

平成 28 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）
分担研究報告書

クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究

研究分担者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 本間 幸子（川崎市健康安全研究所）
研究協力者 小河内麻衣（川崎市健康安全研究所）
研究協力者 鈴木 淳（東京都健康安全研究センター）
研究協力者 川上 優太（島根県保健環境科学研究所）

ヒラメの生食による原因物質不明の有症苦情事例は *Kudoa septempunctata*（以下クドア）が原因であることをこれまでの研究で明らかにしてきた。ヒラメ以外の食材を原因食とする有症苦情も多発している。今年度は以下の点に重点を置き検討を行った。

- 1) クドアは食中毒を引き起こした後、ヒト腸管内に生残するかどうかが不明であった。そこで、ヒト腸管内における生存性を検討し、クドアはヒト腸管内では長期間生存できないことを明らかにした。
- 2) 国内におけるクドア食中毒事例から分離したクドア株の遺伝子型別を行い、韓国型 ST3 株によって食中毒が引き起こされていることを確認した。
- 3) クドアは実験室で培養できないためクドアの凍結保存法を開発した。
- 4) カンパチが原因食と考えられる有症事例から高頻度に分離される *Unicapsula seriolae*（以下ユニカプスラ）の計数法およびリアルタイム PCR 法を確立した。
- 5) シイラが原因食と思われる有症事例が全国で散発している。そこで、発生頻度の高い島根県における事例のとりまとめ、および原因微生物推定の調査を行った。
- 6) タイによる有症事例が多いため、昨年引き続きタイにおける粘液胞子虫の汚染実態調査を行った。

A. 研究目的

近年、魚の生食による有症事例が多発している。これまでの研究からヒラメを原因食とする有症苦情事例は粘液胞子虫の 1 種である *Kudoa septempunctata*（以下、クドア）によって引き起こされることが明らかになっている。しかしながらクドア食中毒に関して不明な点が多く残されている。そのひとつとしてクドアが食中毒症状を引き起こした後、ヒトの腸管内で生残し増殖できるかどうかという点である。クドアは本来の宿主である海中の貧毛類の消化管上皮細胞間で増殖分化すると考えられている。一方、これまでの研究からクドアはヒトの腸管上皮細胞にも侵入す

ることが明らかにされている。クドア食中毒は一過性ではあるが激しい下痢や嘔吐を特徴とする。一過性であるため、現時点では患者に対して対処療法を中心に治療が行われている。しかし、もしクドアが貧毛類の腸管と同様、ヒトの腸管に生残し、あるいは増殖できるとすると、クドア食中毒に対する治療法を再考する必要がある。つまり、クドアのヒト腸管内における生存性を明らかにしない限りクドアのリスクを正しく評価したことにはならない。そこで、ヒト腸管環境におけるクドアの生存性を検討した。

クドアは cytochrome c oxidase subunit I (cox1) 遺伝子と large subunit rRNA (rnl) 遺伝

子の SNPs を調べることによって ST1, ST2, ST3 の三つの遺伝子型に分類することが出来る。興味深いのは国産のヒラメに寄生するクドアは ST1 もしくは ST2 であり。ST3 は存在しない。しかし、韓国産ヒラメに寄生するクドアは 90%以上が ST3 に分類される。しかし最近、ST3 は下痢毒性がなく食中毒の原因であるかどうか疑わしいという論文が韓国から相次いで公表されている。しかし、国内の食中毒は主に韓国産ヒラメによって引き起こされている。よって、食中毒事例から分離されるクドア株の遺伝子型別を行い、ST3 によって食中毒を引き起こされていることを証明する必要がある。そこで、国内におけるクドア食中毒分離株の遺伝子型別を行った。

クドアは寄生虫であるため現時点では実験室での人工培養は行えない。そのためクドアに関する研究が非常に困難なものになっている。人工培養の代わりにクドアを凍結保存できれば、クドア研究を継続的に行うことが出来る。そこで、クドアの凍結保存法を検討した。

近年、ヒラメ以外の魚の生食による有症事例が多発している。昨年度の研究成果からこれらの事例の 70%以上から粘液胞子虫が検出されている。症状もヒラメのクドア食中毒様でこれらの粘液胞子虫が原因微生物である可能性が示唆されている。これらの事例の中で最も多いのがカンパチの喫食による事例である。そしてカンパチの事例の 7 割以上から粘液胞子虫の一種である *Uncapsula seriolae* (以下、ユニカプスラ) が検出されている。昨年度の研究ではユニカプスラの定性的な検出法を確立した。しかし、今後さらにユニカプスラの疫学的な調査を行うためには定量的な検出法が必要である。そこで、ユニカプスラの計数法および定量リアルタイム PCR 法を検討した。

島根県は古くからシイラを生で喫食する習慣のある日本でも数少ない地域であるが、その一方でシイラの生食の関与が疑われる原因不明食中毒が過去に数件発生している。同様の食中毒は過去、沖縄県等で報告があるが、原因物質の特定には至っていない。

2014 年 10 月に島根県内の仕出し弁当屋で発生した原因不明食中毒事例 (事例 No. 7) では、患者

6 名中 5 名及び原因施設で保管されていた食材 (シイラなど) から *C. freundii* が分離された。パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による解析で、患者 5 名とシイラからの分離株が同一のパターンを示した (図 11)。分離株を国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に送付し、病原性の解析を依頼したところ、*C. freundii* 標準株と差はないが、ある程度の菌量が存在することにより下痢の原因となりうるとの回答があり、この *C.*

freundii と食中毒の関連が示唆された。

一方、近年ヒラメに寄生する粘液胞子虫 *K. septempunctata* が嘔吐、下痢を主症状とする食中毒を引き起こすことが判明し、その他の魚に寄生する粘液胞子虫が原因と疑われる事例も報告されている。また、以前からシイラに粘液胞子虫が存在することも知られており、本県の事例に検査をしていない *K. septempunctata* 以外の粘液胞子虫が関与している可能性も否定できない。また、本県ではシイラやヒラメ以外の鮮魚 (カンパチ等) の生食の関与が疑われる事例も発生している。以上を考慮し、県内流通するシイラ、カンパチの危害物質探査を行う目的で、*C. freundii*、粘液胞子虫による汚染状況を調査した。また細菌汚染の程度を調べる目的で細菌数を測定した。

また、タイ類による有症事例も発生しており、事例の喫食残品からクドア属の粘液胞子虫が検出されている。この粘液胞子虫が原因微生物であるかどうか検討するために、昨年引き続きタイ類における汚染実態調査を行った。

B. 研究方法

1. ヒト腸管環境におけるクドアの生存性の検討

本研究ではクドアの病原性の本体であると考えられているスポロプラズムの生存性を検討した。既報¹⁾に従い市場から購入したヒラメよりクドア胞子を精製し、 1×10^5 ml になるように 10% FCS を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium に浮遊させた。37°C で 1 時間培養後、胞子から放出されてきたスポロプラズムを種々の条件で培養し生死を判定した。スポロプラズムの生死の判定は細胞膜非透過性色素 SYTO9 (Thermo Fisher

Scientific) で染色されたものを死細胞と定義した。スポロプラズムが 100 以上含まれる視野を 15 視野選び、生細胞と死細胞を計数し、スポロプラズムの生存率とした。

今回はスポロプラズムの生存性をヒト腸管環境と本来の宿主である貧毛類の消化管の環境とで比較した。特に浸透圧、温度、消化液の影響を比較した。ヒトの腸管の浸透圧はいわゆる生理的な浸透圧で、温度は 37℃であるが、貧毛類の浸透圧は海水に等張で温度も海水温にほぼ等しい (15~25℃)。また、貧毛類の消化液には胆汁が含まれていない。浸透圧の影響を見る場合、25℃で生理的な浸透圧に等張な 0.9% 食塩水もしくは海水に等張な 3.4% 食塩水中でクドアを培養した。温度の影響を調べる場合、3.4% 食塩水中で 25℃もしくは 37℃で培養した。消化液の影響を調べる場合は 0.5% 胆汁、0.01% トリプシン、0.01% パンクレアチン、0.1% ムチンを含む PBS を人工腸管液として、この中でスポロプラズムの生存性を検討した。

2. 食中毒由来クドア株の遺伝子型別

検体のヒラメは全国で発生した食中毒の残品を自治体から分与していただいたものを使用した。今回は 2013 年から 2016 年に発生した 32 検体を用いた。クドアの遺伝子型別は既報²⁾に従った。

3. クドアの凍結保存法の確立

市場から購入したヒラメよりクドアを精製し、市販の各種細胞凍結液に 10⁶/ml になるように浮遊させ -80℃ 保管した。その後、定期的にバイアルを解凍し、「1. ヒト腸管環境におけるクドアの生存性の検討」で述べた方法でスポロプラズムの生存性を検討した。16 か月後の胞子の毒性を Caco-2 細胞を用いた方法³⁾で測定した。

4. ユニカプスラの計数法の確立

有症苦情事例の残品のカンパチ中から昨年度報告した方法で定性的にユニカプスラの検出を行い、陽性となったものを検体として用いた。ユニカプスラは孢子同士の接着性が強く凝集塊を作る傾向が高い。また、形態は円形状で特徴がす

