

市場流通品の生鮮魚における粘液胞子虫類の実態調査と 効率的な検出法の検討

福留智子 川原康彦 阿波野祥司¹⁾ 吉野修司 萩平敦朗²⁾ 元明秀成

Survey on actual condition of Myxosporea and effective detection method in fresh fish of market circulation products

Tomoko FUKUDOME, Yasuhiko KAWAHARA, Syoji AWANO, Shuji YOSHINO,
Atsuro HAGIHIRA Hidenari GANMYO

要旨

近年、生食用の生鮮魚の喫食後数時間で嘔吐、下痢などの有症苦情事例が報告されており、市場に流通している生鮮魚について粘液胞子虫類の実態調査を行った。78検体中4例から *Kudoa* 属、*Unicapsula* 属などの粘液胞子虫類が検出された。糞便からの粘液胞子虫類の検出方法については DNA 抽出の際の温度、時間、ビーズの使用の有無の条件下で添加回収試験を行った結果、ジルコニアビーズを用いて 95℃で 10 分間加熱することで高い回収率を得られた。

キーワード 生食用生鮮魚、粘液胞子虫類、*Unicapsula seriola*e, ジルコニアビーズ

はじめに

近年、生食用生鮮魚等を喫食後数時間で嘔吐、下痢を呈する粘液胞子虫類による有症苦情事例が全国的に報告されている。現在、食中毒の病因物質として明らかにされているのはヒラメ等に寄生する *Kudoa septempunctata* のみであるが、全国的には他の *Kudoa* 属やカンパチに寄生する *Unicapsula seriola*e (*Unicapsula* 属)の関与が疑われる事例も報告されている。当県においても、平成 27 年 3 月～平成 30 年 3 月までに魚の刺身などを含む食事を喫食後、短時間で下痢などを起こした事例が 15 例発生している。しかし、粘液胞子虫類は腸管内で増殖せず、一過性の症状で短時間に体外へ排出されることから糞便中からの検出が困難で、病因物質の特定に至らず有症苦情事例として処理される場合が多い。

当研究所において過去の食中毒疑い調査事例を遡って調査したところ、喫食残品のカンパチ 3 例(うち 1 例は国立医薬品食品衛生研究所にて検査)から *U. seriola*e の遺伝子が検出された(平成 28 年度成果発表会で報告済み)。今回、市場流通品の生鮮魚等の粘液胞子虫類の実態調査と検出法の検討を行ったので報告する。

方法

1 材料

県内で流通している生鮮魚で生食用として販売されている刺身等 70 件、当研究所に搬入のあった魚、フィレ等 8 件の計 78 検体を用いた。

2 粘液胞子虫類の実態調査

1) リアルタイム PCR

検体は、厚生労働省通知(平成 28 年 4 月 27 日付け生食監第 0427 第 3 号)の「*Kudoa Septempunctata* 検査法」のプロトコールに従って DNA を抽出した。その後 *K.septempunctata* 及び *U. seriola*e をターゲットとしたリアルタイム PCR 法でスクリーニングを行い、陽性遺伝子が確認された検体については顕微鏡検査と 18SrDNA シークエンス解析を行った。

2) 顕微鏡検査

Unicapsula 属は孢子同士の接着性が高く *Kudoa* 属と同様の方法では孢子数を算定することが困難なことから、魚の筋肉を粉碎後 3500rpm, 10 分間遠心し、PBS0.5ml を加えて懸濁したものを用いた。計数はビルケルチュルク型血球計算盤を用いて 1g あたりの孢子数を算出

した。

3) シークエンス解析

リアルタイム PCR で陽性が確認された検体について、抽出した DNA テンプレートを用い、*Kudoa* 属、*Unicapsula* 属の 18SrDNA を標的とした既報^{2,3)}のプライマーを使用し PCR を行った。遺伝子増幅が確認された検体は MiniElute PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて PCR 産物を精製した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit(Applied Biosystems)を使用し、3500 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)にて塩基配列を決定した。得られた塩基配列は DDBJ の BLAST 検索により既存配列との相同性を確認した。

3 検出方法の検討

U. seriolae の孢子 1.3×10^4 個を添加した健常者便を用いてジルコニアビーズ(以下ビーズ)を使用した破砕抽出法の検討を行った。DNA 抽出は QIAmp FAST DNA stool Mini Kit(QIAGEN)を用い、糞便 200mg を 20%乳剤とした後、熱処理時間を 70°C, 95°C, 加熱時間をそれぞれ 5 分, 10 分, 15 分としリアルタイム PCR 後の増幅産物量から回収率を算出した。

結果

1 粘液胞子虫類の実態調査

魚 78 検体のうち 4 件から 粘液胞子虫類の遺伝子が検出された(表 1)。4 件のうち *Kudoa* 属が養殖ヒラメから 1 件、*Unicapsula* 属が養殖カンパチから 3 件検出された。18SrDNA シークエンス解析の結果、*Kudoa* 属については *K. lateorablacis*、*Unicapsula* 属については *U. seriolae* と相同性が 100%一致した。

顕微鏡検査についてはヒラメからは孢子が検出されず、カンパチ 3 検体についてはいずれも孢子の確認はできたが定量下限値以下であった。

表 1 検出された粘液胞子虫類

No	魚種	粘液胞子虫	遺伝子数 (copy rDNA/g)	顕微鏡検査
1	ヒラメ	<i>Kudoa lateorablacis</i>	2.9×10^3	-
2	カンパチ	<i>Unicapsula seriolae</i>	3.2×10^3	+
3	カンパチ	<i>Unicapsula seriolae</i>	1.2×10^4	+
4	カンパチ	<i>Unicapsula seriolae</i>	7.1×10^4	+

