

生食用魚類に寄生する多殻目粘液胞子虫の検査法の検討 及び汚染実態調査

丸山浩幸・高橋直人・古賀舞香・松永典久・江藤良樹*

福岡市保健環境研究所保健科学課

*福岡県保健環境研究所

Study of the Analysis Method for Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporea) Parasites of Raw Fishes, and the Surveillance of the Parasitic-Contaminated Fishes

Hiroyuki MARUYAMA, Naoto TAKAHASHI, Maika KOGA,
Norihsa MATSUNAGA and Yoshiki Etoh*

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

Summary

In Fukuoka city, 2 cases of unknown reasons suspected of parasitic food poisoning occurred in 2014. We estimated the possibility that *Unicapsula seriolae* (Myxozoa: Myxosporea: Multivalvulidae) which was parasitic on a greater amberjack (*Seriola dumerili*). However, this parasite has just been discovered in Japan, and microscopic examination is difficult due to the fine structure of about 6µm in diameter. DNA analysis have not been established because genetic information is little. The purpose of this study invents analysis method and surveys about the pollution of *U. seriolae* (Myxozoa: Myxosporea: Multivalvulidae) parasitizing on the greater amberjack (*Seriola dumerili*) which is sold in the city. *U. seriolae*, *Kudoa hexapunctata*, *Kudoa iwatai* suspected as an etiological agent was examined three kinds of DNA analysis method and the real-time PCR assay in 28SrDNA region was prepared. In addition, we examined three kinds of DNA analysis method in patient's feces, and also created the Multiplex real-time PCR assay. For *U. seriolae*, Tween 80 added PBS method was established as an insect body analysis method for microscopic examination. As a result of conducting *U. seriolae* pollution investigation of 76 samples of the greater amberjack circulating in the city, the gene detection individual rate was about 40%. However, since seasonally significant difference was not observed, it was thought that it was influenced by habitat environment of seed and seedling which is the time of infection. The results of the parasitic distribution survey of individuals suggested that there were no specific parasitic sites.

Key Words : ユニカプスラ セリオラ *Unicapsula seriolae*, クドア ヘキサプンクタータ *Kudoa hexapunctata*, クドア イワタイ *Kudoa iwatai*, カンパチ greater amberjack, リアルタイムPCR qPCR, 粘液胞子虫 myxosporean parasites, 生食用魚類 Raw Fishes

1 はじめに

近年ヒラメ喫食後数時間で一過性の下痢, 嘔吐がみられる *Kudoa septempunctata* による食中毒事例が全国的に発生している¹⁾. しかしヒラメの喫食がないにもかかわらず

同様の症状を示す原因不明の食中毒事例も認められ, 福岡市では, 2014年に2事例の寄生性食中毒を疑う原因不明の事例が発生しており, 喫食したカンパチに認められた多殻目粘液胞子虫 *Unicapsula seriolae*²⁾ が病因物質である可能性が疑われた. しかしこの寄生虫は

国内において発見されて日も浅く³⁾, 直径約 6 μ m の微細な構造のため顕微鏡検査も困難である (Fig. 1, 2) . また遺伝子情報等も少ないため検査法が確立されていない. これらのことから, 類似の症状の原因と考えられる粘液胞子虫 *Kudoa iwatai*, *Kudoa hexapunctata* を含め検査法を検討し, さらに市場流通している養殖カンパチの *U. seriola* 汚染実態調査を行ったので報告する.

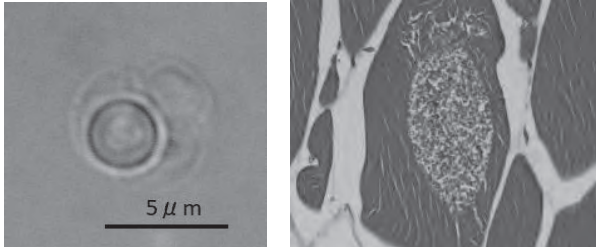


Fig. 1 Spores of *U. seriola* Visualized by light microscopy.