くなく、直径がクドアの半分の 5 μm しかないため観察しづらい。そこで、ヒラメのクドア計数法をベースにしながら上記の問題点を解決できる計数法を検討した。

5. ユニカプスラのリアルタイム PCR 法の確立

ユニカプスラの 18SrDNA を標的にし Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) を使用してプライマー及びプローブを設計した。複数の候補の中から増幅効率が高いものを採用した。PCR の増幅産物は pMD20-T ベクターにクローニングし陽性コントロールとして使用した。

6. シイラが原因食と想定される有症事例に関する調査

(A) 事例調査

過去に島根県内で発生したシイラの生食の関与が疑われている有症事例について

島根県内の各保健所に照会した。対象事例は過去 5 年間 (2011 年 4 月 1 日から 2016 年 3 月 30 日) に各保健所管内でシイラの喫食後に発症した有症事例とし、調査事項は発生年月日、シイラ料理、シイラの産地、調理場所、喫食場所、症状、喫食者数、有症者数、シイラ喫食から発症までの時間、シイラ水揚げから発症までの時間、有症者の食中毒細菌 (サルモネラ、腸炎ビブリオ、病原大腸菌など 16 菌種)・ノロウイルス・*K. septempunctata* を対象とする便検査結果とした。

(B) 県内流通するシイラ、カンパチの細菌、粘液胞子虫による汚染状況調査

(1) 調査対象

細菌分離を行うため、あまり人の手が加えられていないと思われる魚丸ごと一匹および半身を中心に購入した。例年県内産のシイラは 6 月から 10 月に流通することから 2016 年の同時期に、シイラ (15 匹、刺身 2 パック)、カンパチ (半身 3 枚) を県内の販売店から購入した。

(2) 細菌検査に用いる試料の調整

魚の体表の汚染状況を調べるため、拭き取りチェック II (栄研化学) を用い、取扱説明書に従って魚の体表 100 cm² の拭い液を作成した。また、

体表からの汚染を避けるため、70%エタノールで体表を消毒した後、皮と身を採取した。3種の試料（拭い液、皮、身）を細菌検査（細菌数、*C. freundii*）に用いた。

(3) 細菌数

検体のそれぞれ2箇所から10gずつ採取した身と皮の試料を生理食塩水で10倍希釈後、段階希釈し、常法により1gあたりの細菌数（CFU/g）を求めた。拭い液試料はそのまま段階希釈し、1mlあたりの細菌数（CFU/ml）を求めた。

(4) *Citrobacter freundii*

(3)で残った身、皮の10倍希釈液（拭い液は試料10ml）それぞれに倍濃度TSB（シスメックスバイオメリュー）を等量加え、増菌培養（37°C±1°C、24h）した。培養液を*C. freundii*、*Citrobacter braakii*が保有するcycloplopane fatty acid synthaseをコードする遺伝子（*cfa*）を増幅するPCRによりスクリーニングした。陽性であった場合、培養液100μlをDHL寒天培地（極東製薬）に塗抹し、分離培養（37°C±1°C、24h）、API20e（シスメックスバイオメリュー）により同定した。

(5) 粘液胞子虫の鏡検

身と皮はそれぞれ2箇所から0.5gずつ採取し、10mlのPBSを加え、潰した。この身と皮、拭い液試料10mlをそれぞれ遠心（1,500rpm、10min）し、沈渣をPBSに再浮遊、各種染色後、鏡検した。染色はトリパンブルー染色、火炎固定後のサフラニン染色、メタノール固定後のギムザ染色の3つの方法を用いた。

(6) 粘液胞子虫の遺伝子検査

身と皮はそれぞれ2箇所から35mgずつ使用し、拭い液は試料10mlを遠心（1,500rpm、10min）後、沈渣を35μl使用した。QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN）にてDNA抽出し、粘液胞子虫の28S ribosomal DNA（28S rDNA）をターゲットとしたPCRを行った。陽性であった場合、増幅産物を精製後、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）でダイレクトシーケンスし、NCBI BLAST

（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を用いて相同性検索を行った。

7. タイ類における粘液胞子虫汚染実態調査

川崎市内でタイ類50検体を無作為に購入した。顕微鏡検査によって粘液胞子虫の胞子の確認を行うとともに、遺伝子検査を行った。検体からのDNA抽出はQIAamp DNA Mini kitを用いて行った。検体が丸の魚の場合、3か所からDNAを抽出した。PCRは粘液胞子虫の18SrDNAをターゲットとした既報⁴⁾に従って行った。得られたのバンドを切り出し、シーケンス解析を行った。塩基配列の由来NCBIの遺伝情報データベースでBLAST検索を行い決定した。18SrDNAだけで種を決定できなかった場合、28SrDNAのシーケンス解析も行った⁵⁾。

C. 研究結果

1. ヒト腸管環境におけるクドアの生存性の検討

まず、浸透圧がスポロプラズムの生存性に及ぼす影響を検討した（図1）。本来の宿主である貧毛類の環境に近い3.4%食塩水中でスポロプラズムを培養すると、72時間後でも80%以上のスポロプラズムが生存していた。しかし、ヒトの浸透圧に近い0.9%食塩水中でスポロプラズムを培養すると、急速に死滅し72時間後には約20%に減少した。

次に温度の影響を検討した（図2）。まず、冬の貧毛類の温度に近い15°Cでスポロプラズムを培養すると、72時間後でも生存率にほとんど変化は見られなかった。夏の貧毛類の温度に近い25°Cで培養すると72時間後には生存率は若干低下するが、80%以上のスポロプラズムが生存していた。しかし、ヒトの体温に近い37°Cで培養すると、スポロプラズムの生存率は急速に低下し、48時間後には10%にまで低下した。

腸管液に対する感受性を調べるためにスポロプラズムを人工腸管液中で培養したところ4時間ですべてのスポロプラズムが死滅した（図3）。そこで、人工腸管液の構成成分それぞれとスポロプラズムを培養したところ、0.5%胆汁と培養すると4時間ですべてのスポロプラズムが死滅した（図4）。

2. 食中毒由来クドア株の遺伝子型別

2013年から2016年の間に発生したクドア食中

毒の内、32 事例から分離されたクドア株の遺伝子型別を行った(表 1)。国産ヒラメによる事例から分離されたのは 9 株で、ST1 が 2 株 (22%)、ST2 が 7 株 (78%)、ST3 は分離されなかった。韓国産ヒラメから分離されたのは 23 株で、ST2 が 1 株 (4%)、ST3 が 22 株 (96%)、ST1 は分離されなかった。32 株中 ST3 は 22 株 (69%) であった。

3. クドアの凍結保存法の確立

予備実験の結果、セルバンカー 1 (日本全薬工業) がクドアの凍結保存に適していたため、長期保管試験を行った。ヒラメから精製したクドア胞子をセルバンカー 1 に 1×10^6 /ml 浮遊させて -80°C に保管した。16 か月間の間に適宜バイアルを解凍し、スポロプラズムの生存率を測定した。その結果、解凍した胞子を顕微鏡で観察すると胞子自体はかなり損傷していた(図 5)。しかし、スポロプラズムは特徴的なアメーバー状の不定形を維持しており、活発に運動していた。バイアルによって生存率にばらつきが見られたが 16 か月間の間で 70%を下回ることはなかった(図 6)。16 か月間保管した胞子の毒性を Caco-2 細胞を用いて測定すると、クドアを Caco-2 細胞に接種後、1 時間で経上皮電気抵抗 (TER) が急速に 60%低下した(図 7)。この値は新鮮な胞子を接種したときの毒性に比べて 25%弱いものであった。

4. ユニカプスラの計数法の確立

ユニカプスラの計数法はヒラメの筋肉中のクドア胞子を計数する際の通知法をもとに作成した。クドア胞子は胞子同士が接着しやすいため正確な計数が困難である。様々な方法を検討した結果、検査を始める前に検体を -20°C で一晩凍結すると胞子同士の接着を抑えることが出来ることが明らかになった。また、ヒラメの筋肉抽出液を濾過する際、100 μm のメッシュにとおしていたが、ユニカプスラの胞子は 5 μm とクドア胞子の半分しかないため、濾過に 40 μm のメッシュを使用すると計数自体に影響を与えず、カンパチの筋肉の残渣をさらに取り除くことが出来るため、計数しやすくなることが明らかになった。さらに、胞子液と 10% KOH 溶液を混合すると、胞子から極糸が弾出するため、カンパチ由来の油滴と見分けや

すくなる。また、位相差顕微鏡を用いて対物レンズを pH1 で観察すると胞子に黒く影が付くためさらに観察しやすくなることがわかった。今回の研究で確立したユニカプスラの計数法を図 8 に示す。

5. ユニカプスラのリアルタイム PCR 法の確立

今回確立したリアルタイム PCR のプロトコールを図 9 に示す。陽性コントロールプラスミドを用いて検量線を作成したところ 10^9 コピー/反応から 10^2 /反応まできれいな直線性を有していた(図 10)。増殖効率は 93.1%であった。

