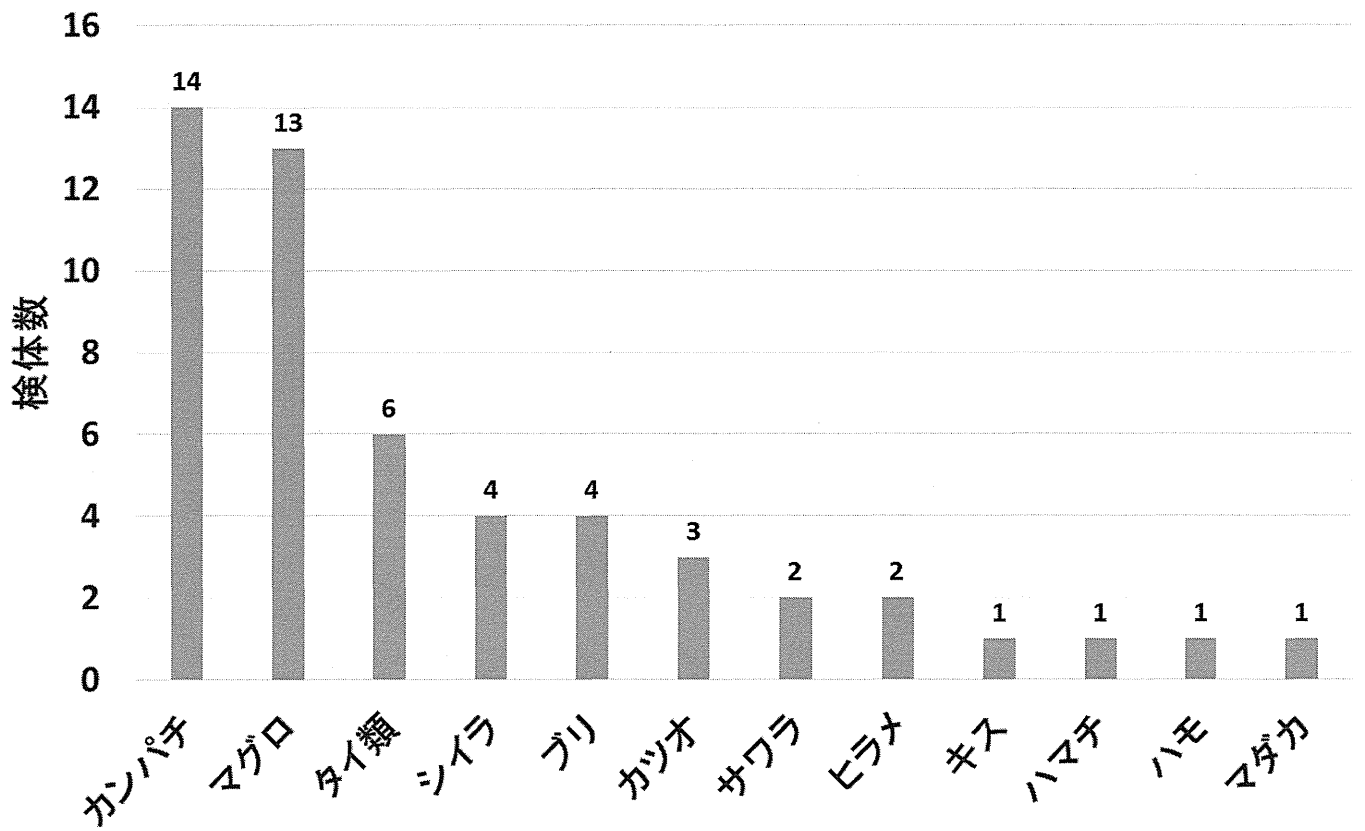


図 2 国衛研に送付された有症苦情事例検体

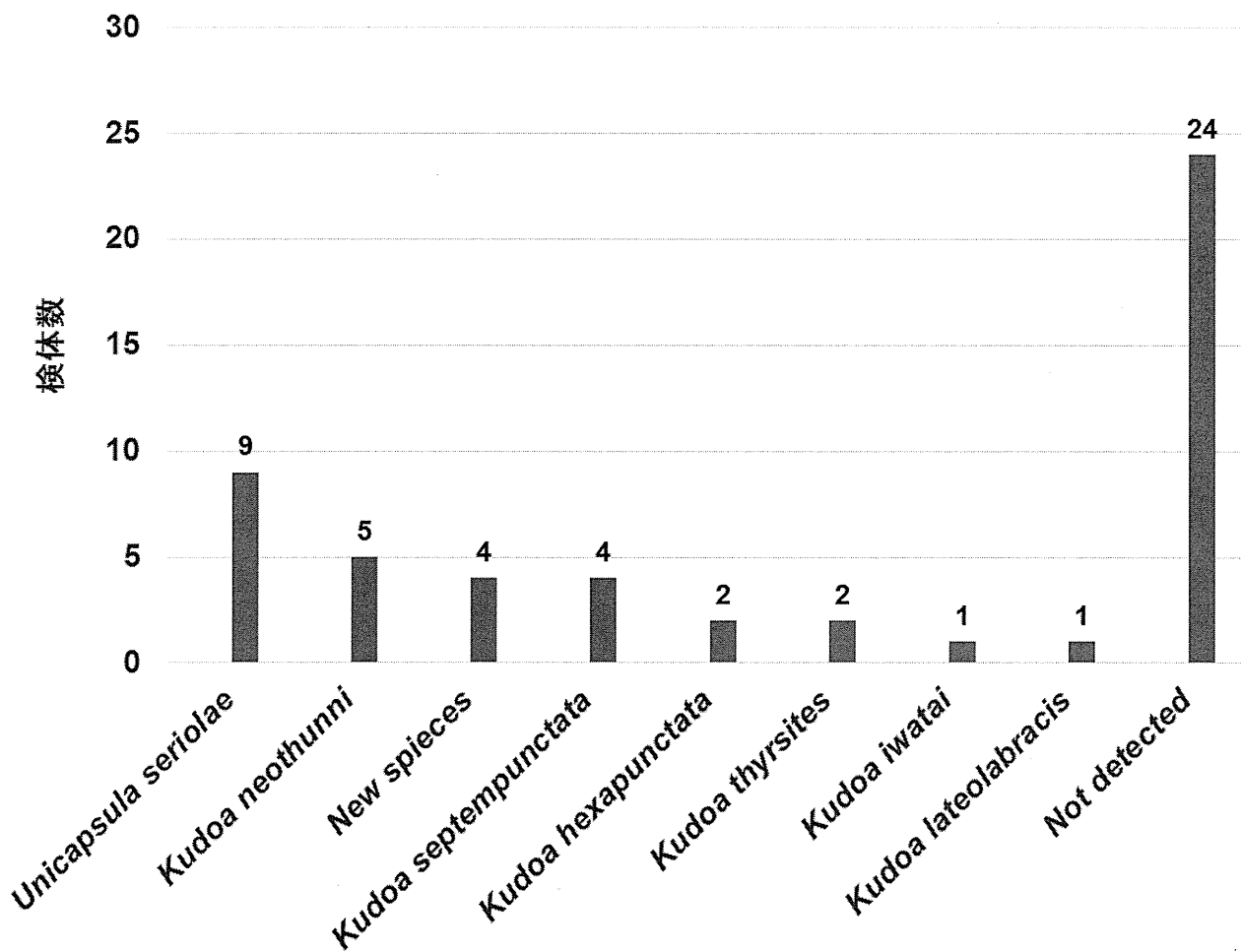


図3 有症苦情事例検体から検出された粘液胞子虫

表 1 カンパチから検出された粘液胞子虫

	DNAのみが検出	DNAと胞子が検出	計
<i>U. seriolae</i>	2	7	9 (65%)
<i>K. septempunctata</i>	3	0	3 (21%)
<i>K. neothunni</i>	1	0	1 (7%)
New species	1	0	1 (7%)

表2 マグロから検出された粘液胞子虫

	DNAのみが検出	DNAと胞子が検出	計
<i>K. neothunni</i>	1	3	4 (31%)