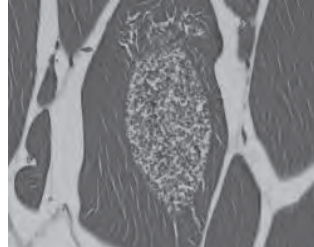


Fig. 2 Histopathology of *U. seriola* plasmodia in the muscle of commercial *S. dumerili*. (H.E.stain)

2 実験方法

2.1 遺伝子検査法の検討

2.1.1 DNA 抽出法

魚筋肉からの粘液胞子虫の DNA 抽出は, 厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査方法 (通知法)」⁴⁾ (以下ヒラメ検査法) に準じ, 約 50mg 採材し QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて, 最終的に検体 25mg から 200 μ L の DNA 抽出液を得て鋳型 DNA とした. また, 糞便からの DNA 抽出は, 厚生労働省からの事務連絡「食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* の遺伝子検査法 (参考)」⁵⁾ (以下ヒラメ参考法) に準じ, FastDNA SPIN Kit for Soil (MP バイオ) を用いて検体 300mg から 100 μ L の DNA 抽出液を得て鋳型 DNA とした.

2.1.2 *U. seriola* リアルタイム PCR 法

共同研究者の福岡県保健環境研究所江藤が 28S rDNA を標的に設計したプライマー, プローブを参考に検討を行った (Table 1) . 検量線に必要な陽性コントロール DNA は, *U. seriola* 用プライマー配列を含む 28S rDNA 領域の合成 DNA 断片 (gBlocks® Gene Fragments) を TE バッファー (pH 8.0) (ニッポンジーン) (以下 TE) で段階希釈したものをを用い, リアルタイム PCR (以下 qPCR) の結果より決定係数 (以下 R² 値), PCR 増幅効率を確認した.

マスターミックスには Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を使用した. PCR 反応液は,

各 10 μ M プライマーを 0.8 μ L, 12.5 μ M プローブを 0.4 μ L, Premix Ex Taq を 10 μ L, ROX reference dye II (\times 50) 0.4 μ L を混合し, 鋳型 DNA 4 μ L と水を加え, 全量を 20 μ L に調整した. qPCR 装置には, QuantStudio® 5 (Applied Biosystems) を用い 95°C 30 秒 1 サイクル \rightarrow 95°C 3 秒, 60°C 30 秒 50 サイクルの反応を行った後, 実験データを解析し, Ct 値 43 以下で陽性とした.

2.1.3 *K. iwatai* リアルタイム PCR 法

K. iwatai の 28S rDNA を標的にプライマー設計ソフトである Primer Express を用いてプライマー, プローブを設計した (Table 1) .

反応組成及び反応条件は *U. seriola* と同条件に全量を 20 μ L に調整し Ct 値が得られたものを陽性とした.

検量線に必要な陽性コントロール DNA は, *U. seriola* と同様に 28S rDNA 領域の合成 DNA 断片 (gBlocks® Gene Fragments) を TE で段階希釈したものをを用い, qPCR 結果より R² 値, PCR 増幅効率を確認した.

2.1.4 患者便における Multiplex qPCR 法

K. hexapunctata については東京都健康安全研究センターの鈴木らの発表⁶⁾ をもとに作成し検討を行った. また, *U. seriola* についてはプローブの蛍光色素を FAM から VIC に変更を行い, 3 種類の測定ができるようにした (Table 1) .

マスターミックスには Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を使用した. PCR 反応液は, 各 20 μ M プライマーを 0.4 μ L, 12.5 μ M プローブを 0.4 μ L, ROX reference dye II (\times 50) 0.4 μ L を混合し, 鋳型 DNA 5 μ L と水を加え, 全量を 25 μ L に調整した. 反応条件はヒラメ参考法と同じ条件で 95°C 30 秒 1 サイクル \rightarrow 95°C 5 秒, 60°C 30 秒 50 サイクルの反応を行った後, 実験データを解析し, Ct 値 43 以下で陽性とした. 検量線に必要な陽性コントロール DNA は *U. seriola*, *K. iwatai*, *K. hexapunctata* のプライマー配列を含む各 28S rDNA 領域を連結した合成 DNA 断片 (gBlocks® Gene Fragments) を TE で段階希釈したものをを用い, qPCR 結果より R² 値, PCR 増幅効率を確認した.

Table 1 Primers and Probes used in real-time assay for

U. seriola, *K. iwatai* and *K. hexapunctata*

Assay	Name	Sequences	Origin
<i>U. seriola</i>	Usp-28S-F	5-CGAGACTGTGTGGTGGAC-3'	This study
	Usp-28S-R	5-CGAATCTATGAATGCCATGTT-3'	
	p-Usp probe*1	FAM-ACTAAGGACGTTAGCTGCCG -TAMRA	
	*2	VIC-ACTAAGGACGTTAGCTGCCG -QSY	
<i>K. iwatai</i>	K. iwatai Fw	5-CCGTATTGTGAATAGATAATCCGTCATG-3'	This study
	K. iwatai Rv	5-CCATACTAATCACTGCAATCAATACACA-3'	
	K. iwatai NED	NED-ATTATTATTCGGTTGAGAGTTGTAG-MGB	
<i>K. hexapunctata</i>	PBT-F	5-GGCTAGTGAAAAGCCAACCTTATGG-3'	(6)
	PBT-R	5-TTCGCGGATTCCAACCTATT-3'	
	PBT-P	FAM-CACTTGTGGCTAAAT-MGB	