6. シイラが原因食と想定される有症事例に関する調査

(A) シイラの生食が関与する事例(表 2)

年間に本県でシイラの生食が関与した事例は 7 件、有症者は 23 名であり、いずれも夏から秋(7月から10月)にかけて発生していた(表 2)。シイラの産地で判明しているものは全て県内産(6件、85、7%)であり、シイラ料理は刺身が 6 件(85、7%)、酢漬けが 1 件(14、3%)であった。症状は全ての事例で下痢が確認され、嘔吐も 5 件(71、4%)で確認された。喫食後 3、5~5 h の比較的短時間で発症した事例が多かった(5 件、71、4%)。シイラ水揚げから 24 h 以内に調理、喫食後発生した事例があった(3 件、42、9%)。また、これらの事例ではいずれも食中毒の起因となる病原性細菌等は検出されなかった。

(B) 県内流通するシイラ、カンパチの細菌、粘液胞子虫による汚染状況調査

(1) 細菌数(表 3)

シイラの細菌数は拭い液で 4~1、400 CFU/ml、身で <5~400 CFU/g、皮で <5~30、000 CFU/g であった。カンパチでは拭い液で 1~18 CFU/ml、身で <5~1、000 CFU/g、皮で <5~100 CFU/g であった。

(2) *Citrobacter freundii* (表 3)

C. freundii はシイラからは丸ごとの 7 検体から分離されたが(7/15、46.7%)、刺身 2 検体からは分離されなかった。シイラ全体では 41、2% から分離された(7/17)。分離された試料は拭い液 6、身 1、皮 4 であり、拭い液からが最も多かった(6/7、85.7%)。カンパチからは半身 3

枚中 2 枚 (66.7%)から分離され、分離された試料はいずれも拭い液、身であった。

(3) 粘液胞子虫の鏡検 (表 3、図 12A、12B、2C)

シイラの鏡検で粘液胞子虫が疑われる異物が観察されたのは No. 15 (2016 年 9 月 26 日購入) の 1 検体 (5.9%、1/17) のみであった。No. 15 では身 2 箇所、皮 2 箇所から、トリパンプルー染色による鏡検で直径約 2、8 μm の 3 つの球体が繋がったような構造 (図 12A) が観察され。その個数はシイラの身 1g あたり約 8、6 $\times 10^5$ 個程度であった。これはサフラニン染色やギムザ染色ではオタマジャクシのような極糸を持つ構造 (図 12B、C) をしていた。

なお、カンパチで異物は確認されなかった。

(4) 粘液胞子虫の遺伝子検査

シイラの遺伝子検査で粘液胞子虫が陽性となったのは No. 15 と No. 19 (2016 年 10 月 24 日購入) の 2 検体 (11.8%、2/17) であった。No. 15 では身 2 箇所、皮 2 箇所が PCR 陽性を示し、*Uncapsula setoensis* の 28 S rDNA と 92% の identity を認めた。この検体 No. 15 は 18 S ribosomal DNA (18 S rDNA) をターゲットとしたシーケンス解析したところ、*Uncapsula pyramidata* に近い配列を認めた No. 19 では皮 1 箇所 PCR 陽性を示し、*Kudoa hexapunctata* の 28 S rDNA と 93% の identity を認めた。

また、カンパチで陽性となったのは No. 4 の 1 検体 (5.9%、1/17) であった。No. 4 は身 1 箇所 PCR 陽性を示し、*Kudoa sp.* HZK-1 の 28 S rDNA と 92% の identity を認めた。

7. タイ類における粘液胞子虫汚染実態調査

川崎市内で無作為にタイ類 50 検体を購入した。内訳はマダイ 43、チダイ 2、クロダイ 4、レンコダイ 1 であった (表 4)。検体の産地は東北 3、関東 4、甲信越 2、東海 5、関西 3、中国 3、四国 17、九州 11、その他 2 であった (表 5)。これらの検体中の粘液胞子虫の DNA 検出を行ったところ、3 検体で陽性となった (表 6)。陽性率は 6% であった。マダイ、クロダイ、チダイそれぞれ 1 検体から *Kudoa thyrsites* が検出された。いずれの検体からも顕微鏡観察で胞子の確認はできなかった。昨年度の結果は 50 検体中 2 検体が陽性でサワラと

ハナダイから *Kudoa sp* と *K. thyrsites* がそれぞれ検出されている (表 4、5、6)。昨年度と今年度の結果を合わせると 100 検体中 5 検体がクドア陽性となり、陽性率は 5% となった (表 6)。

D. 考察

1. ヒト腸管環境におけるクドアの生存性の検討

今回の結果からクドアのスポロプラズムはヒトの浸透圧、温度条件下では急速に死滅していくことが明らかになった。特に温度に対しては感受性が強く培養 48 時間後に 90% のスポロプラズムが死滅した。また、胆汁に対して強い感受性を示した。実際にはクドアはヒラメの筋肉中に存在し、食事の時にはヒラメ以外の食品も消化管内に存在しているため、今回の実験結果で見られたような 4 時間ですべてのスポロプラズムが死滅するといったような極端な影響は出ないと思われる。しかし、今回の結果は腸管液がクドアの感染に対して防御的な役割を有していることを示唆している。

今回の結果をまとめると、クドア胞子を含むヒラメを喫食後、腸管内でクドア胞子からスポロプラズムの放出が起こる。多くのスポロプラズムは胆汁の働きによって死滅すると考えられるが、残ったクドアは腸管上皮細胞層に侵入する。しかし、腸管上皮細胞層に逃げ込めたスポロプラズムも浸透圧や温度がクドアの生存に適していないため、死滅していくと考えられる。現在、クドア食中毒患者に対しては駆虫などの特別な処置は行われていないが、今回の結果から、この治療方針を今後も変更する必要はないと思われた。

2. 食中毒由来クドア株の遺伝子型別

今回検討したクドア食中毒事例 32 件の内、韓国産ヒラメによって引き起こされたものは 23 件であった。その内、ST3 株が分離された事例は 22 件に上った。32 件中、22 件 (69%) が ST3 株によって引き起こされていた。これまでに相次いで ST3 株に下痢毒性はないとの報告が韓国の研究者から発表されているが、今回の結果からも明らかのようにわが国のクドア食中毒の大部分は韓国産ヒラメによって引き起こされており、そのほとんどは ST3 株によるものである。この結果は韓国の研

究者の主張と矛盾するものである。今後もスクリーニングを行い、監視を継続していく必要が認められた。

3. クドアの凍結保存法の確立

今回の結果からセルバンカー1 を使用することによって、最低 16 か月間はスポロプラズムの生存率をほとんど低下させることなく保存できることが明らかになった。しかも、スポロプラズムが持つ毒性も保持したまま保存できた。セルバンカー1 には血清が含まれていることは示されているが、それ以外の成分については公表されていない。しかし、セルバンカー1 と孢子を混ぜるだけという簡便な操作だけで特別な機器も必要としない。さらに、セルバンカー1 は世界中の多くの国で入手が可能である。以上のことから、今回確立したクドアの凍結保存法はクドア研究に大きく貢献するものと思われる。

4. ユニカプスラの計数法の確立

今回確立した計数法はユニカプスラの計数時に問題になっていた孢子同士が凝集し計数が困難になる現象や、孢子が小さくカンパチ由来の油滴と判別が難しいといった問題点をすべて解決している。検査にかかる時間も短く、30 分もあれば終了できる。今後、今回確立した方法を用いて事例残品中のユニカプスラの計数を行い、発症に必要な孢子数の推定などを行っていききたい。

5. ユニカプスラのリアルタイム PCR 法の確立

今回、確立したユニカプスラに対するリアルタイム PCR 法は 1 反応当たり 10^2 コピー以上のユニカプスラを検出できる。また他のクドア属粘液孢子虫は検出しない。ヒラメのクドア食中毒ではスクリーニング検査としてのリアルタイム PCR 法と確定検査としての顕微鏡検査とに分かれている。ユニカプスラのリアルタイム PCR 法もスクリーニング検査として、多検体を処理するときに威力を発揮すると考えられる。また、検出感度が顕微鏡検査に比べてはるかによいため、孢子を検出できない感染初期の魚を検査するのにも利用できると思われる。今後、事例残品中のユニカプスラの DNA コピー数を本検査法を用いて調べ、発症に必

要なコピー数を明らかにできれば、事例発生時の迅速検査法として利用できるようになると思われる。

6. シイラが原因食と想定される有症事例に関する調査

2011 年 4 月 1 日から 2016 年 3 月 30 日にかけて島根県ではシイラの生食の関与が疑われる原因不明事例が 7 件発生し、発生時期はいずれも夏から秋（7 月～10 月）であった。症状は下痢、嘔吐が中心であり、初発患者の潜伏時間が 3.5～5 h と比較的短時間で発症した事例が 7 件中 5 件であった。また、いずれの事例でも食中毒の原因となる病原性細菌等は検出されなかった。これらの特徴は沖縄県等の報告と一致した。