<i>K. hexapunctata</i>	1	1	2 (15%)
Not detected	0	0	7 (54%)

表3 タイ類から検出された粘液胞子虫

	DNAのみが検出	DNAと胞子が検出	計
<i>K. iwatai</i>	0	1	1(17%)
Not detected	0	0	5(83%)

表 4 シイラから検出された粘液胞子虫

	DNAのみが検出	DNAと胞子が検出	計
<i>K. thyrsites</i>	0	1	1 (25%)
Not detected	0	0	3 (75%)

表 5 サワラから検出された粘液胞子虫

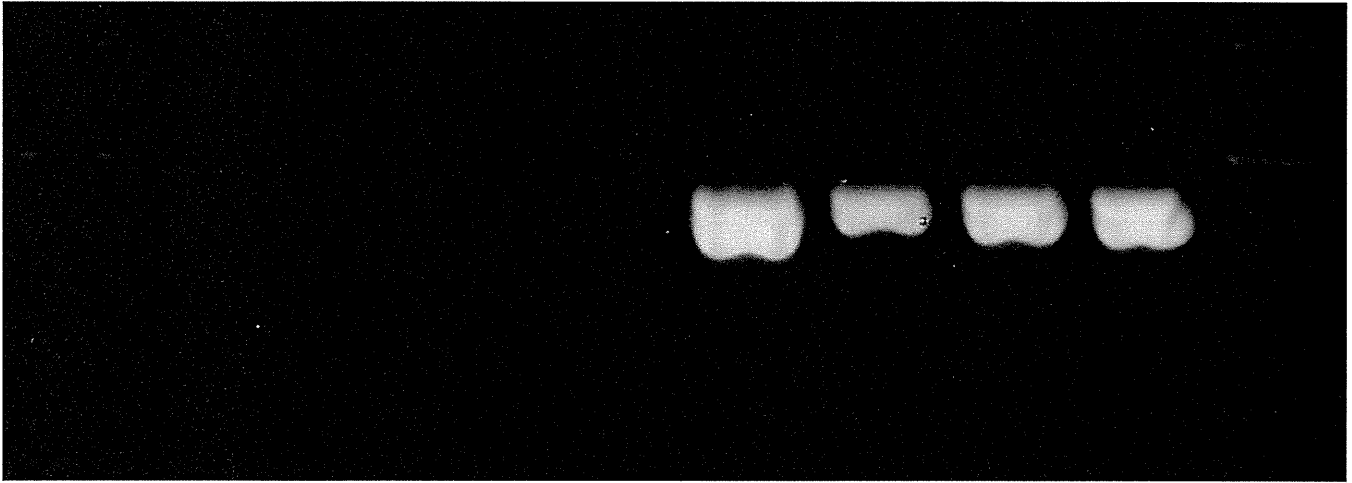
	DNAのみが検出	DNAと胞子が検出	計
New species	0	2	2(100%)

