

45. 兵庫県における魚介類の粘液胞子虫（クドア属）汚染実態に関する研究

○ 齋藤悦子（兵庫県立健康生活科学研究所）

【はじめに】

近年、ヒラメ等の生の魚介類の摂取後数時間で一過性の嘔吐・下痢を呈する食中毒事例が増加しているが、これらは病因物質が特定されることもなくその実態は不明であった。このため、国立研究機関が全国の自治体から関連する食品の提供を受けて、網羅的ゲノム解析を実施した結果、原因と推定されるヒラメは粘液胞子虫（クドア属）の *Kudoa septempunctata* (*K. septempunctata*) の遺伝子が有意に検出されることが判明した。その後の調査で *K. septempunctata* は食中毒との関与が強く示唆され、このことが厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会に報告された。兵庫県においても平成 22 年～23 年度にヒラメが原因食品と考えられる嘔吐下痢症事例が頻発した。

クドア属では *K. thyrsites*、*K. lateolabracis* 等が魚介類の筋肉中に空洞を作るジェリーミートの原因となることが知られているが、ヒトへの病原性は報告されていなかった。また、*K. septempunctata* は発見されて間もない粘液胞子虫で、魚介類での分布状況については未解明な部分が多い。このため、市場に流通する魚介類や養殖段階での魚類についてクドア属の消長を明らかにして、*K. septempunctata* による食中毒予防対策上の知見を得ることが必要となっている。本研究は、兵庫県内で流通する魚介類や養殖段階での魚類についてクドア属の消長を明らかにして、*K. septempunctata* による食中毒予防対策上の知見に資することを目的として行った。

【材料】

1. 市販生鮮魚介類における汚染状況の調査

県内各地域で市販される魚介類を 52 検体購入し、クドア属の検出を試みた。検体の内訳は、養殖ヒラメ 44 検体（産地：鹿児島 15, 愛媛 7, 韓国 7, 兵庫 5, 大分 3, 三重 2, 長崎 1, 不明 4）、天然ヒラメ 4 検体（兵庫 2, 徳島 1, 青森 1）カレイ 4 検体（島根 1, 徳島 1, 福井 1, 三重 1）で、平成 23 年 10 月から平成 24 年 8 月に県内で購入した。

2. 生産地における汚染状況の調査

兵庫県農林水産部局と連携して、県内のヒラメ養殖場におけるクドア属による汚染状況を調査した。検体の内訳は、A 養殖場（平成 23 年 6 月導入ヒラメ 20）、B 養殖場（平成 23 年 5 月導入ヒラメ 50, 平成 24 年導入種苗 40）で、平成 23 年 10 月から平成 24 年 8 月に 10 尾ずつ（種苗は 20 尾ずつ）採取した。

【方法】

1) コンベンショナル PCR 法

水産庁から提示された 28S rDNA および 18S rDNA を検出するコンベンショナル PCR 法^{1, 2)}により、*K. septempunctata*, *K. thyrsites* 及び *K. lateolabracis* について検出を試みた。また、これらのプライマーを組み合わせて三種を同時に検出するためのマルチプレックス PCR 法について検討した。

2) リアルタイム PCR 法

平成 23 年 7 月 11 日付厚生労働省通知「*Kudoa septempunctata* の検査法について（暫定版）」に基づきクドア属遺伝子の検出を行った。即ち、検体の筋肉部位 50mg を 2 カ所より採取し、QIAamp DNA mini kit の「組織プロトコール」に準じて DNA を抽出し、溶出液を PCR のテンプレートとして Taq Man probe 法によるリアルタイム PCR によりクドア属遺伝子を検出した。

3) リアルタイム PCR 法によるクドア属の定量系の整備

凍結あるいは長期保存されて病原性や形態検査が出来なくなった食品と食中毒との関連性を明らかにするために、PCR 法での定量を行った。また、新たなプライマー・プローブを設計するため、*K. septempunctata* に特異性の高い領域をコンベンショナル PCR 法³⁾で増幅し、これを TOPO TA cloning kit (invitrogen) を用いてこれをクローニングベクターに組み込んだ。形質転換した大腸菌を増殖させ、ここからプラスミドを回収精製し、定量用の標準テンプレートを作成した。