7 事例のうち 2014 年 10 月に発生した事例 No. 7 は、他の事例と同様、病因物質は特定できなかったが、患者 6 名中 5 名及び原因施設で保管されていた食材（シイラなど）から *C. freundii* が分離された。パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による解析 (図 11) で、患者 5 名とシイラからの分離株が同一のパターンを示し、事例 No. 7 との関連が示唆されたことから県内流通するシイラ、カンパチにおける *C. freundii* の汚染状況を調査した。その結果、シイラ、カンパチともに *C. freundii* が分離されたが、その 8 割程度が拭い液から分離されており、*C. freundii* 自体が環境中に存在する細菌でもあることから、この結果だけではシイラが関与する食中毒の原因物質として断定することは難しく、今後事例 No. 7 分離株の病原性について詳しく解析する必要がある。

食品衛生法では生食用鮮魚介類の細菌数についての規格はない。今回の結果と単純に比較できないが、生食用冷凍鮮魚介類の規準 (100,000 CFU/g 以下) と比べるとシイラ、カンパチともに全てこの基準を下回っていた。

7 件の原因不明事例では、発生時期、症状、初発患者の潜伏時間、生魚の喫食があることなど、粘液孢子虫 *K. septempunctata* の食中毒と共通点があったことから県内流通するシイラ、カンパチにおける汚染状況調査を行った。

その結果、検体 No. 15 のシイラで鏡検により

直径約 2.8 μm の 3 つの極囊と思われる球体が繋がったような構造体が観察された。28 S rDNA をターゲットとしたシーケンス解析では *U. setoensis* の同領域と identity が高く、18 S rDNA をターゲットとした場合、*U. pyramidata* と identity が高い結果が得られ、検体 No. 15 の構造体はデータベースに登録されていない（新種）の粘液胞子虫であることも考えられた。なお *U. setoensis* の構造に関する文献は得られなかったが、*U. pyramidata* の文献では径 6.8 から 7 μm とされ、形状が異なっていた。今後解析領域を広げることや DNA サンプルを次世代シーケンサーにより解析するなどして同定したい。

また、検体 No. 19 のシイラでは *K. hexapunctata* の 28 S rDNA に近い配列が検出された。鏡検では全く胞子を検出することができなかったことや皮の 1 箇所ではしか検出されなかったことから、鏡検の検出限界（胞子数 $10^5/\text{g}$ ）未満であったかもしくは胞子形成前の発育段階であった可能性も考えられた。この *K. hexapunctata* については、Caco-2 細胞に対する病原性や原因と疑われる事例も報告されていることから今後シイラが関与した事例発生の際は留意しておく必要がある。ただ、検体 No. 19 については 18 S rDNA をターゲットとした解析は行っておらず、検体 No. 15 と同様、異なる結果が得られる可能性があることから、今後解析を試みたい。

検体 No. 4 のカンパチでは *Kudoa* sp. HZK-1 の 28 S rDNA に近い配列が検出された。これも鏡検では全く胞子を検出することができず、身の 1 箇所ではしか検出されなかったことから、鏡検の検出限界未満、胞子形成前の発育段階であった可能性が考えられた。検体 No. 4 も 18 S rDNA は今後解析する予定である。

シイラやカンパチに寄生する粘液胞子虫については以前から存在が知られているが、今回確認された粘液胞子虫がそれらから確認されたとする報告はない。また、*K. septempunctata* 以外の多くの粘液胞子虫のヒトに対する病原性に関してはこれまでにほとんど研究されていないことから、まだ多くの研究の余地があると思われる。

本県はシイラを生で喫食する習慣のある地域

であり、シイラに加えその他の生食用魚類（カンパチ等）の関与が疑われる原因不明事例も複数発生している。このような原因不明事例は再発防止のための指導や啓発が難しい。今回の調査ではまだ検体数が不足していると思われることから、同様の調査を継続し、シイラやカンパチをはじめ魚の生食が関与すると疑われる事例の原因究明の一助としたい。

7. タイ類における粘液胞子虫汚染実態調査

タイ類の生食に関連する有症事例が多発している。多くの場合、喫食残品から *K. iwatai* が検出されている。しかし、*K. iwatai* が原因微生物なのか、無害な寄生虫なのか不明な点が多い。そこで市場に流通しているタイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査を昨年度から引き続き行った。その結果、2 年間で 100 検体の調査を行ったが *K. iwatai* は検出されなかった。一方で、事例残品からは *K. iwatai* が高率に分離される。このことは *K. iwatai* が原因微生物である可能性を示唆している。今後さらに検体数を増やし、*K. iwatai* の起病性について検討を行いたい。

また、この汚染実態調査では 100 検体中 4 検体から *K. thyrssites* が検出された。*K. thyrssites* に関しては不明な点が多く、その病原性についても明らかになっていない。しかし、シイラによる有症事例からも *K. thyrssites* が分離されているため、今後もさらに監視を続ける必要性が認められた。

E. 結論

クドア食中毒において未解決であったヒト腸管内での生存性について結論を出すことが出来た。また、ユニカプスラに関する検査法が本年度の研究でひととおり完成した。今後はこれらの検査法を用いて事例残品の調査を行い、ユニカプスラによる有症事例の実態を明らかにしていきたい。さらに、タイ類やシイラにおける事例の基礎的な調査を行った。ヒラメのクドア食中毒への対策が進むにつれて、これらヒラメ以外の魚による事例についても同じように対策が求められると思われる。今後も引き続き有症事例に対する調査、研究を強化していく必要があると思われる。

F. 参考文献

1. Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. :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 (2012).
2. 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., 39, 667-672 (2015).
3. Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. :*Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer., Foodborne. Pathog. Dis., 10, 137-142 (2013).
4. 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 39:48-52,2012
5. Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. :*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 (2011).
3. Takeuchi, F., Ogasawara, Y., Kato, K., Sekizuka, T., Nozaki, T., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T. and Kuroda, M. ; Genetic variants of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. J Fish Dis 39: 667-672 (2016)
4. Ohnishi, T., Lim, B., Nojima, N., Kunitoshi, O., Inagaki, S., Makitsuru, K., Sasaki, M., Nakane, K., Tsuchioka, H., Horikawa, K. et al..; Inter-Laboratory Study to Validate New Rapid Screening Methods for *Kudoa septempunctata*. Biocontrol Sci 21: 135-138 (2016)
5. 大西貴弘, 都丸亜希子, 吉成知也, 鎌田洋一, 小西良子 : 生鮮魚介類の生食に関連した有症状事例残品に含まれる粘液胞子虫の検出, 食品微生物学会雑誌 2016, 33(3), 150-154

G. 研究発表

論文発表

1. Ohnishi, T., Fujiwara, M., Tomaru, A., Yoshinari, T. and Sugita-Konishi, Y. ; Survivability of *Kudoa septempunctata* in human intestinal conditions. Parasitol Res 115: 2519-2522 (2016)
2. Ohnishi, T., Fujiwara, M., Tomaru, A., Yoshinari, T. and Sugita-Konishi, Y. ; Cryopreservation of *Kudoa septempunctata* sporoplasm using commercial freezing media. Parasitol Res 116: 425-427 (2017)
1. Takahiro Ohnishi, Rie Oyama, Hiroko Furusawa, Natsuki Ohba, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi, : *Kudoa septempunctata* was Recognized by Toll-like Receptor 2, IAFP's European Symposium, 2016, 5, アテネ
2. 大西貴弘, 藤原真里奈, 都丸亜希子, 吉成知也, 小西良子 : ヒト腸管環境における *Kudoa septempunctata* の生存性, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会, 2016.9, 東京

学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ 取得特許「寄生虫の検出方法、及び、キット」(特許 5830771)
平成 27 年 11 月 6 日 菊池裕、小西良子、大西貴弘