*1 Single qPCR, *2 Multiplex qPCR

2.2 顕微鏡検査用 *U. seriola* 虫体抽出法の検討

qPCR で *U. seriolae* の増幅遺伝子 1.0×10^8 copy/g を確認したカンパチ一尾から 7.5g 採材し、ストマッカー袋にいった後 PBS を 45mL 添加し、60 秒粉碎後 200 μ m のメッシュ及び 100 μ m のメッシュ (BD Falcon) を用いて総量が 270mL になるよう PBS でろ過液を作製した。そのろ過液を 50mL 遠沈チューブに各 18mL 分配し、1 試験法あたり 5 検体を作成した。試験方法は①通知法⁵⁾ ②Percoll 法³⁾ ③通知法の PBS を 0.1% Tween80 添加 PBS に、遠心 1500rpm10 分を 3500rpm15 分に変更した方法 (以下「Tween80 添加 PBS 法」) の 3 つとし、計測は Burkert-Turk 型計算盤を使用し、それぞれ 3 回検討してその結果を比較した。また上記採材した同部位を更に 2 回約 50mg 採材し、上記方法で qPCR 法によりコピー数を測定し平均値を出した。

2.3 *U. seriolae* 汚染調査

2.3.1 実態調査

調査した検体は、養殖魚卸業者及び市内鮮魚販売 2 店から内蔵除去後に矢状断された養殖カンパチ 1 尾 (平均重量 3.2kg) を 76 尾購入した。内訳は 2015 年 3 月 (15 尾) と 8 月 (15 尾), 2016 年 3 月 (16 尾), 2017 年 3 月 (15 尾) と 8 月 (15 尾) の計 5 回で行った。生体を放血殺したのち 4°C で保管し 24 時間以内に右側体躯を検査に供した。

調査部位は背部 3 カ所、腹部 3 カ所とし 1cm の立方体状 (約 1.0g) に切り抜いたものを検体として使用した (Fig. 3)。さらに約 50mg を 1.5mL 用マイクロチューブに採取し DNA を抽出し、qPCR でコピー数を測定した。

また、2015 年 3 月の 15 尾において Tween80 添加 PBS 法を用いて顕微鏡下における虫体数の測定を試みた。

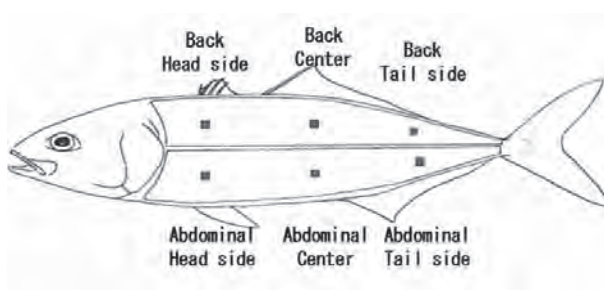


Fig. 3 Six location of a greater amberjack which extracted a sample for qPCR and light microscopy

2.3.2 寄生分布調査

実態調査で 6 部位から全て *U. seriolae* の遺伝子を検出した 3 尾 (No.85, 87, 91) について寄生分布調査を行った。各 6 部位を中心に約 2cm の対角線上 4 点を採材部位とした。また、切断面からの *U. seriolae* 遺伝子コン

タミネーションを考慮して ϕ 3mm 生検トレパン (フェザー) を使用して約 50mg 採取した後 DNA を抽出し上記と同じ方法で調査した (Fig. 4)。さらに実態調査で検出箇所が少なかった 3 尾 (No.84, 89, 98) についても同様に調査を行った。

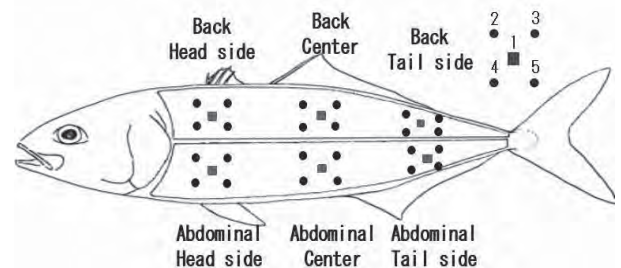


Fig. 4 The added 24 location of a greater amberjack which extracted a sample for qPCR