4) 鏡検法

検体を 0.5g 秤量してメッシュを載せ、PBS3ml を加えてピンセット等で軽く潰し、100 μ m のメッシュに通したろ液を 1500rpm, 10 分, 10°C の条件で遠心したのち、沈渣を PBS500 μ l で懸濁して 10 μ l を Burker-Turk 型血球計算盤で観察し、検体 1g あたりの孢子数を算出した。

【結果】

1. コンベンショナル PCR 法の検討

K. septempunctata の 28SrDNA を検出する PCR 法では、多数の非特異バンドがみられたことから、*K. septempunctata* については 18S rDNA を検出するプライマーを採用した。これと *K. thyrsites* 及び *K. lateolabracis* の 28S rDNA を検出するプライマーを組み合わせたマルチプレックス PCR の検出系を構築した。この系では 95°C 4 分、95°C 35 秒、59°C 30 秒、72°C 30 秒の反応を 35 サイクル行い、その後 72°C で 5 分増幅を行った。これにより非特異反応は減少し、陽性コントロールを用いた試験で良好な結果が得られた。

2. リアルタイム PCR 法による定量性の確認

定量リアルタイム PCR で得られた検量線の傾きは厚生労働省通知で示された範囲内

(-0.301 ± 0.020) であり、増幅効率に問題がないことを確認した。

3. 汚染実態調査

平成 23 年 10 月に購入した韓国産養殖ヒラメ 1 検体からクドア属遺伝子が検出され、検体 1 g あたりの DNA コピー数は 2.4×10^4 /g であった (表 1)。この検体からは鏡検法で 4 つの極嚢をもつクドア属胞子が 3.9×10^5 /g 観察され、コンベンショナル PCR 法では *K. lateolabracis* 陽性となった。その他の検体からはクドア属遺伝子は検出されず、鏡検法およびコンベンショナル PCR 法でもクドア属陰性となった。

【考察】

今回用いたリアルタイム PCR 法は *K. septempunctata* 以外のクドア属にも交差反応することが知られており、本研究でも市販養殖ヒラメの *K. lateolabracis* に対して反応を確認した。クドア属は遺伝子の相同性が高いため、特異性の高いプライマーの選択は容易ではない。しかし、今回選定した *K. septempunctata* の 18S rDNA を増幅するプライマーに、*K. thyrsites* 及び *K. lateolabracis* の 28S rDNA を増幅するプライマーを併用したコンベンショナル PCR 法により、迅速な判定が可能となった。なお、*K. lateolabracis* 陽性となった検体は購入時から筋肉が柔らかくなっている、いわゆるジェリーミートの状態であり、肉眼的に異常と判別することができた。一方、*K. septempunctata* はヒラメの筋肉中でシストや空洞を形成することはなく、寄生ヒラメを肉眼で判別することはできないとされており、我々が調査した食中毒事例においても、肉眼的な変化は観察されなかった。

今回の汚染実態調査では、供試検体から *K. septempunctata* は検出されなかった。兵庫県内の 2 つのヒラメ養殖場から購入・提供を受けたヒラメ 70 尾からはクドア属は検出されず、平成 24 年に B 養殖場に導入された種苗 40 尾でもクドア属は陰性となった。*K. septempunctata* はミミズやゴカイ類の環形動物とヒラメの間で生活環が形成されており、今後、*K. septempunctata* および環形動物の侵入がない場合、これらの養殖場でヒラメから *K. septempunctata* が検出される可能性は低いと考えられる。両養殖場ではこのことを意識した飼育管理が行われており、*K. septempunctata* 侵入の可能性は低いことが伺われた。天然ヒラメからも *K. septempunctata* が検出された例もあるため⁴⁾、天然ヒラメも調査の対象にしていたが、養殖ヒラメに比較して市販されている数が少なく、十分な検討ができなかった。

今回の調査では *K. septempunctata* は検出されなかったが、平成 23 年から 24 年に兵庫県内で複数の食中毒事例が発生し、喫食残品が搬入された。平成 23 年 6 月以降に鏡検法で事例残品より検出された *K. septempunctata* 胞子数と、リアルタイム PCR 法により定量された DNA コピー数は表 2 のとおりである。食中毒事例残品から検出された胞子数は $3.2 \times 10^5 \sim 8.6 \times 10^6$ *K. septempunctata* で、DNA コピー数は $3.6 \times 10^9 \sim 6.0 \times 10^{10}$ /g であった。胞子数と DNA コピー数の間には明らかな関連性は認められず (図 1)、本研究で用いたリアルタ

