

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

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*1 孝口裕一*1 石澤明子*2

要 旨

今回、ヒラメに寄生する *Kudoa septempunctata* を含めた *Kudoa* 属について札幌市中央卸売市場に流通する鮮魚介類 265 検体を対象とし、顕微鏡検査と PCR 法を用いて、その寄生状況を調査した。

その結果、カツオ 1 検体、メジマグロ 2 検体、クロマグロ 3 検体、メバチマグロ 1 検体について、粘液胞子虫の *Kudoa neothunni* が寄生していることを確認した。

1. 緒 言

2002 年頃より食後数時間で一過性の下痢、嘔気、嘔吐、腹痛が出現するが、既知の病因物質は検出されないという原因不明の食中毒が全国的に発生するようになった。厚生労働省が中心となり病因物質を調査した結果、ヒラメに寄生する粘液胞子虫の一種である *Kudoa septempunctata* と馬肉に寄生する住肉胞子虫の *Sarcocystis fayeri* が原因物質の一部であることが判明した。これらのことから、2011 年 6 月、当該寄生虫に起因すると考えられる有症事例が発生した場合は、これを食中毒として扱うように通知が出された。¹⁾

この通知を受け、札幌市中央卸売市場(以下「市場」)に流通する鮮魚介類について、*Kudoa septempunctata*(以下「*K.s.*」)の寄生状況について調査を開始した。開始直後、メジマグロ(クロマグロの幼魚)の筋肉部分の顕微鏡検査²⁾で 6 個の極嚢を有する粘液胞子虫が確認された(図 1)。*K.s.* の寄生を疑い、このサンプルから DNA を抽出し *K.s.* 28S rDNA に基づく種特異的プライマー³⁾を用いて PCR を実施したが増幅バンドは認められなかった。そこで *K.s.* 以外の粘液胞子虫の可能

性を考慮し、クドア属粘液胞子虫 18S rRNA 遺伝子における寄生虫種による変化に富む領域を上流域と下流域の 2 箇所を設定し、この部分を増幅するように設計した独自のユニバーサルプライマー(以下「UN プライマー」)を用いて PCR を実施した。PCR により遺伝子の増幅が確認されたため、増幅部分のシーケンスを行った。その結果、上流域、下流域共に DDBJ に登録されている *Kudoa neothunni*(以下「*K.n.*」)の塩基配列(DDBJ / EMBL / GenBank accession no. AB693042)と 100%一致した。これらの結果に基づき、市場に流通する鮮魚介類を対象として *K.s.* に限らず広くクドア属粘液胞子虫の寄生状況について、顕微鏡的手法と遺伝子的手法(18S rRNA 遺伝子の増幅及びシーケンス)を用いて調査を実施した。



図 1 メジマグロ(クロマグロの稚魚)の筋肉部分で観察された *Kudoa neothunni* の胞子

*1 北海道立衛生研究所

*2 札幌市保健所

2. 材料および方法

2-1 材料

2012年3月24日から8月4日まで市場に流通する鮮魚介類23種265検体の筋肉組織を綿棒またはピンセットで採取し検査に使用した。265検体の内訳は表1に示した。

2-2 試験方法

2-2-1 前処理

筋肉組織にリン酸緩衝液を加え注射筒の底ですり潰し、均一な液とした。

2-2-2 顕微鏡検査

前処理液をスライドグラスに1円玉大に塗抹し、風乾後エタノールで固定し、レフレル・メチレンブルー染色液で1分~1分30秒染色した。光学顕微鏡(200倍以上)で塗抹部分全面を観察した。

2-2-3 遺伝子検査用DNA抽出

前処理液を100 μ mのセルストレイナー(BD)で濾過後の濾液を1500rpm10分遠心し、上清を捨て、その沈渣を試料とした。DNA抽出はInstaGene Matrix(BIO-RAD)を用い、プロトコールに従いDNAを精製した。

2-2-4 遺伝子検査(PCR)

クドア属粘液胞子虫18S rRNA遺伝子の比較的寄生虫種による変化に富む部分を上流域と下流域の2箇所に設定し、この部分を標的として設計したオリジナルプライマーを作製した

上流域プライマー:foward(CGAAGCGCTCAGTAAATCAG)、reverse(GTCTACTCCGGTATTTCTCG)

下流域プライマー:foward(TAACGAGCGAGACCGATC)、reverse(GTTTACCTACGGAAACCTTG)