3 実験結果

3.1 遺伝子検査法の検討

合成 DNA 断片を用いた *U. seriolae*, *K. iwatai* 陽性コントロールで検量線を作成したところ、 10^8 コピー/ウェルから 10^2 コピー/ウェル範囲で R^2 値はともに 1.00 となり直線性を有していた。増幅効率は 98.0%, 93.6% であった (Fig. 5, 6)。

次に 3 種類の蛍光色素を利用した Multiplex qPCR 法の陽性コントロールは、各 3 種類の増幅領域を連結し 1 種の合成 DNA 断片として検量線を作成した。 10^8 コピー/ウェルから 10^2 コピー/ウェル範囲で R^2 値は 3 種類とも 1.00 となり直線性を有していた。Ct 値の差は認められるものの増幅効率は 100.2% (*U. seriolae*), 95.5% (*K. iwatai*), 97.6% (*K. hexapunctata*) であり、良好な増幅が得られ、また交差反応とプライマーダイマーは認められなかった (Fig. 7)。

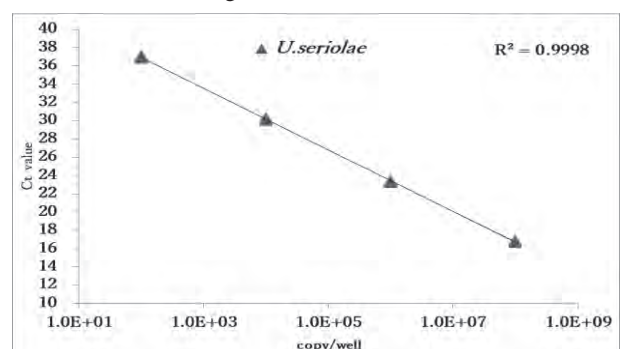


Fig. 5 Dynamic range and sensitivity of qPCR assay for *U. seriolae*. Standard curves of 100-fold dilution of DNA extracted from gBlocks® Gene Fragments

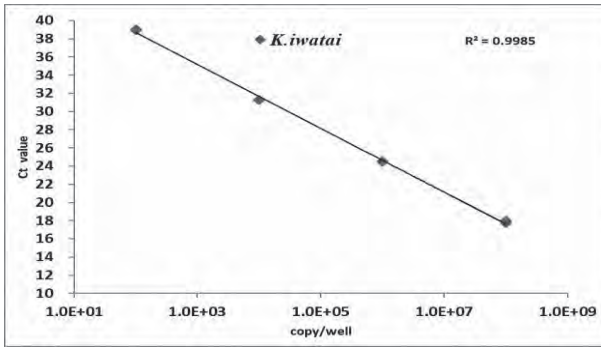


Fig. 6 Dynamic range and sensitivity of qPCR assay for *K. iwatai*. Standard curves of 100-fold dilution of DNA extracted from gBlocks® Gene Fragments

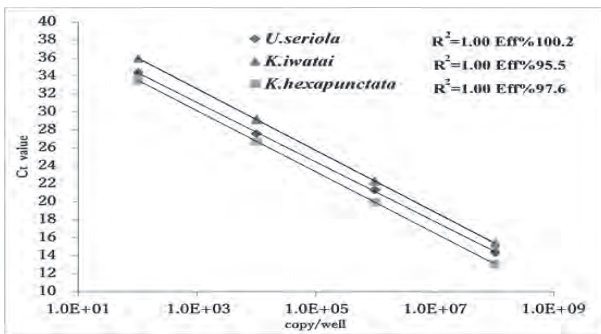


Fig. 7 Dynamic range and sensitivity of Multiplex qPCR assay for *U. seriolae*, *K. iwatai* and *K. hexapunctata*. Standard curves of 100-fold dilution of DNA extracted from gBlocks® Gene Fragments

3.2 顕微鏡検査用 *U. seriolae* 虫体抽出法の検討

虫体陽性検体を3種類の方法で3回検討した結果、虫体数は全て Tween80 添加 PBS 法の検出量が一番多く $6.0 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5$ 個/g であり通知法と Percoll 法に比較して平均 1.8 倍、平均 1.2 倍の検出であった。コピー数は 1.1×10^7 , 7.9×10^8 , 1.6×10^9 copy/g で、コピー数と虫体数の相関は認められなかった (Fig. 8)