イム PCR 法から孢子数を算出することはできない。暫定法では 10^7 コピー/g を超えたものをスクリーニング陽性と扱っているとされているが、事例検体は全てこの値を大きく超えていた。一方、*K. lateolabracis* 陽性検体中の DNA コピー数は 2.4×10^4 /g となり、同オーダーの *K. septempunctata* 孢子数を含む検体に比較して $1/10^5 \sim 1/10^6$ と低値であり、スクリーニングでは陰性となる値であった。このため、*K. lateolabracis* 寄生検体がリアルタイム PCR でスクリーニング陽性と判定される可能性は低いと考えられるが、本調査では陽性検体が少なかったため、より詳細な検討が必要である。

今回の研究開始前に、国立医薬品食品研究所よりリアルタイム PCR 定量用コントロールが配布されたため、食中毒事例および市販検体から検出された *K. lateolabracis* の DNA コピー数定量にはこの陽性コントロールを使用した。本研究では、*K. septempunctata* により特異性の高いリアルタイム定量 PCR 法を構築するため、特異性の高い領域を含む陽性コントロールを作成した。プライマー・プローブについては改良されたものも報告されており⁵⁾、今後新たに検討する予定である。

【主な参考文献】

- 1) 水産庁増殖推進部長通知．クドア属 3 種についての PCR 検査手順（2011 年 2 月 8 日版）平成 23 年 6 月 17 日，23 水推第 277 号別紙
- 2) 水産庁増殖推進部長通知．養殖ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* による食中毒の防止対策について、平成 24 年 6 月 1 日、24 水推第 374 号
- 3) Harada, T. et al. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int. J. Food Microbiol.* (156), 161-167 (2012)
- 4) 大西貴弘．*Kudoa septempunctata* を原因微生物とする食中毒，食品衛生研究第 61 号(11)，13-20 (2011)
- 5) 飯島義雄．*Kudoa septempunctata* 特異的リアルタイム PCR，IASR (32) ， 369-370 (2011)

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました財団法人大同生命事業団に厚く御礼申し上げます。

【経費使用明細】

ヒラメ等購入費	50,052
PCR用試薬（リアルタイムPCR用マスターミックス、プライマー合成等）	237,775
鏡検用器具（ハサミ、ピンセット、天秤等）	139,335
光熱水費	77,914
計	505,076

表 1

検体採取月	<i>K.lateolabracis</i> 孢子数/g	クドアDNAコピー数/g
平成23年10月	3.9×10^5	2.4×10^4

表 2

検体採取月	<i>K.septempunctata</i> 孢子数/g	クドアDNAコピー数/g
平成23年6月	6.5×10^6	6.0×10^{10}
平成23年6月	8.6×10^6	2.0×10^{10}
平成23年8月	3.2×10^5	1.2×10^{10}
平成23年9月	1.3×10^6	8.7×10^9
平成24年3月	1.8×10^6	7.8×10^9
平成24年5月	8.5×10^5	3.6×10^9
平成24年5月	8.6×10^5	5.6×10^9

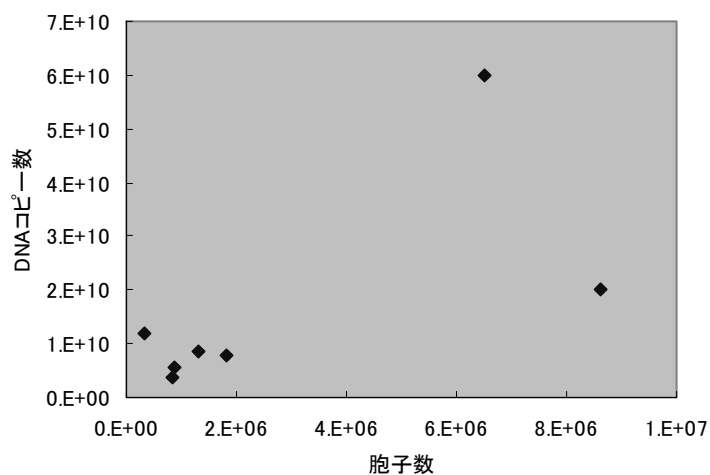


図 1 *Kudoa septempunctata* 孢子数と DNA コピー数の相関