7月6日

7月7日

7月8日

7月9日



患者

—

—

+

+

図4 A県で発生したカンパチが原因食品とみられる事例

この施設では毎晩、カンパチの刺身が提供されていたが、患者が発生した7月8日と9日に提供されたカンパチで *U. seriolae* 特異的PCRが陽性になり、胞子も確認された

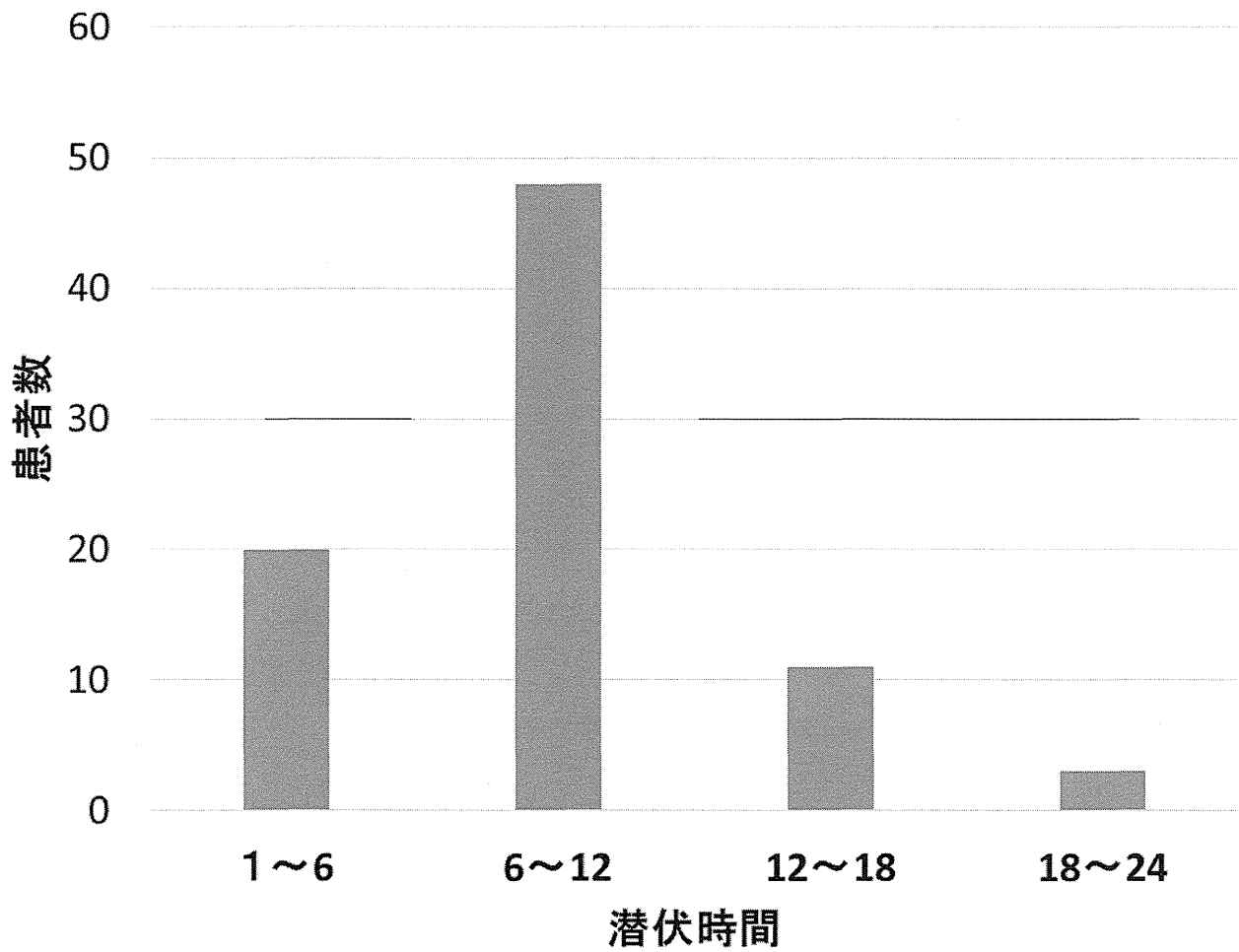


図5 カンパチから *U. seriolae* が検出された事例における潜伏時間
5 事例、82 名のデータを集計

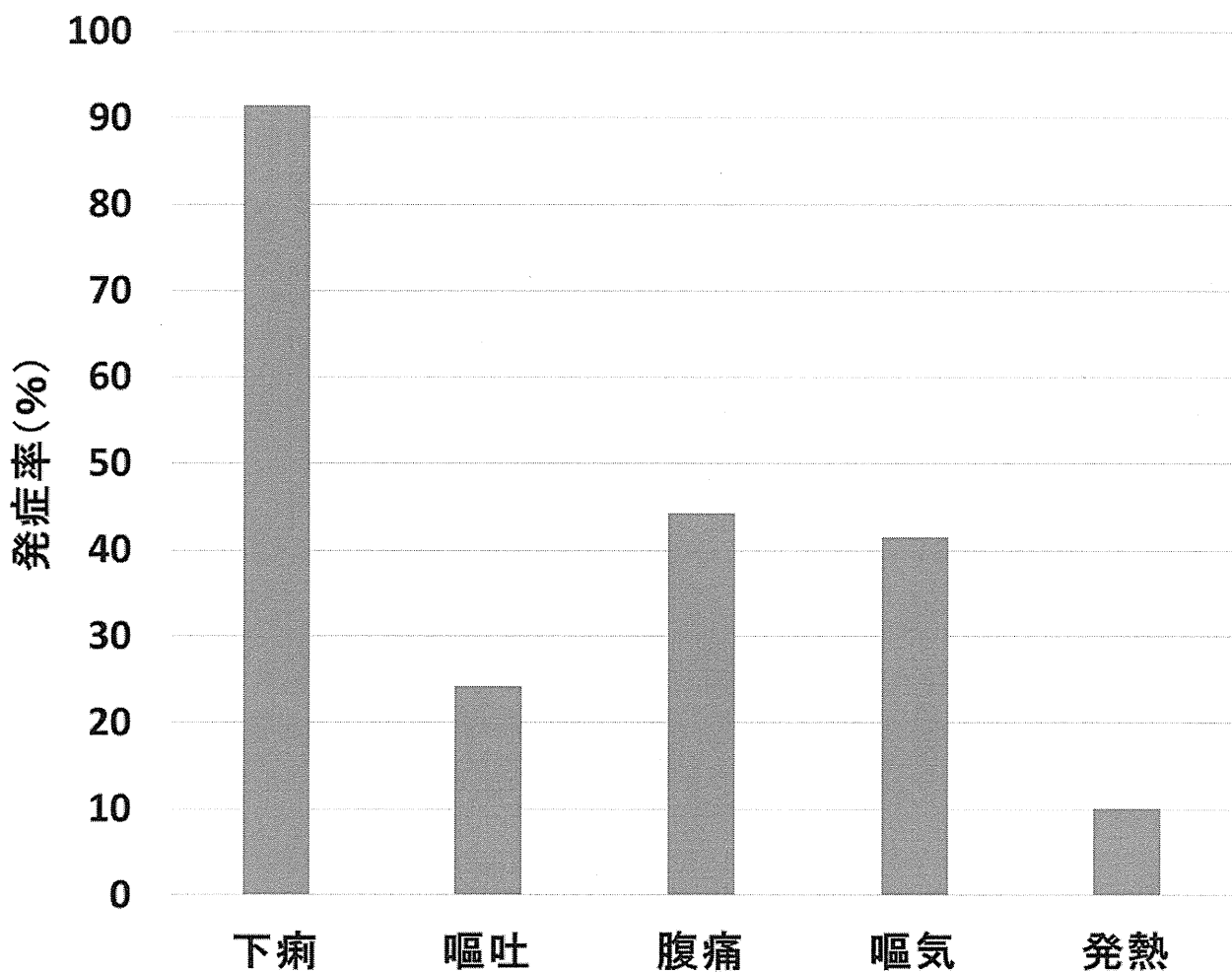


図6 カンパチから *U. seriolae* が検出された事例における症状
4事例、70名のデータを集計

1. プライマー

プライマーセット 1

Uni-F CGGATCTGCAGGTGAACCTAA

Uni-R AAACCACTTGGGCTCAAGTTCCATCGA

プライマーセット 2

Uni-F CGGATCTGCAGGTGAACCTAA

Uni-R2 AAACCACTTGGGCTTAAGCTCCATCGA

*データベースに登録されている *U. seriolae* の配列が2種類あるためプライマーセットを二種類用意した。どちらかひとつが陽性になる場合と両方のプライマーセットで陽性になる場合があるが、どちらかひとつが陽性になれば、スクリーニング陽性としてよい。

2. 試薬

Quick Taq HS DyeMix (東洋紡, DTM-101)

