

平成 26-28 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）
総合分担研究報告書

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 小西 良子（麻布大学）
研究協力者 緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）
研究協力者 堀川 和美（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 江藤 良樹（福岡県保健環境研究所）
研究協力者 奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所）
研究協力者 森 英人（神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター）
研究協力者 峯岸 恭孝（ニッポンジーン）
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。また、ヒラメ以外の魚の生食による有症事例も多発している。本研究ではヒラメ以外の魚による有症事例およびヒラメのクドア食中毒について以下の課題について検討した。

- 1) ヒラメ以外の魚の生食に伴う有症事例の実態調査
- 2) カンパチに寄生している *Unicapsula seriolae* に対する検査法の開発
- 3) ヒラメのクドア食中毒に関して未解決の問題

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、ヒラメ以外の魚の生食に伴う有症事例の実態は詳しく調査されていない。これらの事例に対する対策を立てるためには情報を収集し原因食材を明らかにし、また、喫食残品等の収集を行いそこから事例ごとに共通する原因物質の候補を検索する必要がある。原因物質の候補に対しては定量及び定性的な検査法を作成し、さらに詳細な検討を行う必

要がある。本研究では全国の自治体に有症事例の情報および検体の提供の協力を依頼し、得られた情報のとりまとめ、さらに検体からは原因微生物候補の検索を行った。また、後述するがカンパチの喫食に伴う有症事例が非常に多く、検体からは粘液胞子虫の1種である *Unicapsula seriolae*（以下、ユニカプスラ）が高率に分離され原因微生物の可能性が示唆されたため、ユニカプスラに対する検査法を検討した。また、タイ類の生食に伴う有症事例も多く報告されており、検体からしばしば *K. iwatai* が分離される。この *K. iwatai* が原因微生物なのか、それとも魚に寄生しているだけの無害な寄生虫なのかを考察するために、タイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査を行った。

一方で、ヒラメにおけるクドア食中毒に関して未解決の問題が多く残されている。例えばクドア食中毒は激しいが一過性の下痢、嘔吐が主な症状である。一過性の症状ということで患者に対しては対処療法のみが行われているが、もし、クドアが本来の宿主である貧毛類の消化管同様に、ヒトの腸管でも生残できたとすると、治療の方針を変更する必要があるかもしれない。そのため、ヒト腸管内におけるクドアの生存性を調べる必要がある。また、クドアによる食中毒発症メカニズムのひとつとして、クドアのスポロプラズムの腸管上皮細胞層への侵入が示唆されている。しかし、クドア食中毒の発症メカニズムとしてアレルギーの関与も以前から噂されている。そこで、クドア食中毒におけるアレルギーの関与について検討した。さらに、クドアは cytochrome c oxidase subunit I (cox1) 遺伝子と large subunit rRNA (rn1) 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。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は疑わしいという論文が公表されている。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。そこで、国内における食中毒分離クドア株の遺伝子型別を実施した。また、ウマヅラハギからクドアが分離されたという報告がある。現時点ではクドアの宿主はヒラメだけであると考えられている。そこで、ウマヅラハギにおけるクドアの汚染実態調査を行った。さらに、クドアに対する迅速検査法の検討、ヒラメ筋肉中のクドアの栄養体の検出法の検討などを行った。

B. 研究方法

1. ヒラメ以外の魚の生食に関わる有症事例の調査

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管理室より事務連絡『食中毒調査に係る病因物質不明事例の情報提供について』を発出していただき、地方自治体から有症苦情事例の残品および情報の収集を行った。得られた検体

は顕微鏡検査を行い、粘液胞子虫の胞子の確認を行った。また、検体から DNA を抽出し、遺伝子検査を行った。

2. ユニカプスラの検査法の確立

ユニカプスラは胞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か上記の問題点を解決できる計数法を検討した。また、ユニカプスラに対する定性 PCR 法および定量リアルタイム PCR を確立する。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。

3. タイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査

市場流通タイ類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。

4. ヒト腸管環境におけるクドアの生存性の検討

クドアの病原性の本体であると考えられているスποロプラズムの生存性を検討した。クドア胞子を精製し、胞子から放出されてきたスποロプラズムをヒトの腸管もしくは本来の宿主である貧毛類の消化管の環境条件下で培養し生死を判定した。スπο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。