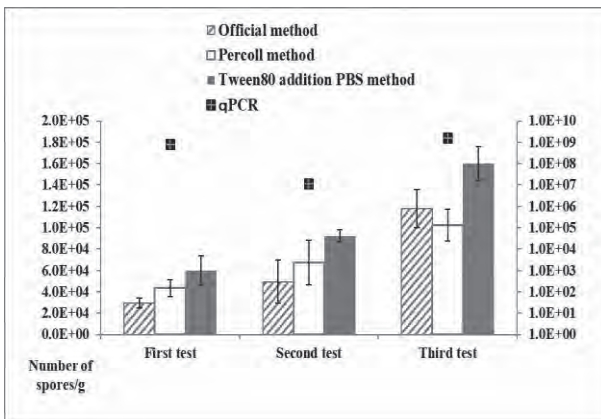


Fig. 8 Detection of spores by three methods and *U. seriolae* DNA in greater amberjack

3.3 *U. seriolae* 汚染調査

3.3.1 実態調査

PCR 陽性個体は 76 検体中 27 検体で認められ、調査時期別では 5 回のうち 2015 年 3 月と 2017 年 8 月が 53.3% と最大であった。検出遺伝子量は 2.7×10^4 copy/g から 1.8×10^{10} copy/g の範囲であったが、2016 年 3 月では検出されなかった (Table 2, Fig. 9)。顕微鏡検査を行った 15 尾において 8 尾から 10^5 copy/g 以上遺伝子を検出したが、虫体の検出は 10^6 copy/g 以上の 4 尾で確認し、 10^5 copy/g では 1 尾(4 尾内)のみ確認できた。

また、部位別検出率は背部中央と尾側がともに最大で 63.0% となり、平均は 54.3% (標準偏差 8%) で特異的な寄生部位は認められなかった (Fig.10)。

Table 2 Detection of *U. seriolae* DNA in greater amberjack from markets

No.	Sample Name	Years	Back Head side	Back Center	Back Tail side	Abdominal Head side	Abdominal Center	Abdominal Tail side
1	17			8.5E+05		1.1E+06		
2	24				2.7E+04			1.3E+05
3	27					2.3E+05		
4	28	2015.3	2.5E+09	5.9E+09	3.1E+09	1.8E+10	4.2E+07	1.7E+09
5	29		4.1E+05	1.1E+06	2.6E+05	1.7E+06		6.5E+04
6	20		5.6E+08		1.3E+08	3.8E+04	2.4E+09	8.9E+07
7	30			1.1E+05				
8	31			2.7E+05	2.6E+05		1.1E+05	
9	33				4.0E+05			
10	34		1.6E+07		1.8E+06			
11	35	2015.8	5.4E+07	3.0E+06	3.7E+07	2.6E+07	1.4E+07	4.6E+07
12	37			1.4E+06				
13	42				6.9E+05			
14	44			2.9E+05				5.8E+04
15	45		5.1E+06	9.5E+05	5.0E+06	2.9E+06	2.6E+05	1.9E+06
16	77			5.4E+05	1.7E+06	3.1E+05	3.0E+06	
17	80	2017.3	7.1E+05	3.4E+06		1.6E+05		
18	81			1.8E+06		7.0E+04		6.4E+05
19	82			1.3E+09	1.4E+07	5.4E+05		2.0E+06
20	84		6.6E+04					
21	85		7.9E+08	1.4E+07	7.8E+06	7.0E+07	6.1E+08	7.1E+05
22	86		3.5E+04	2.8E+05	4.0E+05	2.1E+08	3.8E+07	3.9E+05
23	87	2017.8	3.0E+08	5.3E+08	1.5E+07	4.2E+07	1.4E+09	5.9E+08
24	88				6.1E+05	5.6E+04		
25	89		8.2E+04				3.1E+05	
26	91		3.0E+06	4.7E+05	3.2E+04	7.6E+04	7.7E+08	7.6E+08
27	98						1.8E+05	
Positive rate			48.1%	63.0%	63.0%	59.3%	44.4%	48.1%

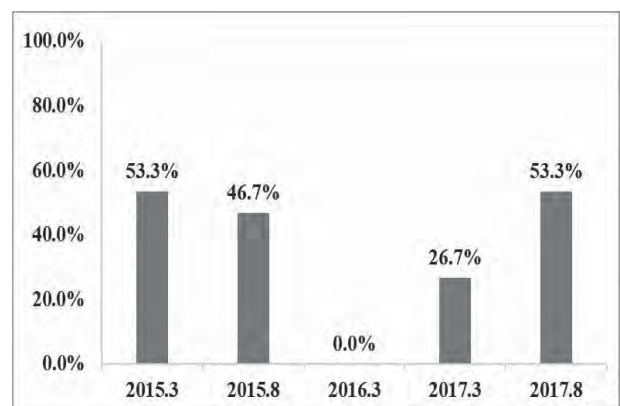


Fig. 9 The positive rate in the investigation period of greater amberjack from markets