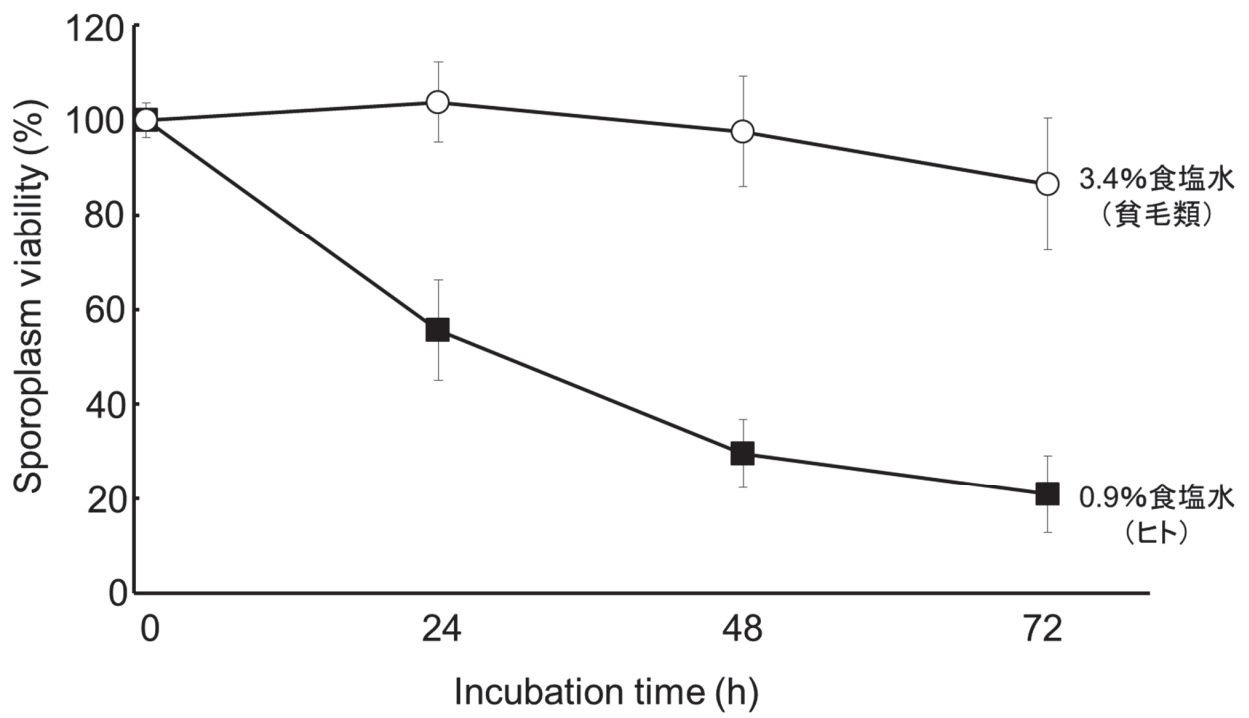


図1 スポロプラズムの生存性に対する浸透圧の影響

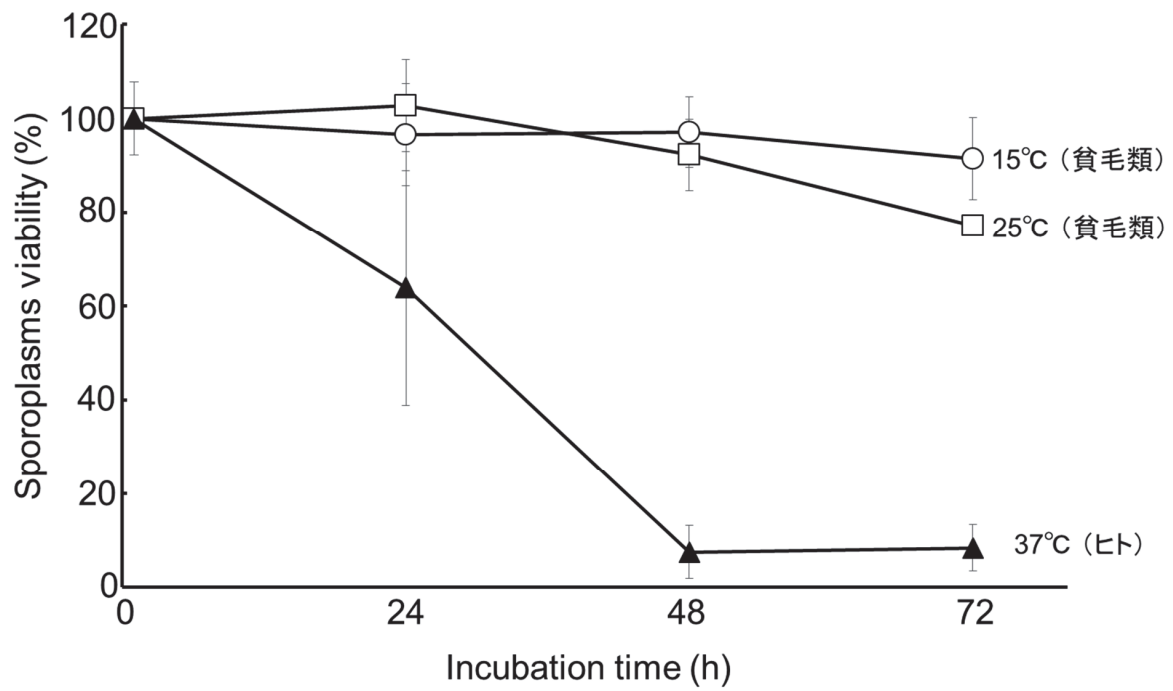


図2 スポロプラズムの生存性に対する温度の影響

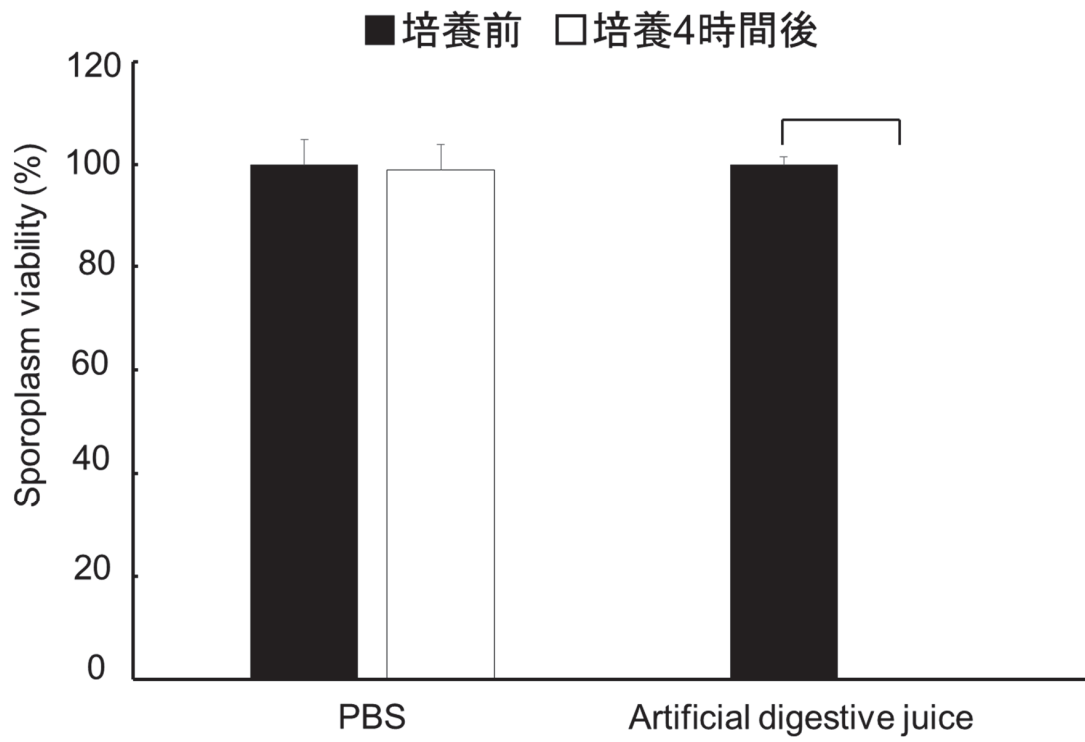


図3 スポロプラズムの生存性に対する人工腸液の影響

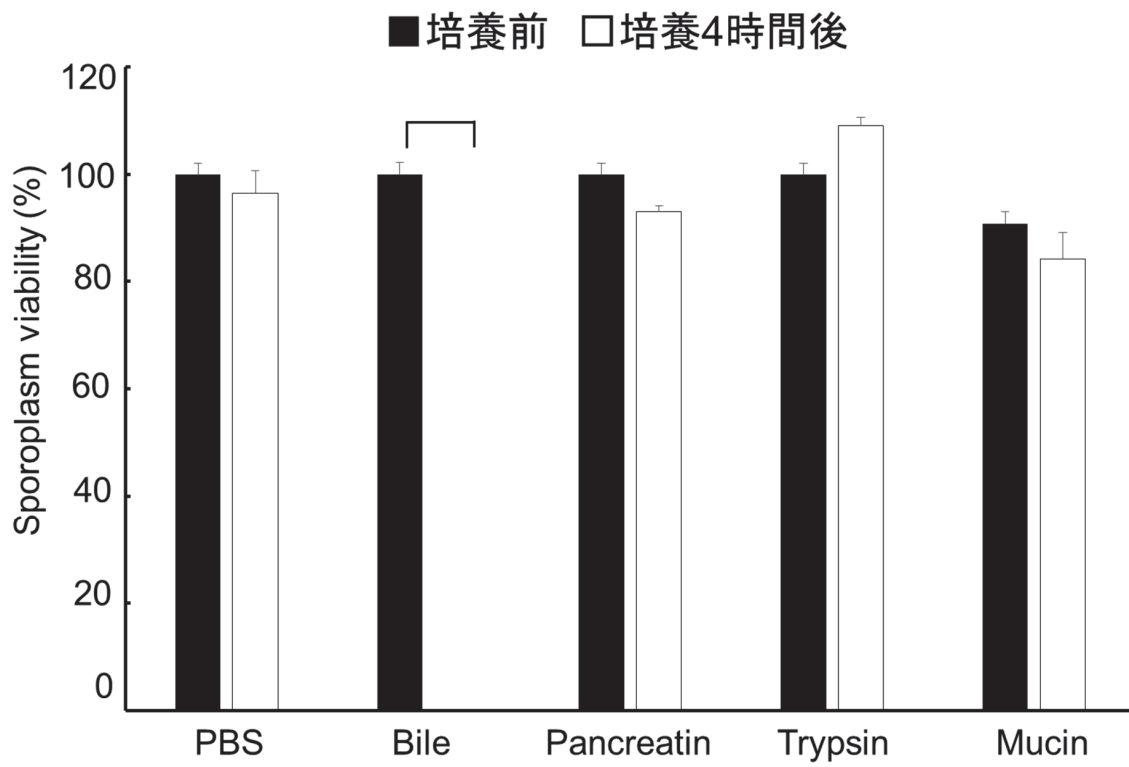


図4 スポロプラズムの生存性に対する人工腸液構成成分の影響

	ST1	ST2	ST3	計
国産	2 (22%)	7 (78%)	0 (0%)	9
韓国産	0 (0%)	1 (4%)	22 (96%)	23

表1 食中毒分離クドア株の遺伝子型別

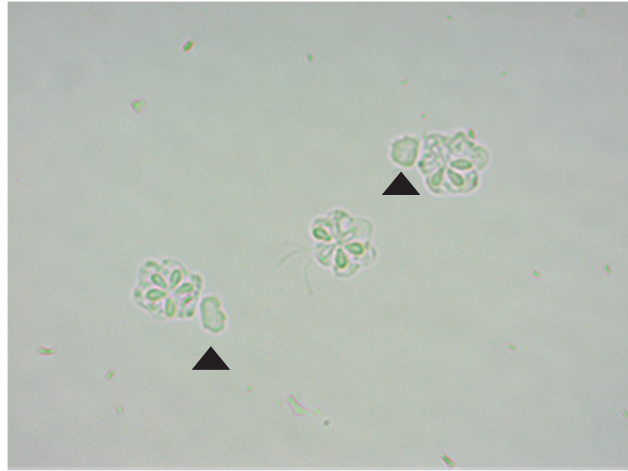


図5 凍結により損傷を受けた胞子
矢頭：スポロプラズム

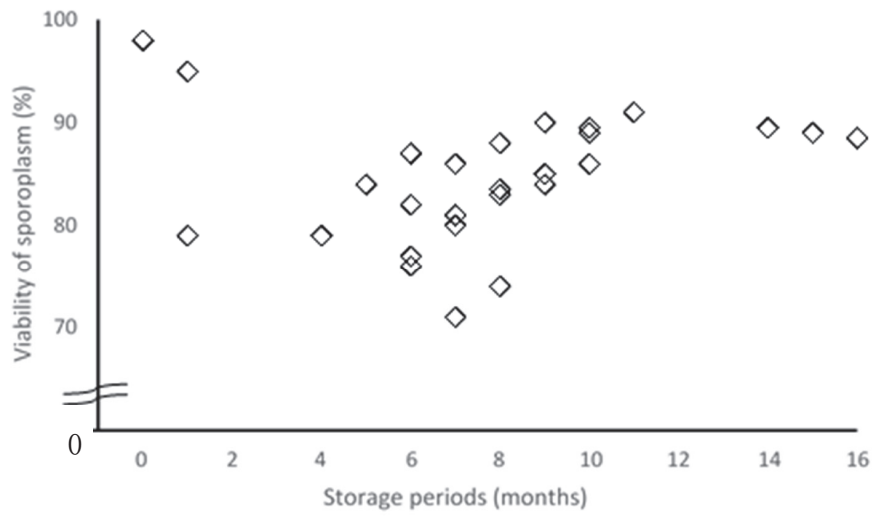


図6 凍結クドアの生存性

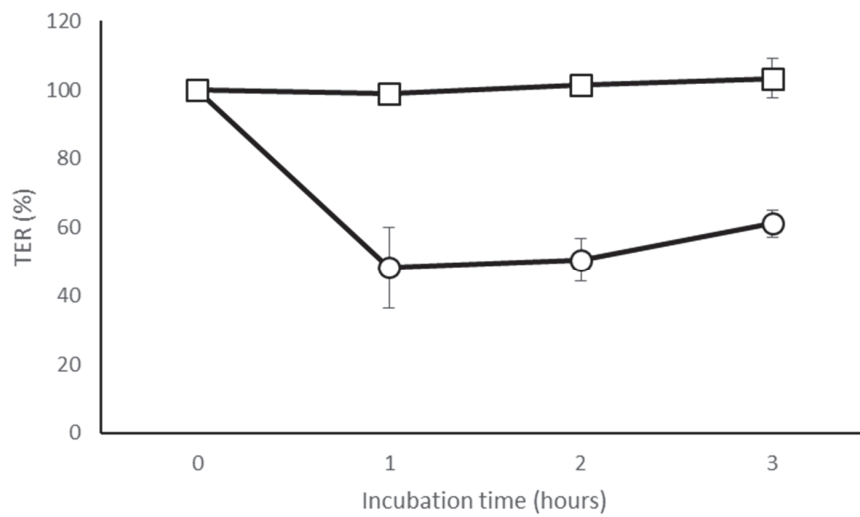


図7 凍結クドアの病原性

- ① カンパチ 0.5 g をシャーレにおく
- ② PBS を 10 ml 加え、薬さじや注射筒の背の部分などで押しつぶす
- ③ メッシュが 40 μm のセルストレーナーを 50 ml 遠沈管にセットする
- ④ カンパチをすり潰した PBS をセルストレーナーにとおし、遠沈管に回収する
- ⑤ シャーレに PBS を 10 ml 加え、カンパチを洗う
- ⑥ 洗った PBS をセルストレーナーにとおし、遠沈管に回収する
- ⑦ 3500 rpm、10 分間の遠心操作を行い、上清を捨てる
- ⑧ 沈査に 2 ml の H_2O を加え、沈査を懸濁する
- ⑨ 10% KOH 溶液 9 μl と懸濁液 1 μl を混合し、血球計算盤に置く
- ⑩ 液の流動が止まるまで 3 分静置
- ⑪ 位相差顕微鏡で対物レンズを ph1 で胞子を計数する

図 8 ユニカプスラ計数法

リアルタイム PCR 法による *Unicapsula seriolae* の検出

- カンパチからの DNA 抽出
 - (1) 生食監発 0427 第 3 号「*Kudoa septempunctata* の検査法について」に記載されている方法に従って、カンパチから DNA を抽出する。
- リアルタイム PCR による検出
 - (1) 器具および試薬
 - リアルタイム PCR 装置 (ABI 社製または同等品), PCR 反応チューブ, TaqMan Universal Master Mix (ABI 社), TE バッファー