Quick Taq HS DyeMix 12.5 μ l

Primer-F (5 μ M) 1 μ l

Primer-R (5 μ M) 1 μ l

Template 2 μ l

H₂O 8.5 μ l

94°C 2 min

94°C 30 sec

55°C 30 sec

68°C 1 min ×30 サイクル

3. 結果判定

プライマーセット 1, 2 のどちらか一方、もしくは両方で 380 bp の増幅産物を確認できれば陽性とする。

図 7 *U. seriolae* 特異的 PCR プロトコール

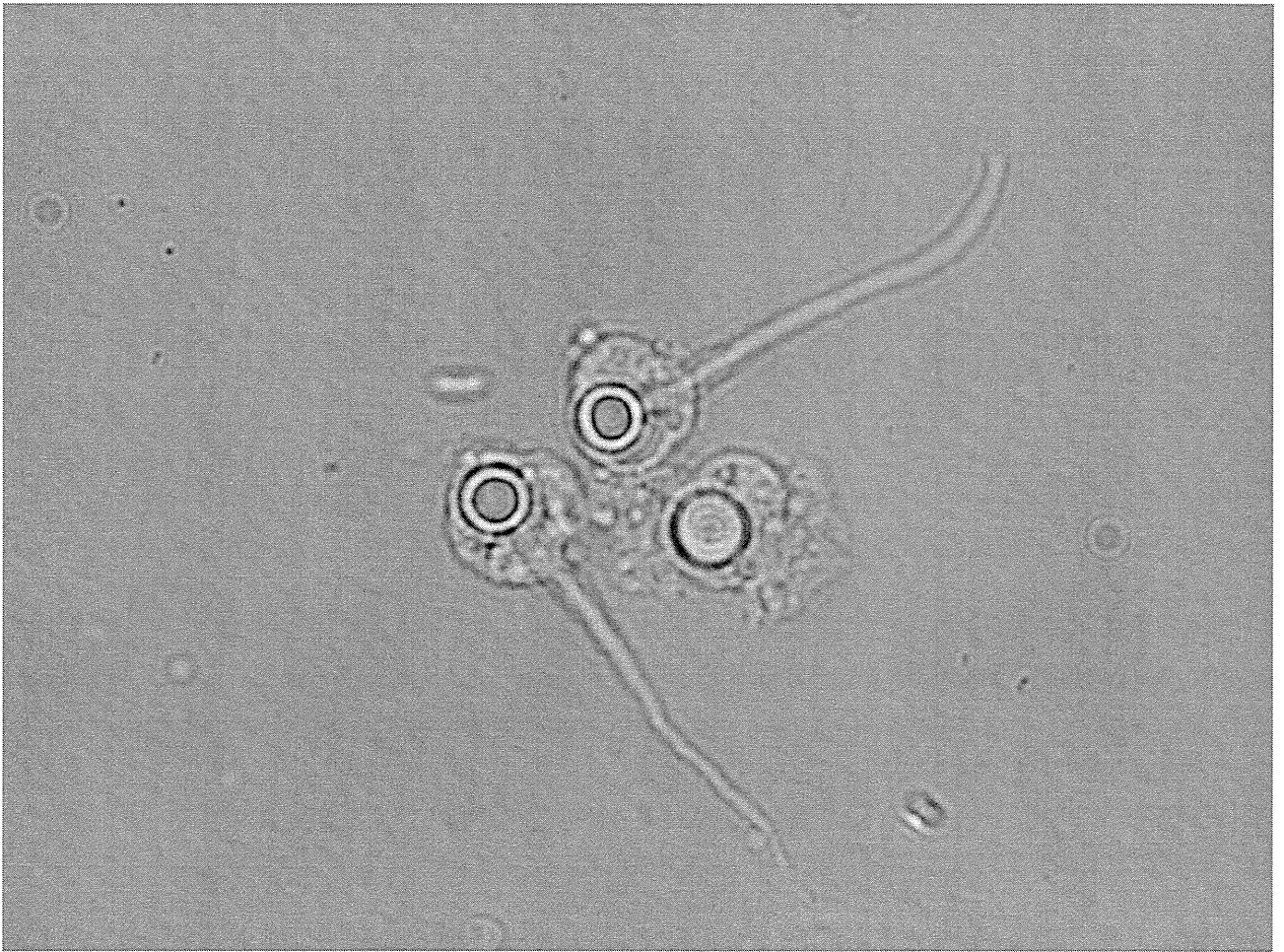


图 8A *U. seriolae* 孢子