2 検出方法の検討

DNA 抽出の際、ビーズを使用しない場合は温度、時間に関係なく回収率にバラツキがみられ、ビーズを使用した場合は加熱処理を 95°C10 分以上にすることで最も高い回収率が得られた(図 1)。

考察

今回の調査で市場に流通している魚の刺身等に粘液胞子虫類の遺伝子及び孢子が確認された。ヒラメから検出された *K. lateorablacis* は魚の死後筋肉融解(ジェリーミート)を起こすとされているが今回の検体では認められなかった。また、*U. seriolae* はシスト形成やジェリーミートを起こさないため、製品として販売される際に肉眼的に気付くことは困難と考えられた。

K. lateorablacis の顕微鏡検査で孢子の確認ができなかった理由として、*K. lateorablacis* の遺伝子量が 2.9×10^3 copy rDNA/g と少なかったことから、孢子自体が少ないことも考えられるが、原形質として存在し孢子を形成していなかった可能性も考えられる。*K. lateorablacis* はヒトへの病原性はないと考えられているが、国立医薬品食品衛生研究所に収集されている原因不明有症苦情事例ではヒラメの検体から検出されているため、今後も事例の積み重ねが必要と考える。同様に *U. seriolae* はカンパチやカンパチ喫食後の便からも検出されており、嘔吐、下痢との関連が示唆されているが現在のところ病原性や発症機序などは不明である。

有症苦情発生時、便中からの粘液胞子虫類の検出率は喫食から検体採取(排便)までの時間が 48 時間未満の場合は 66%、48 時間以上で 35%という報告もあり、できるだけ早く検体採取する方が望ましい。

当研究所においても粘液胞子虫類の検査体制を整備しているが、保健所が探知した時には症状

が回復しており検出が難しいのが現状である。過去に粘液胞子虫類が疑われる食中毒事例のうち、喫食残品と有症者便の両方から *U. seriolae* を検出可能であった事例は 1 事例である。有症者便から DNA を抽出する際、使用している抽出キットのプロトコールでは抽出時間が 70°C (もしくは 95°C) で 5 分間となっているが、今回の結果からビーズを併用し 95°C 10 分間の加熱を行うことで検出率が向上すると考えられる。粘液胞子虫類による関与が疑われる有症苦情事例は集団事例において探知されやすいが、今回の市場

調査においても粘液胞子虫類が検出されていることから家庭内においても発生している可能性が示唆される。

今回の市場調査は 7 月から 1 月にかけての調査であったため、年間を通した粘液胞子虫類の寄生状況を把握するため継続して調査を行っていき

たい。粘液胞子虫類の病原性については不明なことも多いことから、今後も保健所等と連携しながら積極的に有症苦情事例の検討を行い、関係機関に情報提供を行いながら調査を進めていく必要がある。

	温度(°C)	時間(分)	回収率(%)
ビーズなし	70	5	31.1
		10	10.9
		15	53.3
	95	5	12.2
		10	28.9
		15	15.3
ビーズあり	70	5	28.9
		10	62.2
		15	55.6
	95	5	31.1
		10	80.0
		15	66.7

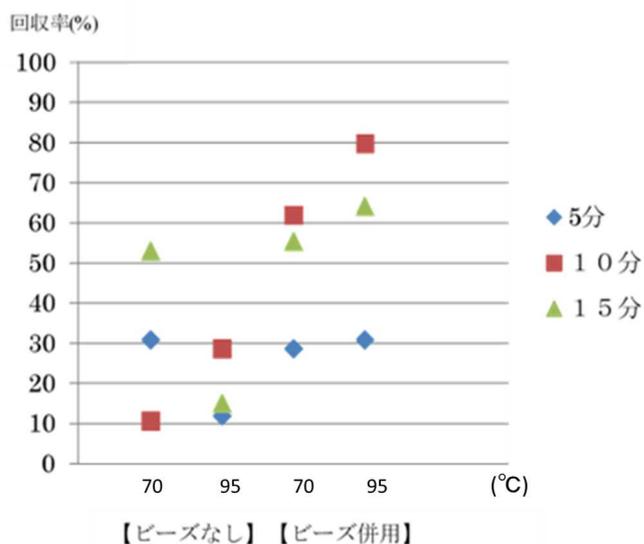


図 1 前処理方法の違いによる回収率について

参考文献

- 1) Detection of *Kudoa septempunctata* 18S Ribosomal DNA in patient Fecal Samples from Novel Food-Borne Outbreaks Caused by Consumption of Raw Olive Flounder. *Journal of Clinical Microbiology* September 2012 Vol50. No9
- 2) SSU rDNA analysis of *Kudoa rosenbuschi* (Myxosporea) from the Argentinean hake *Merluccius hubbsi*. *Diseases of Aquatic Organisms* Published April 18 vol.64:135-139,2005
- 3) *Unicapsula* species (Myxosporea: Trilosporidae) of Australian marine fishes, including the description of *Unicapsula andersenae* n.sp. in five teleost families off Queensland, Australia. *Parasitology Research* August 2013 vol.112:2945-2957
- 4) 野中紀鷹ら:「カンパチに寄生する粘液胞子虫類の実態調査」平成 29 年度全国食品衛生監視員研修会研究発表等抄録
- 5) 江藤良樹ら:「原因不明事例の患者糞便からの多殻目粘液胞子虫遺伝子の検出法」第 36 回日本食品微生物学会学術総会抄録