5. クドア食中毒発症におけるアレルギーの関与の検討

マウスは、系統 BALB/c、雌性を用いた。クドア胞子の破砕物を免疫原とした。抗原特異的 IgE 抗体の誘導は初回免疫を腹腔内投与、追加免疫を皮下投与とすることとした。初回免疫後 10~13 日おきに 2 回の追加免疫を行った。採取した血液は血清分離後 -80°C で凍結保存し、サンドイッチ ELISA 法を利用したマウス total IgE 測定キット (森永生化学研究所) を使用して行った。

6. 国内食中毒分離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(竹内ら, 2015)に従って行った。

7. ウマヅラハギにおけるクドアの汚染実態調査

ウマヅラハギの汚染実態調査を行うためにウマヅラハギを全国の市場から天然のものを購入した。1尾当たり2か所からDNA抽出を行い、水産庁 栽培養殖課「ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* の検査方法について」(2012年5月)に従って定性PCRを行った。PCRで陽性になった場合、厚生労働省の暫定検査法に従いクドア孢子数と定量RT-PCRによるクドアDNAのコピー数を測定した。

8. クドア迅速検査法の検討

クドアのLAMP法は精製クドア孢子のTritonX可溶性抗原のアミノ酸配列をもとにLAMP法プライマーを作成した。さらにLAMP法を食中毒検査に使用できるように1個体のヒラメを対象に通知法の規準である1グラム当たり 10^5 孢子を定性下限となるように感度の調整を行った。さらに複数機関による妥当性評価を行った。

9. ヒラメ組織中におけるクドア栄養体の検索

クドアの栄養体の検出では福岡県で発生したヒラメが原因食材と疑われる有症苦情事例の検体を用い組織切片を作成した。この事例では暫定通知法による定量的PCR法で1グラム当たり $10^6 \sim 10^7$ コピーのクドアDNAが検出されているが、孢子を検出ができなかった。これらの検体をホルマリンもしくはパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋を行った。組織をマイクロームで薄切後、脱パラフィンを行った。Proteinase K (DAKO)で抗原の不活化を行った後、Biotin-Blocking System (DAKO)およびProtein Block Serum free (DAKO)でブロッキングを行った。その後、抗クドア抗体と4℃、1時間反応させた後、Alexa Fluor 594 Goat anti-chicken IgG (Invitrogen)と室温で1時間反応させた。

SlowFade Gold antifade reagent with DAPIで封入後、蛍光顕微鏡で観察した。

10. 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 $10^6/ml$ になるように浮遊させ $-80^\circ C$ で保管した。その後、定期的にバイアルを解凍し、スポロプラズムの生存性を検討した。16か月後の孢子の毒性をCaco-2細胞を用いた方法で測定した。

C. 研究結果

1. ヒラメ以外の魚の生食に関わる有症事例の調査

自治体から国衛研に送付されたのは33事例52検体だった。内訳はカンパチ 14、マグロ(メジマグロを含む) 13、タイ類 6、ブリ 4、シイラ 4、カツオ 3、サワラ 2、ヒラメ 2、キス、ハマチ、ハモ、マダカがそれぞれ1検体だった。33事例中、粘液孢子虫のDNAが検出されたのは25事例(75%)、孢子も確認できたのは16事例(48%)だった。52検体中、粘液孢子虫のDNAが検出されたのは28検体(54%)、孢子も確認できたのが15検体(29%)だった。検出された粘液孢子虫はそれぞれ *Unicapsula seriolae* 9, *K. neothunni* 5, *K. hexapunctata* 2, *K. thyr sites* 2, *K. iwatai* 1, *K. lateolabracis* 1, *K. septempunctata* 4, データベース未記載の新種 4であった。

魚種ごとに見ていくと、カンパチでは *U. seriolae* 9, *K. septempunctata* 3, *K. neothunni* 1, 新種 1が検出された。マグロでは *K. neothunni* 4, *K. hexapunctata* 2であった。タイからは *K. iwatai* 1が検出された。シイラからは *K. thyr sites* 1が検出された。サワラからは新種 2が検出された。

2. ユニカプスラの検査法の確立

まず、顕微鏡検査法を確立した。ユニカプスラをクドアと同じ顕微鏡検査法で検出しようとすると、孢子の強い粘着性により塊を作ってしまう正確に計数することが出来ない。また、油滴と孢子の区別がつきにくく、孢子の検出が困難である。検討の結果、カンパチの抽出物をスライドグラス