 - (2) プライマー・プローブミックス溶液
 - 使用するプライマーとプローブの配列は以下のとおりである。
 - Unicapsula-F (sense): AGAGAGACAACCGGGATCAA
 - Unicapsula-R (antisense): TCACGACAGCGATTTTCAAG
 - Unicapsula-P (probe): [FAM]CGGGGAAGCGTGGCAATAA[TAMRA]

プライマー・プローブミックスを各プライマーそれぞれが 4 μ M, プローブが 2.5 μ M になるように調整する (反応液中での最終濃度はそれぞれ 0.4 μ M, 0.25 μ M).

(例) プライマー, プローブのストック溶液の濃度がそれぞれ 100 μ M の場合

Unicapsula-F 8 μ l, Unicapsula-R 8 μ l, Unicapsula-P 5 μ l を

179 μ l の TE バッファーに加える。

プローブおよびプライマー・プローブミックスの取り扱い, 保存は遮光して行い, 小分けにして保存するなど凍結融解をなるべく避けるようにする。
 - (3) 陽性コントロールの調整
 - 2.5 \times 10⁸ コピー/ μ l の *Unicapsula seriolae* 18S rDNA を組み込んだ陽性コントロールプラスミド溶液を配布するので, TE バッファーで段階希釈し, 2.5 \times 10⁷/ μ l, 2.5 \times 10⁵/ μ l, 2.5 \times 10³/ μ l, 2.5 \times 10¹/ μ l のプラスミド溶液を作成する (1 反応系につき 4 μ l 使用するので, 反応系での最終コピー数はそれぞれ 1 \times 10⁸, 1 \times 10⁶, 1 \times 10⁴, 1 \times 10²になる)。
- PCR 反応
 - 表 1 に基づいて反応調整液を作成する。表 1 の 1, 2, 4 を混合し, 各ウェルに分注する。そこへ検体からの DNA 溶液, 検量線作成のための「(2) 陽性コントロールの調整の項」で作成した陽性コントロール, 陰性コントロールとして精製水のいずれかを 4 μ l 加える。ボルテックスミキサー等で混合した後, 軽く遠心し, リアルタイム PCR 装置にかける。蛍光は FAM, クエンチャーは TAMRA を指定する。

図 9 ユニカプスラ定量リアルタイム PCR 法プロトコール

表 1. リアルタイム PCR 反応調整液

	試薬	
1	TaqMan 2×Universal Master Mix	10 μl
2	プライマー・プローブミックス	2 μl
3	検体からの DNA 溶液 or 陽性コントロール溶液 or 精製水	4 μl
4	精製水	4 μl