PCR反応液は10 \times PCRbuffer 5 μ l、2.5mM dNTPs 4 μ l、5U/ μ l TaKaRa EX Taq 0.25 μ l、Forward primer 0.5 μ l、Reverse primer 0.5 μ l、Sterilized distilled water 34.75 μ lにDNA溶液5 μ lを加え全量を50 μ lとした。PCR反応は94 5分を1回、94 30秒、56 30秒、72 1分を1サイクル

として30サイクル、72 10分で行った。PCR産物は3%アガロースゲルで電気泳動し特異的バンドの確認を行った。

2-2-5 遺伝子検査(シーケンス)

特異的バンドが確認されたサンプルはExoSAP-IT(USB)で精製し、DNA増幅部分の塩基配列を調べるためのサイクルシーケンス反応の鋳型とした。サイクルシーケンス反応はBig Dye Terminator 3.1Cycle Sequencing Kit(Life Technologies)を用い、DNA塩基配列はABI PRISM 3100-Avantを用いて決定した。得られた塩基配列はDDBJにてBlast検索を行った。

3. 結果

3-1 顕微鏡検査

メジマグロ1検体、クロマグロ1検体で6個の極嚢を有する胞子が観察された。メジマグロに認められた胞子をBurker-Turkの血球計算盤で計測した結果は 6.9×10^5 / gであった。また、この胞子の大きさ10個を計測した平均値は幅(width)10.0 μ m、厚さ(thickness)8.8 μ m、縫合線幅(suture width)7.7 μ m、極嚢子長(polar capsule length)2.9 μ m、極嚢子幅(polar capsule width)1.9 μ mであった。形態並びに測定値はK.septempunctataとは異なり、K.neothunniの記載値と一致した⁴⁾⁵⁾。

クロマグロは試料採取量が少量であったため、粘液胞子虫の血球計算盤での計測は実施できなかった。

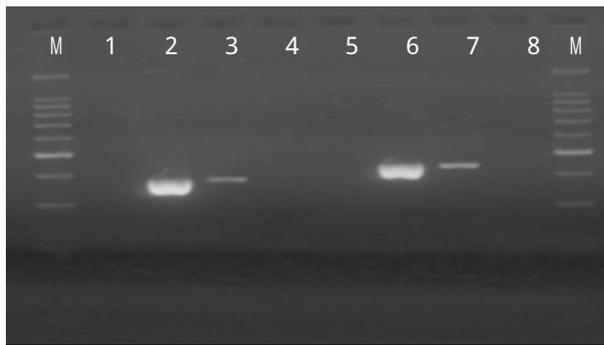
3-2 遺伝子検査(PCR)

265検体中、上記の胞子検出検体を含むカツオ1検体、メジマグロ2検体、クロマグロ3検体、メバチマグロ1検体について上流域プライマー384bpに、下流域プライマー442bpに遺伝子の増幅産物を確認した。電気泳動の一例を図2に示す。

表1 鮮魚介類検査結果一覧

魚種名(商品名)		検体数	顕微鏡検査	PCR 陽性数		シーケンス解析結果 (DDBJ)	
			孢子確認	上流域	下流域	上流域 (384bp)	下流域 (442bp)
ヒラメ	天然	53					
	養殖	7					
キハダマグロ	天然	7					
クロマグロ	天然	16	1	3	3	<i>K.neothunni</i> 100%一致(3/3)	<i>K.neothunni</i> 100%一致(3/3)
	養殖	6					
メジマグロ (クロマグロ幼魚)	天然	5	1	2	2	<i>K.neothunni</i> 100%一致(2/2)	<i>K.neothunni</i> 100%一致(2/2)
メバチマグロ	天然	8		1	1	<i>K.neothunni</i> 100%一致	<i>K.neothunni</i> 100%一致
	不明	15					
ミナミマグロ	天然	1					
	不明	1					
マダイ	養殖	22					
	天然	10					
カンパチ	養殖	22					
サクラマス	天然	11					
クロガレイ	天然	7					
マツカワカレイ	天然	18					
マゾイ	天然	10					
シマゾイ	天然	9					
クロゾイ	天然	6					
イワシ	天然	10					
カツオ	天然	7		1	1	<i>K.neothunni</i> 100%一致	<i>K.neothunni</i> 100%一致
マスノスケ	天然	6					
サーモントラウト	養殖	2					
ブリ	天然	2					
ギンザケ	養殖	1					
サバ	天然	1					
ヤナギノマイ	天然	1					
サヨリ	天然	1					
計		265	2	7	7		