に塗抹し火炎固定、サフラニン染色することによって観察が容易になることが明らかになった。また、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。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、 $100\ \mu\text{m}$ のメッシュにとおしていたが、ユニカプスラの胞子は $5\ \mu\text{m}$ とクドア胞子の半分しかないため、濾過に $40\ \mu\text{m}$ 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。この状態で血球計算板を用い胞子を計数する。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分かった。

次にユニカプスラの遺伝子検査法を検討した。まず、ユニカプスラ特異的定性 PCR 法を作成した。この方法はユニカプスラの 18S rDNA をターゲットとしたものである。この方法を用いると検体中のユニカプスラを容易に検出することが出来た。さらにユニカプスラの 18S rDNA をターゲットとした定量リアルタイム PCR 法を確立した。このリアルタイム PCR 法の定量限界は 10^2 コピー/反応であった。

3. タイ類における粘液胞子虫の汚染実態

川崎市内で無作為にタイ類 100 検体を購入した。マダイ、クロダイ、チダイ、ハナダイそれぞれ 1 検体から *K. thyrssites* が、サワラから *Kudoa sp.* が検出された。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。

4. ヒト腸管環境におけるクドアの生存性の検討

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。本来の宿主である貧毛類の浸透圧に近い 0.9% 食塩水中でスポロプラズムを培養すると、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。まず、冬のゴカイの温度に近い 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。夏のゴカイの温度に近い 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。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。

5. クドア食中毒発症におけるアレルギーの関与の検討

陰性コントロール群と比較して、卵白アルブミン投与陽性コントロール群およびクドア投与群では、2 回目免疫原投与後から血清中 total IgE 濃度の有意な上昇 ($p < 0.05$) が確認され、最終免疫原投与後の全採血直前では、クドア投与群において positive control 群と比較しても高い total IgE 濃度の上昇が認められた。

6. 国内食中毒分離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。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。

7. ウマヅラハギにおけるクドアの汚染実態調査

ウマヅラハギにおけるクドアの寄生状況をスクリーニングするために国内 6 地域より 31 尾を購入した。1 尾当たり 2 か所から DNA を抽出し、クドア特異的 PCR を行ったところ 2 尾が PCR 陽性

となった。これらの個体の Kudoa 胞子数の確認を行ったが検出限界以下であった (10^5 /g 未満)。またこれらの個体から DNA を抽出し、Kudoa DNA のコピー数を測定したところ $10^3 \sim 10^4$ コピー/g だった。

8. クドア迅速検査法の検討

これまで厚生労働科学研究で開発を行ってきたクドアに対する LAMP 法を食中毒検査に使用できるように感度の調整を行った。そして、今回改良した LAMP 法が食中毒検査に準じた感度を有しているかどうかを確認するために、4 機関で評価した。その結果、今回の検査法は 1 グラム当たり 1.8×10^4 胞子のクドアを検出できることが明らかになった。

9. ヒラメ組織中におけるクドア栄養体の検索

ヒラメの喫食による有症苦情事例で、クドアの DNA は検出されるが胞子は検出できない事例が報告されている。今回こういった事例のヒラメ組織をクドア特異的抗体で染色し、ヒラメ組織中のクドア細胞の検出を試みた。その結果、特異的抗体と DAPI で染色される約 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ の細胞が組織中に認められた。細胞は組織全体に認められたが、局所的に集中して存在している個所もあった。しかし、胞子や多核体と思われる細胞は認められなかった。

10. 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 を用いて -80°C で保管した。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、バイアルによって生存率にばらつきが見られたが 70% を下回ることはなかった。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。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が急速に 60% 低下した。

D. 考察

1. ヒラメ以外の魚の生食に関わる有症事例の調査

今回検討した事例のうち 47% から粘液胞子虫の胞子が検出された。これらの粘液胞子虫がすぐにこれらの有症苦情事例の原因微生物とすることはできない。原因物質であることを証明するためにはさらに検体の収集を行うとともに、毒性試験を行う必要性が認められた。一方、53% の事例で粘液胞子虫の胞子を検出できなかったため、今後は粘液胞子虫以外の原因物質も検討していく必要性が認められた。