以下の条件で反応を行う

95°C 10 分 1 サイクル

95°C 15 秒

60°C 60 秒 45 サイクル

- 定量

陽性コントロールのコピー数（対数値）を縦軸に，PCR 反応から得られた Ct 値を横軸にプロットし，検量線を作成する．この際，陽性コントロールの各濃度につき最低 n=3 で測定を行う．そこから，PCR に用いた DNA 溶液 4 μl 中のコピー数を求める．最終的にカンパチ 1g あたりの *Unicapsula*

rDNA のコピー数を以下の式を用いて算出する．

試料 1g 中の *Unicapsula* rDNA のコピー数 = 検量線から得られた DNA 溶液 4 μl のコピー数 × 50 (200 μl の DNA 溶液の内 4 μl を使用したため) × 1000 mg ÷ DNA 抽出に用いた試料の重量 25 (mg)

= 4 μl 中のコピー数 × 2000 / 1 グラム試料

(例) 検量線から得られた DNA 溶液 4 μl のコピー数が 200 の場合

それに $200 \times 2000 = 4.0 \times 10^5$ *Unicapsula* rDNA のコピー数 / 1 グラム試料

図 9 ユニカプスラ定量リアルタイム PCR 法プロトコール(つづき)

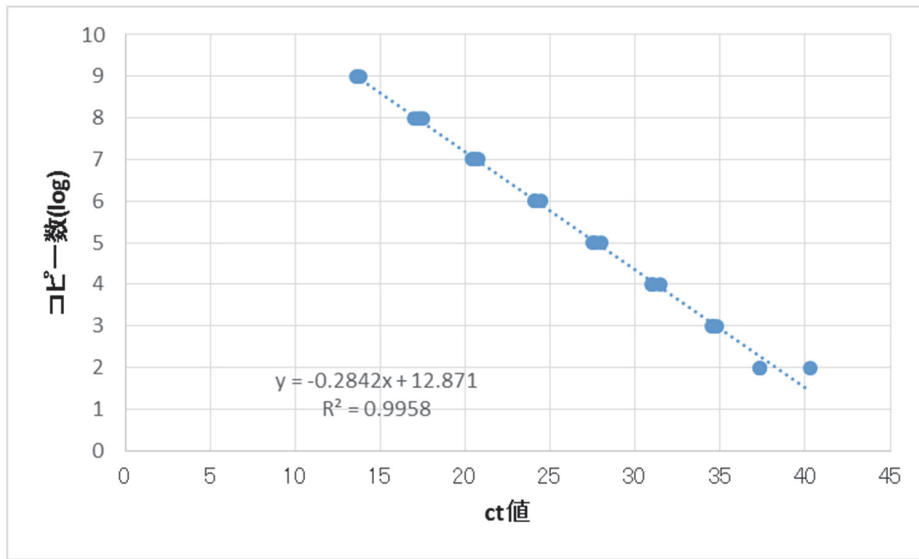


図 10 ユニカプスラ定量リアルタイム PCR 検量線

表2 2011年4月1日から2016年3月30日に島根県内で発生したシイラの生食が原因と疑われる有症事例（※NTは検査未実施）

No.	発生日	原因と疑われたシイラ料理	シイラ産地	調理場所	喫食場所	症状	喫食者数	有症者数	喫食から発症までの時間	水揚げから喫食までの時間	有症者便検査結果 (+, -, NT)		
											食中毒細菌	ノロウイルス	クドア
1	2012年7月30日	刺身	島根	スーパー	自宅	嘔吐, 下痢	5	3	4~7h	24h以内	-	-	-
2	2012年8月2日	刺身	島根	スーパー	旅館	嘔吐, 下痢	2	2	3.5~4h	不明	-	-	-
3	2012年9月	刺身	島根	民宿	民宿	腹痛, 下痢	不明	2	5~6h	不明	NT	NT	NT
4	2013年7月18日	刺身	不明	自宅	自宅	嘔気, おう吐, 下痢, 腹痛, 倦怠感, 頭痛, 手のしびれ, めまい	2	2	夕食(時間不明)に食べ、AM0:00発症	24h以内	-	NT	NT
5	2013年7月30日	刺身	島根	スーパー	自宅	下痢, 倦怠感	2	2	10.5~12h	不明	NT	NT	NT
6	2014年9月6日	酢漬け	島根	スーパー購入 自宅調理	自宅	嘔吐, 下痢	4	3	3.5~5.5h	24h以内	NT	-	NT
7	2014年10月14日	刺身	島根	仕出弁当	行事場所	嘔吐, 下痢	34	9	3.5~25.5h	36h以上	-	-	-

表3 島根県内に流通するシイラ, カンパチの細菌, 粘液胞子虫による汚染状況調査の結果（※NTは検査未実施）

No.	購入日 (検査日)	魚種	産地	状態	細菌数 (CFU/g(ml))			<i>C.freundii</i>		粘液胞子虫		
					拭い液	身	皮	菌分離	試料	鏡検	PCR	試料
1	6月10日	シイラ	島根	刺身	NT	NT	NT	-	-	-	-	-
2	6月14日	シイラ	島根	刺身	NT	NT	NT	-	-	-	-	-
3	6月20日	シイラ	島根	1匹	26	<5	<5	-	-	-	-	-
4	6月20日	カンパチ	九州	半身	18	<5	<5	+	拭い液, 身	-	+	身
5	6月28日	シイラ	島根	1匹	164	<5	<5	+	拭い液	-	-	-
6	6月28日	シイラ	島根	1匹	300	10	115	+	拭い液, 身, 皮	-	-	-
7	7月11日	シイラ	島根	1匹	75	<5	550	-	-	-	-	-
8	7月11日	シイラ	島根	1匹	45	5	130	+	拭い液, 皮	-	-	-
9	8月1日	シイラ	島根	1匹	57	<5	295	-	-	-	-	-
10	8月1日	シイラ	島根	1匹	32	<5	5	-	-	-	-	-
11	8月22日	シイラ	島根	1匹	12	10	70	-	-	-	-	-
12	8月22日	カンパチ	愛媛	半身	1	90	35	+	拭い液, 身	-	-	-
13	9月12日	シイラ	島根	1匹	181	30	70	-	-	-	-	-
14	9月12日	シイラ	島根	1匹	161	<5	95	+	拭い液	-	-	-
15	9月26日	シイラ	島根	1匹	63	400	4,500	-	-	+	+	身, 皮
16	9月26日	カンパチ	高知	半身	8	1,000	100	-	-	-	-	-
17	10月11日	シイラ	島根	1匹	4	15	15	-	-	-	-	-
18	10月11日	シイラ	島根	1匹	6	<5	15	+	拭い液	-	-	-
19	10月24日	シイラ	島根	1匹	1,400	25	24,000	+	拭い液, 皮	-	+	皮
20	10月24日	シイラ	島根	1匹	1,000	20	30,000	+	皮	-	-	-

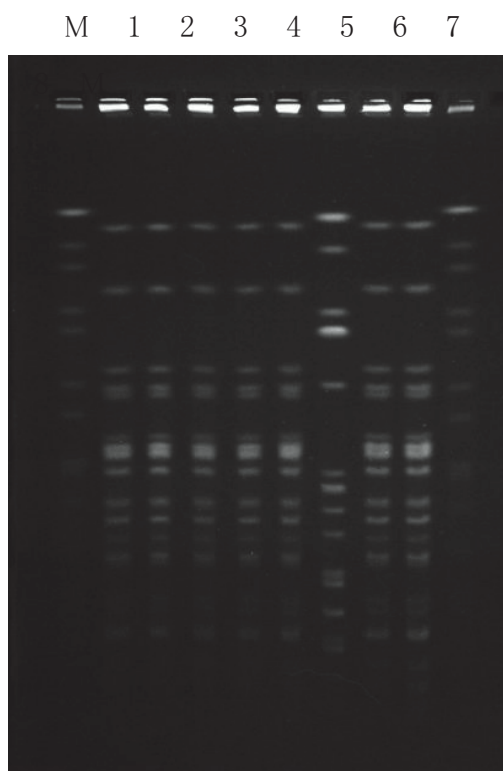


図 11 事例 No. 7 で分離された *Citrobacter freundii* PFGE 画像 (*Xba* I 処理)

M: *Salmonella* Braendrup H9812, レーン 1~5: 患者 (5 名) 由来株, 6: 食品残品のご飯由来株, 7: 拭き取り由来株, 8: 食品残品のシイラ由来株.