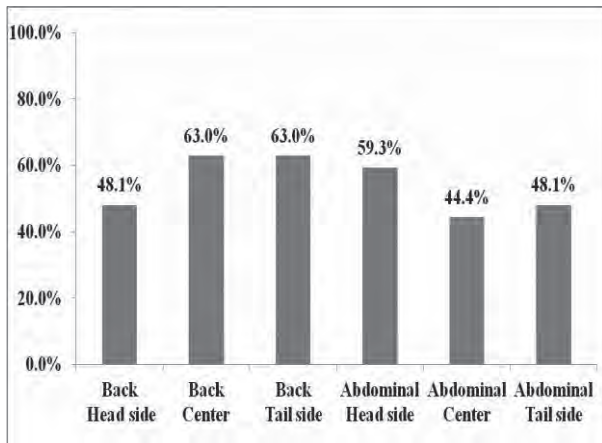


Fig. 10 The positive rate in the 6 place where a sample was extracted in greater amberjack

3.3.2 寄生分布調査

分布調査は、上記の調査で 6 部位全てが陽性であった 3 尾の検体 (No.85, No.87, No.91) を使用した. No.85 は調査箇所 30 か所のうち 22 か所 (73%) 陽性で、最小量 9.7×10^3 copy/g から最大量 7.9×10^8 copy/g の遺伝子を検出した. No.87 は 26 か所 (87%), 3.1×10^3 copy/g から 1.4×10^9 copy/g. No.91 は 16 か所 (53%), 2.8×10^3 copy/g から 7.7×10^8 copy/g であった (Table 3).

次に検出部位が少なかった検体の調査として同様に 3 尾 (No.84, 89, 98) について行った. No.84 は、3 か所 (10%) 認められ、 1.5×10^3 copy/g から 6.6×10^4 copy/g, No.89 は 5 か所 (17%) 2.25×10^4 copy/g から 2.8×10^6 copy/g, No.98 は 3 か所 (10%) 1.2×10^3 copy/g から 8.3×10^6 copy/g と検出部位は散在していた. これら分布調査の結果より寄生部位の特異性はないことが示唆された (Table 4).

Table 3 *U. seriolae* parasitic distribution investigation (6 point detection sample)

Sample Name	Back Head side	Back Center	Back Tail side	Abdominal Head side	Abdominal Center	Abdominal Tail side
85-1	7.9E+08	1.4E+07	7.8E+06	7.0E+07	6.1E+08	7.1E+05
85-2	2.1E+05		1.7E+08	6.2E+04	2.5E+08	1.1E+07
85-3		1.6E+04		5.2E+07	6.9E+03	2.5E+04
85-4		2.2E+08		2.2E+04		1.7E+05
85-5		9.7E+03	1.7E+05	4.2E+08	3.6E+08	
87-1	3.0E+08	5.3E+08	1.5E+07	4.2E+07	1.4E+09	5.9E+08
87-2	6.1E+05	1.1E+04	4.2E+06		4.5E+05	2.1E+08
87-3	1.3E+05	1.3E+05	1.9E+08	1.2E+04	2.2E+05	2.5E+08
87-4	1.6E+08	1.8E+05	1.0E+06	2.6E+04	6.1E+07	1.9E+08
87-5		2.5E+07	1.4E+08	3.1E+03		
91-1	3.0E+06	4.7E+05	3.2E+04	7.6E+04	7.7E+08	7.6E+08
91-2		3.6E+04	1.6E+08		1.7E+08	2.8E+03
91-3	8.4E+03					
91-4	7.4E+07		1.6E+05			5.0E+03
91-5			5.7E+05		2.3E+08	

Table 4 *U. seriolae* parasitic distribution investigation (1 and 2 point detection sample)

Sample Name	Back Head side	Back Center	Back Tail side	Abdominal Head side	Abdominal Center	Abdominal Tail side
84-1	6.6E+04					
84-2						
84-3						
84-4	1.5E+03					6.6E+04
84-5						
89-1	8.2E+04				3.1E+05	
89-2						
89-3					6.0E+05	2.2E+04
89-4						
89-5			2.8E+06			
98-1					1.8E+05	
98-2					1.2E+03	
98-3	8.3E+06					
98-4						
98-5						