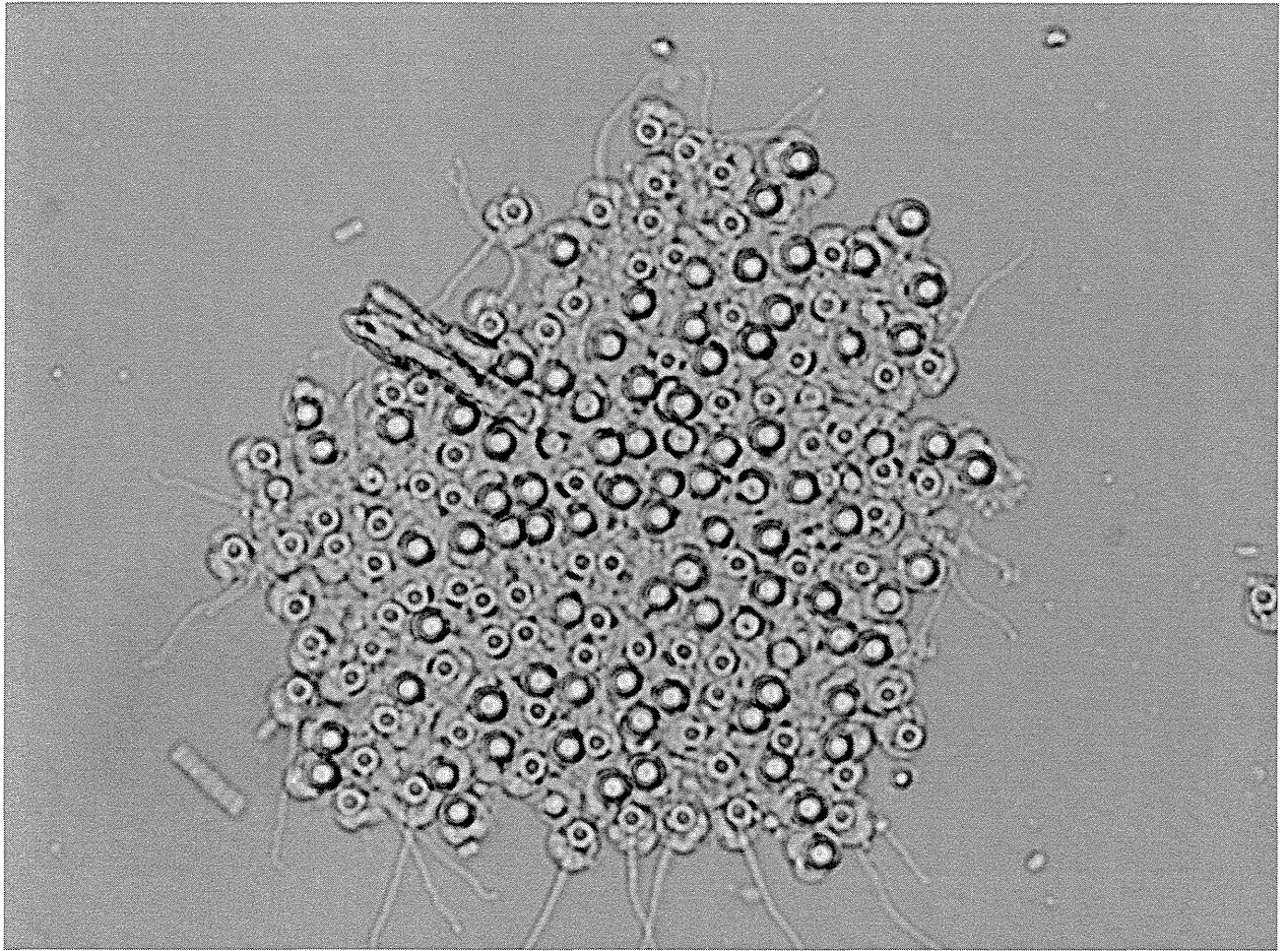


図 8B 塊を作る *U. seriolae* 孢子

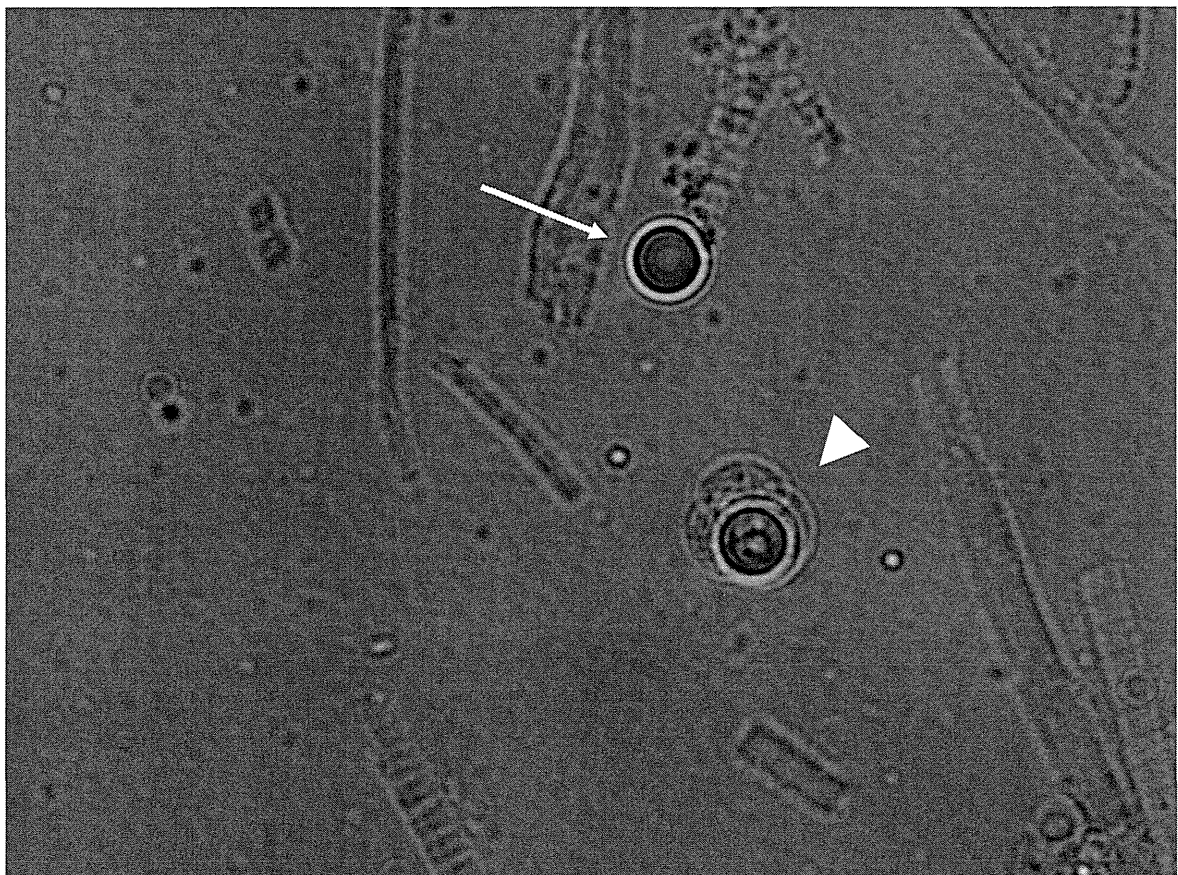
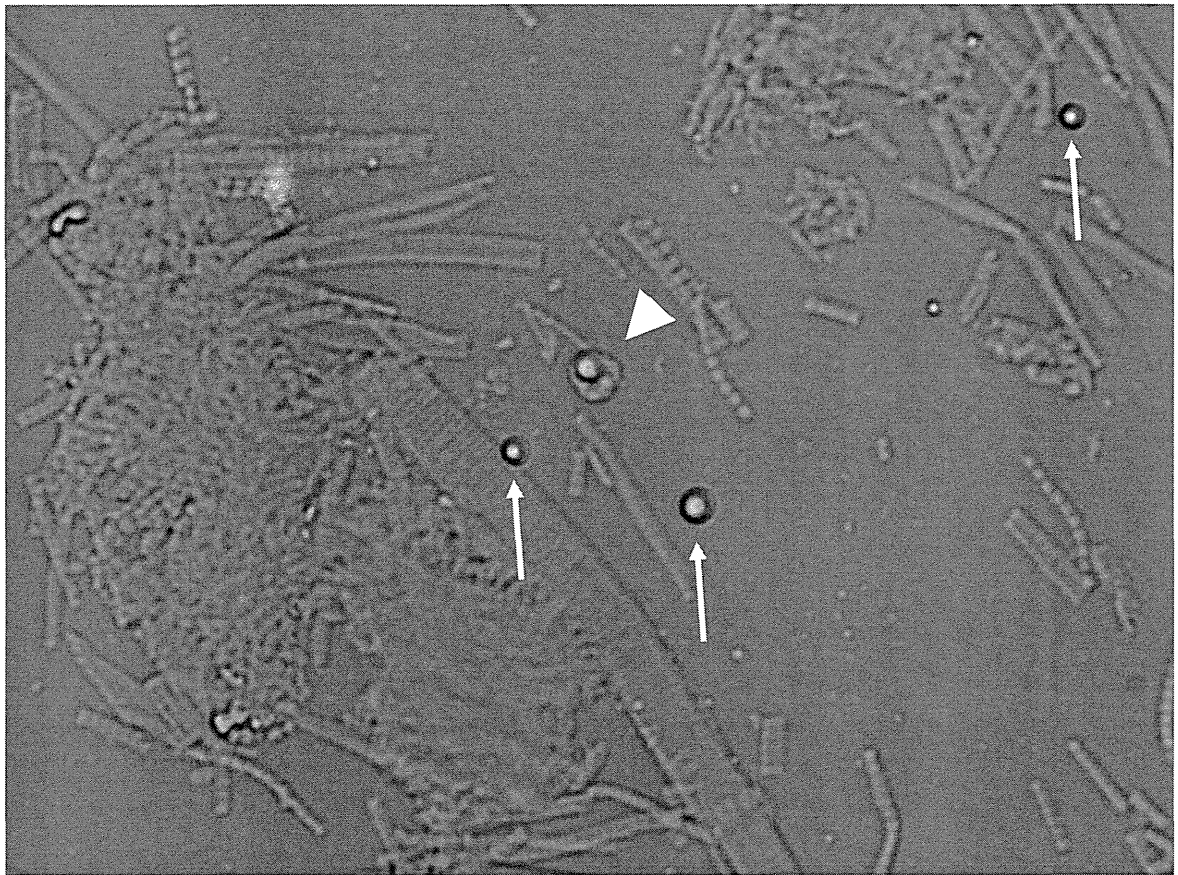