今回検討した中でカンパチが検体として最も多かった。平成 27 年度に厚生労働省に報告があったものだけでもカンパチに関係する事例が 20 件あった。報告がないものがあるとすると、カンパチによる有症苦情事例は相当数に上るとと思われる。また、カンパチからはユニカプスラが高率に検出された。市販流通品のカンパチからユニカプスラは検出されていない。また、A 県の事例では毎日カンパチを提供している施設があり、カンパチが原因食と思われる有症苦情事例が発生した。保管されている検食を調べたところ、患者が発生した日に提供されたカンパチだけからユニカプスラが検出された。このようにカンパチを原因食とする有症苦情事例とユニカプスラの間に関連性が示唆されている。さらに検体や情報の収集を行うとともに毒性試験を行い、ユニカプスラとカンパチの有症苦情事例の関連性を明らかにしていきたい。

2. ユニカプスラの検査法の確立

ユニカプスラがカンパチの事例の原因微生物である可能性が示唆されているが、カンパチによる有症苦情事例が発生しても、ユニカプスラを見逃してしまう事例がしばしばみられる。その理由としてユニカプスラの胞子はクドアのものよりもサイズが小さく、また油滴と非常に似ているため判別が難しく、胞子自体の粘着性が非常に強いこと、胞子同士が接着し塊を作るためさらに観察が困難になっているためと思われる。そこで、ユニカプスラの検出が容易な顕微鏡検査、計数法、特異的 PCR 法、定量的リアルタイム PCR 法を作

成した。これらの検査法が普及すれば、地方自治体での日常業務でユニカプスラを容易に検出できるようになるため、今後さらにカンパチによる有症苦情事例とユニカプスラの情報が多く報告されるようになると期待できる。

3. タイ類における粘液胞子虫の汚染実態

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* と有症事例との関連性について検討を行った。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。

4. 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、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が示唆された。

今回の結果からヒトの腸管内環境はクドアの生存に適していないことが明らかになった。そのため、食中毒症状を引き起こした後、クドアは速やかに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。

5. クドア食中毒発症におけるアレルギーの関与

の検討

今回の結果からクドア破砕物には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、クドア食中毒発症におけるアレルギーの関与について検討を行っていききたい。

6. 国内食中毒分離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。

7. ウマヅラハギにおけるクドアの汚染実態調査

これまでにクドアが検出されたことが報告されている。ウマヅラハギにおけるクドアの汚染実態調査を行った。その結果、31尾中2尾でクドアに対するPCRが陽性となった。これらの検体の孢子数を測定したところ定量限界以下であった(105/g未満)。また、暫定検査法による *K. septempunctata* DNAのコピー数は $10^3 \sim 10^4$ /gと低い値を示した。以上の結果から、寄生は少量であると思われた。今後も引き続き監視を行い、食中毒を起こしうるだけの強度のクドアの寄生が見られる個体が存在するのか検討していく必要が認められた。

8. クドア迅速検査法の検討

これまでの厚生労働科学研究でクドアに対するLAMP法の開発を行ってきた。今回はクドアに対する食中毒検査にLAMP法が使用できるように定性下限が1グラム当たり 10^5 孢子になるように改良を試みた。この改良品を用いて4機関によるコラボラティブスタディを行った。その結果、今

回の検査法は 1 グラム当たり 1.8×10^4 胞子の検体を陽性と判定してしまうことが明らかになった。今後さらに改良を行い、食中毒検査に本試験法が利用できるようにしたい。

9. ヒラメ組織中におけるクドア栄養体の検索

ヒラメが原因食材として想定される原因物質不明有症苦情事例の内、高いコピー数のクドア DNA がヒラメから検出されるが胞子は検出されないという事例の報告がある。クドアはヒラメの組織内に侵入後、多核体の形成による無性生殖を繰り返し増殖していく。やがてこれらの細胞が分化し、胞子を形成していくと考えられている。前述のような DNA は検出されるが胞子は検出されない検体には、胞子になる前のクドア細胞が存在していると思われるが、どのような分化段階のクドア細胞が存在しているのか不明である。そこで今回の研究では、高コピー数のクドア DNA が検出されるが胞子は検出されないヒラメが原因食材として疑われる事例のヒラメ組織中のクドア細胞をクドア特異的抗体で免疫染色し観察した。その結果、特異的抗体と DAPI で染色される約 $5 \sim 10 \mu\text{m}$ の細胞が観察された。しかし、胞子や多核体などの細胞は認められなかった。今回、抗体で染色された細胞がクドアの生活環の中でどの段階の物か特定できなかつたが、もし、今回の事例の原因食がこのヒラメであるとする、この細胞がヒトへの健康被害を引き起こしている可能性がある。今後、胞子に分化する前の段階のクドア細胞の毒性についても検討を行っていく必要が認められた。