4 考察

魚の粘液胞子虫は、人に対する病原性が低いとされてきた⁷⁾. しかしヒラメの生食による食中毒の原因が *K. septempunctata* によるものと特定されて以来、ヒラメを除く生鮮魚類の生食による同様の症状を呈する食中毒についても、他の粘液胞子虫の関与が推定されている. 近年マグロの *K. hexapunctata*^{6) 8)} やイシダイの *K. iwatai*⁹⁾ についての報告がある. また、カンパチやヒラマサにおいても *U. seriolae* の関与⁷⁾ が考えられている. 福岡市でも 2 件の事例が発生したが、有効な同定検査法がなかったために新たに qPCR 法を検討した. 検討はヒラメ検査法⁴⁾ で指定されている 18S rDNA 領域より多様性の高い 28S rDNA 領域の qPCR 法を検討して、良好な結果を得ることができた. また、*K. iwatai* についても 28S rDNA を領域で qPCR 法を開発した.

食中毒事例の場合は、魚の残品がないことが多いので魚肉の虫体の検査をする可能性が低く、患者便からの検査が主になる. また患者便の虫体検出は、夾雑物や分解等で顕微鏡下での確認が困難であるため、遺伝子の検出が有効である. さらにカンパチやマグロ、タイ等は魚の刺身の盛り合わせに使用されていることが多いので、患者便を検査するには、各粘液胞子虫を検査する必要がある. このため、*K. hexapunctata* を追加した 3 種類の Multiplex qPCR 法をヒラメ参考法⁵⁾ と同条件で検討し開発した.

U. seriolae は、形態が *Kudoa* 属と違い油滴に類似し、径も 1/2 (約 6μm) と小さい. そのため 200 倍率での顕微鏡下での検査が非常に困難であり、1000 倍率での確認が必要であった. また、*K. septempunctata* と比較して遺伝子量に比べ検出虫体数が少ないことから、粘着除

去及び遠心力を強化した Tween80 添加 PBS 法が、ヒラメ検査法⁴⁾ や Percoll 法³⁾ より有効と示唆された。ただし、大西ら^{7) 11)} が報告しているように、筋肉中における未分化虫体の存在により、虫体検出率の低さの可能性も考慮する必要がある。

K. septempunctata による食中毒は、年間発生件数の 70% が夏期に発生していると報告がある¹¹⁾。しかし *U. seriola* では、今回の実態調査は、1 期あたり 15~16 尾と検证件数としては多くはないが、8 月と 3 月を比較すると遺伝子の検出状況は顕著な差がなかった。また 2016 年には全く検出されなかったことから、養殖カンパチのロット差が影響するものと推定される。理由として、国内の養殖カンパチは、種苗（体長約 25cm）のほとんどを中国の一部地域（8 漁場：海南島、広東省）から輸入し、約 1.5~2 年間育成後（体重約 3~4.5kg）に出荷を行うと報告されている¹²⁾。また、ヒラメの *K. septempunctata* では、養殖時における寄生は少ないと考えられており、種苗時の寄生状況が、季節性の食中毒発生に関連していると推察されている¹⁾。カンパチの *U. seriola* においても同様なことが考えられ、種苗の育成漁場の地理及び交互宿主の環形動物の生息状況の増減等が、寄生率に大きく影響するものと考えられる。

部位別の寄生調査では 1 尾を 6 部位に分けて行ったが、特異的な部位は確認できなかった。このことは、ヒラメと同じく筋肉に寄生する粘液胞子虫の感染機序である種苗時に虫体に感染した際、血流によって全身に運ばれ、シスト若しくはシュードシストを形成する¹³⁾ ため、このような結果になったと考えられる。そこで、さらに詳細な分布調査を行ったが、 10^9 copy/g 以上あった部位の近接でも検出されない箇所も認められたことから、濃厚に寄生していても全身において均質に寄生していないことが考えられる。このことから食中毒時の各患者によって症状の重軽にも大きく関与する可能性が示唆された。

U. seriola の毒性については調査報告がない。本研究においても毒性試験を試みたが、細菌のように *U. seriola* を人工的に増殖することができない。そのため大量に寄生しているカンパチを確保し、さらに精製された生きた状態の虫体を収集することが、本研究を続けるなかで困難であった。毒性試験は *Kudoa* 属で行われた方法では困難であるので、方法の開発も含め今後の調査する上で大きな課題であることと考える。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご助言及びご指導をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科横山博助教並びに