図 8C 油滴に見分けが付きにくい *U. seriolae* 胞子
矢頭：胞子 矢印：油滴

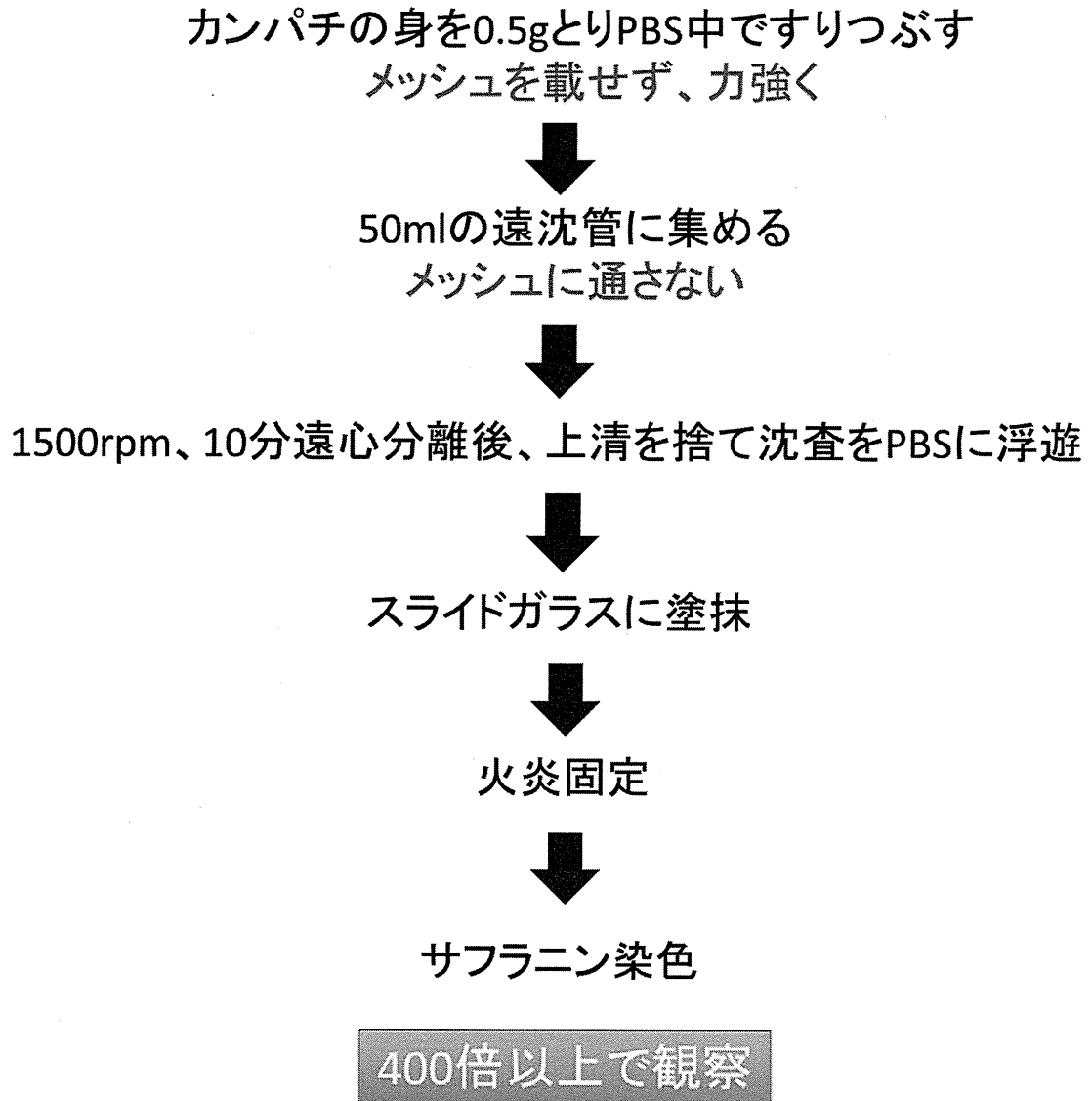


図9 *U. seriolae* の顕微鏡検査の手順

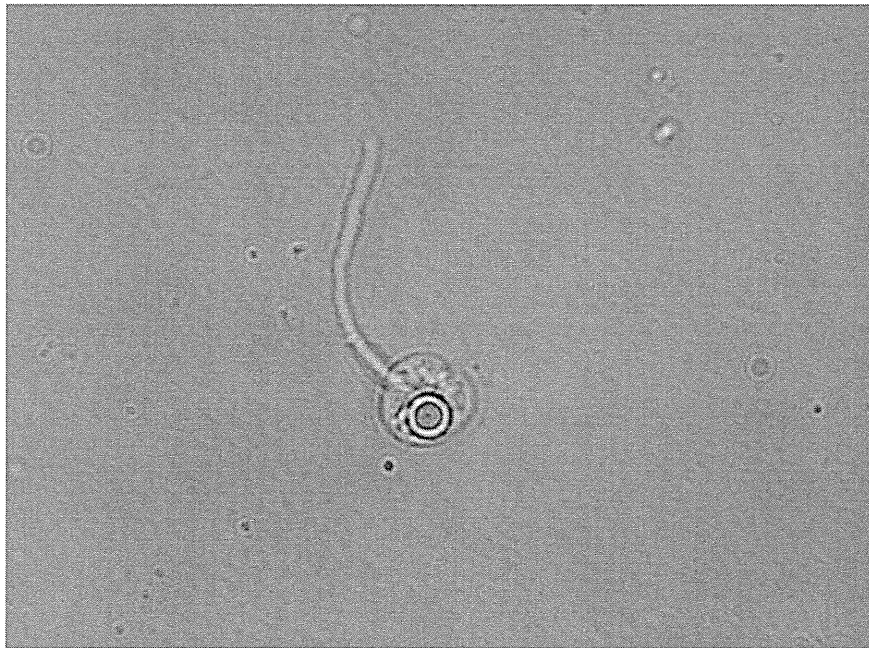
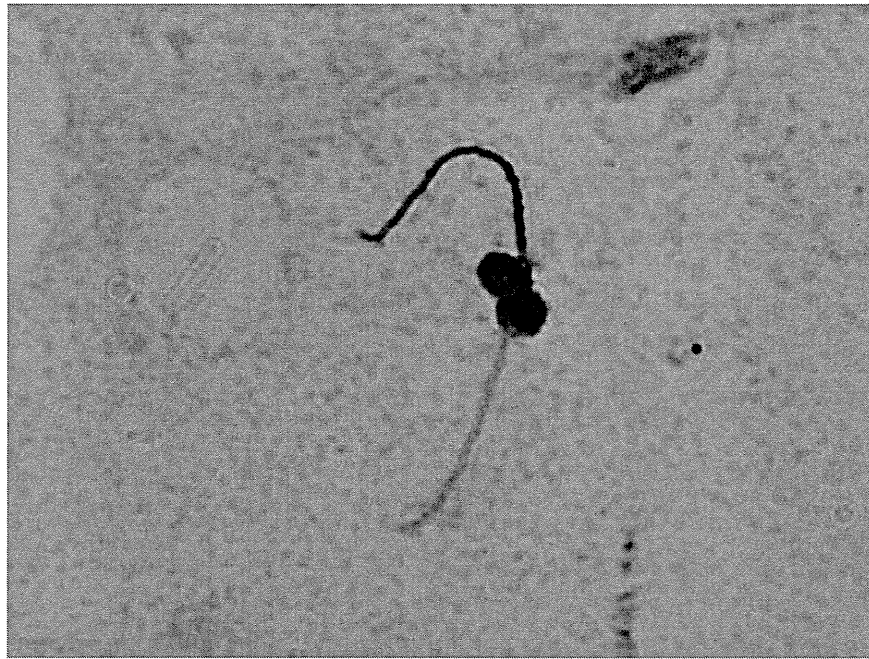


図 10 サフランニンで染色した *U. seriolae* 胞子(上)と未染色の胞子(下)

表6 タイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査に使用した魚種の内訳

タイ	マダイ	天然	4
		養殖	21
		不明	9
	チダイ		2
	クロダイ		2
	ハナダイ		2
	イシダイ		1
	イシガキダイ		1
	エボダイ		1
	アマダイ		1
	その他タイ		1
		小計	
その他 魚	シイラ		1
	サワラ		1
	メバチマグロ		1
	本マグロ		1
	スズキ		1
	小計		5
	合計		50