図2 UNプライマーによるPCRの電気泳動



M : 100bp マーカー

1~4 レーン : 上流域プライマー

5~8 レーン : 下流域プライマー

1, 4 レーン : 粘液胞子虫寄生陰性のメジマグロ(ク
ロマグロの幼魚)

2, 6 レーン : *K.n.* 寄生のメジマグロ

3, 7 レーン : *K.s.* 寄生のヒラメ

3-3 遺伝子検査(シークエンス)

PCR 検査で増幅産物が得られた 7 検体について、この増幅部分の塩基配列を決定し DDBJ を用いて相
同性検索を実施した結果、すべての検体において上
流域、下流域ともに *K.n.* の塩基配列と 100%一致し
た。

4. 考 察

ヒラメは養殖、天然合わせて 60 検体検査を行った
が、粘液胞子虫は検出されなかった。このことより、
市場に流通しているヒラメの *K.n.* 寄生状況は高く
はないものと考えられた。

ヒラメ以外の魚種 22 種の検査結果は、顕微鏡検査
でメジマグロ 1 検体、クロマグロ 1 検体で 6 個の極
囊を有する胞子を確認した。メジマグロで確認され
た胞子虫の形態、サイズの測定値などから当該寄生
虫は *K.n.* であると考えられた。クロマグロから検
出された粘液胞子虫は検体量が微量であったため、
詳しい形態観察は実施できなかった。遺伝子検査で
はカツオ 1 検体、メジマグロ 2 検体、クロマグロ 3
検体、メバチマグロ 1 検体が UN プライマーで上流域、
下流域ともに増幅産物を認めた。この部分のシーク

エンスを行い DDBJ で相同性検索した結果、すべての
検体が *K.n.* と 100%一致した。これら顕微鏡検査、
遺伝子検査の結果より、7 検体には粘液胞子虫であ
る *K.n.* が寄生していた可能性が推察された。

K.n. がマグロ 6 検体から検出されたことより、*K.s.*
がヒラメに好んで寄生するように、*K.n.* はマグロに
寄生しやすいという宿主特異性がある可能性が示唆
される結果であった。

5. 結 語

平成 21 年 6 月から平成 23 年 3 月まで厚生労働省
が全国調査した結果では、提供メニューに鮮魚介類
が含まれていた食中毒事例のうちヒラメを喫食して
発生した事例が全体の 68%と最も多く、次いでマグ
ロ 37%、エビ 30%、タイ 25%と続いている。

K.n. のヒトに対する病原性に関しては現時点では
報告されていないが、マグロ 6 検体から *K.n.* が検
出された今回の結果は、*K.s.* に限らず *K.n.* もヒト
に対する病原性を持っている可能性を示唆するもの
と考えられる。

ヒラメが原因食品として報告されている食中毒事
例のほとんどが養殖ヒラメに寄生した *K.s.* が原因
で起こっているが、今回の調査で検出した *K.n.* は
すべて天然魚からの分離であった。*K.s.* は養殖魚に、
K.n. は天然魚に寄生しやすい傾向にあるのかもしれ
ない。

また過去のデータから、*K.s.* が原因となって起こ
る食中毒は 8 月~9 月に著しく発生数が増加する傾
向にあることが分かっている。³⁾

これらのことから、鮮魚介類に寄生する粘液胞子
虫の詳細な情報を得るために今後も寄生状況の調査
を継続していきたいと考えている。

6. 文 献

- 1) 生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例へ
の対応について(平成 23 年 6 月 17 日 厚生労働
省医薬食品局食品安全部長通知)

- 2) *Kudoa septempunctata* の検査法について 暫定版 -(平成 23 年 7 月 11 日食安監発 0711 第 1 号)
- 3) 平成 23 年 4 月 25 日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品合同部会配布資料
- 4) Arai Y , Matsumoto K On a new sporozoa , *Hexacapsula neothunni* gen.et sp. Nov. , from the muscle of yellowfin tuna , *Neothunnus macropterus*. Bull Jpn Soc Sci Fish 18:293 - 298(1953)
- 5) Matsukane Y , Sato H , Tanaka S , Kamata Y , Sugita Konishi Y , *Kudoa septempunctata* n.sp.(Myxosporea:Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea . Parasitol Res. 107(4):865 -72.(2010)