10. 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。セルバンカー1 と胞子を混ぜるだけという簡便な操作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。

E. 結論

3 年間の研究でヒラメ以外の魚が原因食と思われる有症事例の実態が明らかになった。これらの事例の多くから粘液胞子虫が検出されている。特にカンパチの喫食に伴う有症事例が非常に多いこと、さらに原因微生物としてユニカプスラが疑われることが明らかになった。平成 27 年の食中毒統計の患者数を見てみるとヒラメのクドア食中毒は 169 名であった。一方、魚の生食に伴う有症苦情事例の患者数は 246 名とクドア食中毒の患者数を超えている。また、これらの数字は厚生労働省及び国立医薬品食品衛生研究所に報告があったものだけである。有症事例患者の実数はこれよりはるかに多いと思われる。さらに、魚の生食に伴う有症苦情事例の多くから粘液胞子虫が検出されている。そこで、粘液胞子虫による食中毒というカテゴリーを作ると、ヒラメのクドア食中毒 169 名、魚の生食に伴う有症苦情事例 246 名で合計 415 名となり、ブドウ球菌 619 名、ウエルシュ菌 551 名など他の食中毒微生物と比較しても決して少なくない患者数となっている。これだけ多くの国民が苦しんでいる事例を有症事例のまま放置することはできない。積極的に取り組み解決していく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kamata, Y., Saito, M., Irikura, M., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe, M., Konishi, Y.: A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning, *Journal of Food Protection*. 2014 May;77(5):814-9.
2. Ohnishi, T., Akuzawa, S., Frusawa, H., Yoshinari, T., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: Inactivation of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder, *Biocontrol Science*. 19, 135-138 (2014)
3. Sugita-konishi, Y., Sato, H., Ohnishi,

- T.: Novel Foodborne Disease Associated with Consumption of Raw Fish, Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), Food safety, 2(4), 141-150, 2014
4. 大西貴弘:新しい寄生虫食中毒とその制御にかかわる最新の話, 日本防菌防黴学会誌, 2014 vol.42 p625-630
 5. Konishi, Y., Fukuda, Y., Mori, M., Mekata, M., Namba, T., Kuroda, M., Yamazaki, A., Ohnishi, T.: New Validated Rapid Screening Methods for Identifying *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), JJID, Vol.68, 145-147, 2015
 6. Yahata, Y., Konishi, Y., Ohnishi, T., Toyokawa, T., Nakamura, N., Taniguchi, K., Okabe, N.: *Kudoa septempunctata* induced gastroenteritis in humans after flounder consumption in Japan: A case-control study, JJID, Vol. 68, 119-123, 2015
 7. Ohnishi, T., Furusawa, H., Oyama, R., Koike, S., Yoshinari, T., Kamata, Y., Konishi, Y.: Molecular epidemiological analysis of *Kudoa septempunctata* by random amplified polymorphic DNA analysis, JJID 2015;68(3):235-8. 2015
 8. Takeuchi, F., Ogasawara, Y., Kato, K., Sekizuka, T., Nozaki, T., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T., Kuroda, M., 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
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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
- 学会発表
1. Ohnishi, T., Akuzawa, S., Furusawa, H., Yoshinari, T., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: Application of Liquid Freezing Method to Inactivation of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder Meat, IAFFP European Symposium (2014.5) (Hungary・Budapest)
 2. 大西貴弘, 阿久澤さゆり, 古沢博子, 吉成知也, 鎌田洋一, 小西良子: リキッドフリーザーを用いたヒラメ筋肉中の *Kudoa septempunctata* 不活化の試み, 第35回日本食品微生物学会学術総会 (2014.9)
 3. 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
 4. Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Kamata, Y., Sugita Konishi, Y.: Electron Microscopic Study on *Kudoa septempunctata* Infecting Olive Flounder, IAFFP European Symposium on Food Safety, (2015.4) イギリス

5. 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
 6. 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
 7. Ohnishi, T., Oyama, R., Furusawa, H., Ohba, N., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* was Recognized by Toll-like Receptor 2, IAFP's European Symposium, (2016, 5), アテネ
 8. 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
- 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