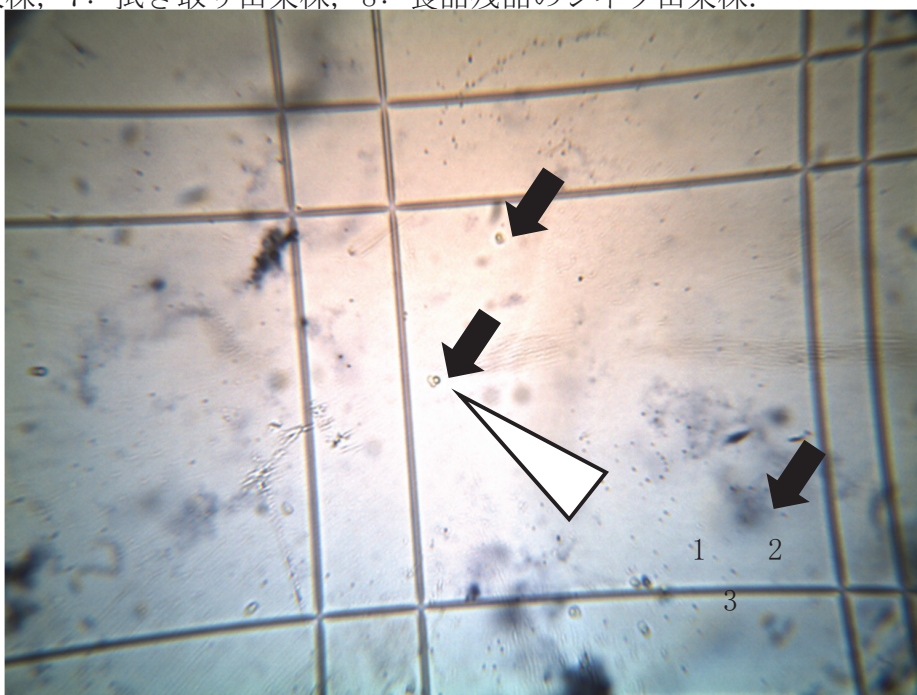


図 12A シイラの身 (検体 No. 15) で観察された粘液胞子虫と思われる異物 (トリパンブルー染色: 400 倍). 右下は拡大図.

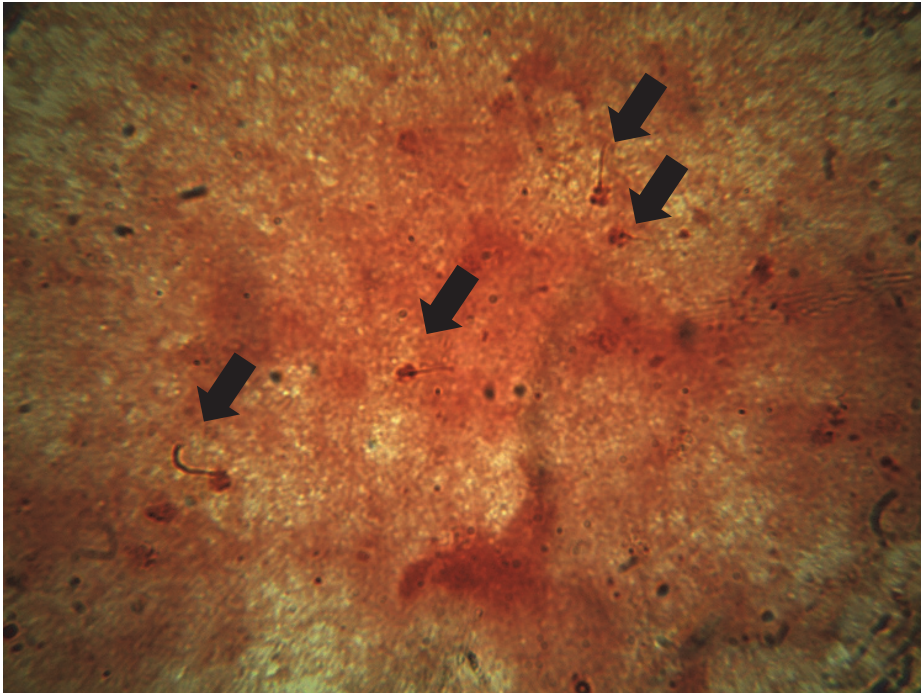


図 12B シイラの身（検体 No. 15）で観察された粘液胞子虫と思われる異物（サフラニン染色：1,000 倍）.

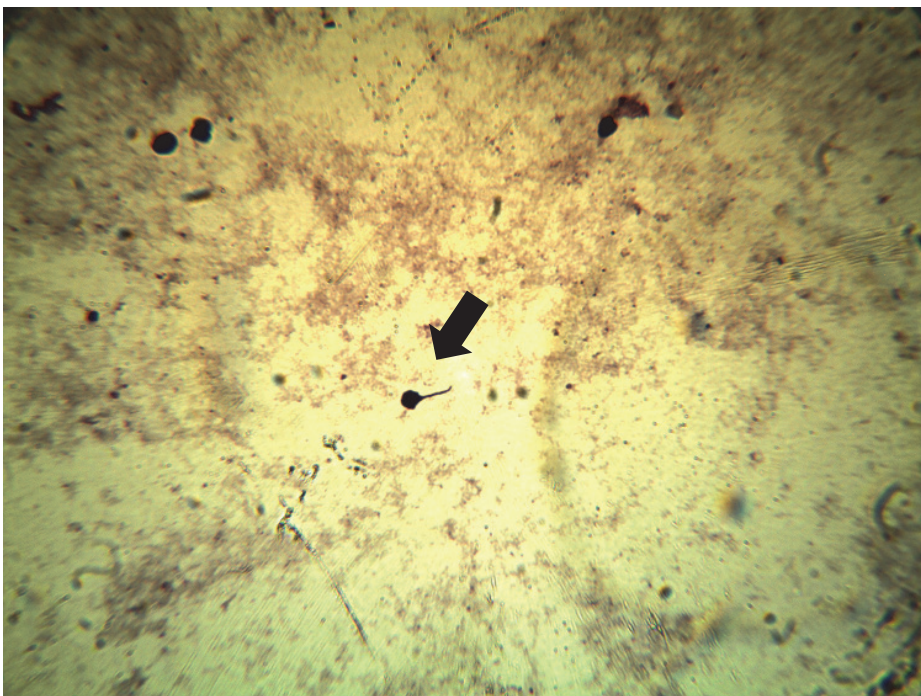


図 12C シイラの身（検体 No. 15）で観察された粘液胞子虫と思われる異物（ギムザ染色：1,000 倍）.

魚種		天然又は 養殖	平成27年度		平成28年度		合計	
			検体数	検査数	検体数	検査数	検体数	検査数
タイ	マダイ	天然	4	4	17	39	21	43
		養殖	21	23	25	29	46	52
		不明	9	19	1	1	10	20
	チダイ	天然	0	0	1	1	1	1
		不明	2	4	1	3	3	7
	クロダイ	天然	0	0	4	10	4	10
		不明	2	4	0	0	2	4
	レンコダイ	天然	0	0	1	3	1	3
	ハナダイ	不明	2	6	0	0	2	6
	イシダイ	不明	1	3	0	0	1	3
	イシガキダイ	不明	1	3	0	0	1	3
	エボダイ	不明	1	3	0	0	1	3
	アマダイ	不明	1	1	0	0	1	1
その他タイ	不明	1	1	0	0	1	1	
	小計		45	71	50	86	95	157
その他魚	シイラ	不明	1	1	0	0	1	1
	サワラ	不明	1	1	0	0	1	1
	メバチマグロ	天然	1	1	0	0	1	1
	本マグロ	不明	1	1	0	0	1	1
	スズキ	天然	1	1	0	0	1	1
	小計		5	5	0	0	5	5
	合計		50	76	50	86	100	162

表4 タイ類における粘液胞子虫汚染実態調査（検体内訳）

地域	都道府県	平成27年度	平成28年度	合計
東北	青森	0	1	1
	秋田	0	1	1
	宮城	1	1	2
	小計	1	3	4
関東	千葉	4	3	7
	東京	1	0	1
	神奈川	1	1	2
	小計	6	4	10
北陸・甲信越	新潟	1	2	3
	小計	1	2	3
東海	三重	3	3	6
	愛知	0	1	1
	静岡	2	1	3
	小計	5	5	10
関西	兵庫	0	1	1
	京都	0	1	1
	和歌山	0	1	1
	小計	0	3	3
中国	岡山	0	1	1
	島根	0	1	1
	山口	0	1	1
	小計	0	3	3
四国	愛媛	15	15	30
	香川	1	1	2
	高知	2	1	3
	小計	18	17	35
九州	大分	4	5	9
	熊本	3	2	5
	長崎	5	2	7
	福岡	2	1	3
	鹿児島	1	1	2
	小計	15	11	26
その他	太平洋	1	0	1
	中国産	1	0	1
	不明	2	2	4
	小計	4	2	6
	合計	50	50	100

表5 タイ類における粘液胞子虫汚染実態調査（検体産地内訳）

	検体名	産地	天然又は養殖	使用プライマー	同定された種	顕微鏡検査法
平成27年度	生さわら	三重	不明	28SrDNAプライマー	<i>Kudoa.sp</i>	陰性
	ハナダイ	千葉	不明	18SrRNAプライマー	<i>K.thyrsites</i>	陰性
平成28年度	マダイ	福岡	天然	18SrRNA及び28SrDNAプライマー	<i>K.thyrsites</i>	陰性
	クロダイ	千葉	天然	18SrRNA及び28SrDNAプライマー	<i>K.thyrsites</i>	陰性
	チダイ	鹿児島	不明	18SrRNA及び28SrDNAプライマー	<i>K.thyrsites</i>	陰性

表6 タイ類における粘液胞子虫汚染実態調査結果