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部大西貴弘室長に御礼申し上げます。

文献

- 1) 大西貴弘, 古沢博子, 佐古 浩, 乙竹 充, 福田 穰, 吉成知也, 山崎朗子, 鎌田洋一, 小西良子: クドア食中毒及び *Kudoa septempunctata* の季節による特徴, 日本食品微生物学会雑誌, 30, 125-131 (2013)
- 2) Lester, R.J.G.: *Unicapsula seriola* n.sp. (Myxosporea, Multivalvulida) from Australian yellowtail kingfish *Seriola lalandi*, Journal of Eukaryotic Microbiology, 29, 584-587 (1982).
- 3) Yokoyama, H., Abe, N., Maehara, T., Suzuki, J.: First record of *Unicapsula seriola* (Myxozoa: Multivalvulida) from the muscle of Malabar grouper *Epinephelus malabaricus* in Japan, Parasitol. Int., 63, 561-566 (2014)
- 4) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: *Kudoa septempunctata* の検査法について, 平成 28 年 4 月 27 日付け生食監発 0427 第 3 号
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部: 食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検査法 (参考) について, 平成 26 年 5 月 26 日, 事務連絡 (2014)
- 6) Suzuki, J., Murata, R., Yokoyama, H., Sadamasu, K., Kai, A.: Detection rate of diarrhoea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters, Int. J. Food. Microbiol., 194, 1-6 (2015)
- 7) 大西貴弘, 小原徹也, 新井沙倉, 吉成知也, 小西良子: カンパチの生食に伴う有症苦情事例残品中の *Unicapsula seriola* 寄生量の定量的解析の検討, 日本食品衛生学会誌, 59, 24-29 (2018)
- 8) 川瀬雅雄, 吉岡 丹, 細谷美佳子, 紫竹美和子: *Kudoa hexapunctata* 寄生メジマグロが原因と疑われる有症事例と患者便に関する検討, 日本食品微生物学会雑誌, 32, 48-53 (2015)
- 9) 中堂園文子, 御供田睦代, 岩元由佳, 穂積和佳, 石谷完二, 岩切忠文: 食中毒疑い事例から検出した *Kudoa iwatai* の一事例, 鹿児島県環境保健センター所報 第 16 号 (2015)
- 10) Ohnishi, T., Furusawa, H., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Horikawa, K., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: Electron microscopic study of *Kudoa septempunctata* infecting *Paralichthys olivaceus* (olive flounder), Jpn. J. Infect. Dis., 66, 348-350 (2013)
- 11) Ohnishi, T., Furusawa, H., Sako, H., Ototake, M., Fukuda, Y., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: Studies on seasonal changes in occurrence of food-

- borne disease associated with *Kudoa septempunctata*,
Jan. J. Food Microbiol., 30, 125-131 (2013)
- 12) 魚類防疫技術書 養殖カンパチの魚病診断マニュアル
(改訂版), 公益社団法人日本水産資源保護協会,
2018
- 13) 佐藤 宏, 笠井亨浩: 日本並びにその近海で記録さ
れたクドア属粘液胞子虫(1930~2016), Jap. J.
Vet.Parasitol. Vol.15. No.2 (2016)
- 14) Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y., Sugita-
Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* invasion in-creases the
permeability of human intertinal epithelial monolayer,
Foodborne. Pathog. Dis., 10, 137-142 (2013)

要約

福岡市では、2014年に2事例の寄生虫性食中毒を疑う原因不明の事例が発生しており、喫食したカンパチに認められた多殻目粘液胞子虫 *U. seriolae* が病因物質である可能性を示唆した。しかしこの寄生虫は国内において発見されて日も浅く、直径約 6 μ m の微細な構造のため顕微鏡検査も困難で、また遺伝子情報等も少ないため検査法が確立されていないことから、検査法の検討、市内流通品からの汚染実態調査を行った。

病因物質として疑われる多殻目粘液胞子虫 *U. seriolae*, *K. hexapunctata*, *K. iwatai* の3種類について、遺伝子検査法を検討し 28SrDNA 領域におけるリアルタイム PCR を確立し、さらに患者便における3種類の一斉検査法の検討を行い Multiplex qPCR も作成した。また *U. seriolae* については顕微鏡検査の為に虫体抽出法として Tween80 添加 PBS 法を確立した。市内流通しているカンパチ 76 検体の *U. seriolae* 汚染調査を行った結果、遺伝子検出個体率は約 40%であったが、季節的有意差は認められなかったことから、感染時期である種苗の生息環境に影響されることが考えられた。また、個体の寄生分布調査の結果により、特異的な寄生部位は無いことが示唆された。