

Kudoa hexapunctata が原因と疑われた有症事例について

北橋智子、鈴木信一、東尾裕江、篠田亮子、大木旬子、三枝真奈美、都竹豊茂

(環境保健研究所 健康科学課)

要旨 千葉市内で開催された宴会において、食中毒が疑われる事例が発生した。患者の喫食状況及び症状等から、原因としてクドア属粘液胞子虫が疑われ、9名の患者便をリアルタイム PCR で検査したところ、*Kudoa septempunctata* が陰性、クドア属粘液胞子虫が2名の便で陽性であった。そこで、保存されていた刺身4検体について同様に検査を実施したところ、刺身1検体(メジマグロ)で *Kudoa septempunctata* が陰性、クドア属粘液胞子虫が陽性であり、鏡検により6極嚢を有するクドア属胞子虫が確認された。メジマグロから抽出した DNA について 28SrDNA のうち約 900bp をシーケンス解析した結果、*Kudoa hexapunctata* と同定された。クドア属粘液胞子虫の同定には 28SrDNA のうち約 3,250bp のシーケンス解析が用いられるが、約 900bp のみのシーケンス解析も有効であり、クドア種の迅速な同定が可能であることが明らかとなった。

Key Words : *K. hexapunctata*, シーケンス, BLAST, 系統樹, 28SrDNA

1. はじめに

ヒラメ等の鮮魚介類の喫食により食中毒を引き起こす *Kudoa septempunctata* (以下 KS) が、平成 23 年に食中毒の病因物質として指定され、平成 23 年 7 月 11 日に暫定検査法が、平成 28 年 4 月 27 日に検査法が通知¹⁾された。しかし、同様の症状を起こす有症事例として、KS 以外のクドア属粘液胞子虫 (以下 *Kudoa* spp.) が検出された事例も報告されている。

千葉市でも、平成 28 年 12 月に寄生虫による食中毒が疑われ、メジマグロから *Kudoa hexapunctata* (以下 KH) を検出したが、有症苦情として処理された事例が発生したので、KH の同定に有効であった検査方法等の概要について報告する。

2. 経緯

平成 28 年 12 月 7 日に、「会社の宴会後に下痢等の症状を呈した人が複数いる。」との通報が保健所に入った。調査したところ、喫食者 31 名のうち患者は 17 名 (うち 5 名の症状の詳細は不明) であった。従事者便 11 検体及び患者便 8 検体について、食中毒起因細菌及びウイルスの検索を実施したが、有意な病原体は検出されなかった。そこで、宴会メニューに刺身があったこと

から、遅れて回収された患者便 1 検体を加えた患者便 9 検体及び刺身 4 検体 (メジマグロ、カンパチ、スズキ、ネギトロ) について *Kudoa* spp. の検査を実施した。

3. 材料と方法

3.1 材料

患者便 9 検体、刺身 4 検体をリアルタイム PCR に供した。鏡検は刺身 4 検体について実施し、遺伝子によるクドア種の同定は *Kudoa* spp. が陽性となった検体に対して実施した。

3.2 リアルタイム PCR

①患者便からの DNA 抽出

QIAamp DNA Stool Kit (QIAGEN) を使用した。

②刺身からの DNA 抽出

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を使用した。

③KS のリアルタイム PCR

KS のリアルタイム PCR (以下 qPCR) には厚生労働省通知¹⁾のプライマーとプローブを使用した (表 1)。1tube あたり 20.0 μ L とし、16.0 μ L の qPCR 反応液 (最終濃度で 1 \times TaqMan Environmental Master Mix (Applied biosystems) \cdot 0.4 μ M 各プライマー \cdot 0.25 μ M TaqMan プローブ及び滅菌蒸留水) に抽出した DNA

4.0 μ L を加え、ABI7300 Real-time PCR system (Applied biosystems) により増幅反応を行った。反応条件は、50°C2 分と 95°C10 分の反応後、95°C15 秒と 60°C1 分の反応を 45 回繰り返した。食品の判定基準は前述の平成 28 年 4 月 27 日付け厚生労働省通知¹⁾に従い「*Kudoa* rDNA 10⁷ コピー/g 以上を陽性」とし、患者便については平成 26 年 5 月 26 日付け厚生労働省通知²⁾に従い「Ct 値 41 以下を陽性」とした。

④ *Kudoa* spp. の qPCR

Kudoa spp. の qPCR については Suzuki ら³⁾のプライマーとプローブを使用した (表 1)。1tube あたり 20.0 μ L とし、16.0 μ L の qPCR 反応液 (最終濃度で 1 \times TaqMan Environmental Master Mix (Applied biosystems) \cdot 0.9 μ M 各プライマー \cdot 0.25 μ M TaqMan プローブ及び滅菌蒸留水) に抽出 DNA 4.0 μ L を加え、KS の qPCR と同じ反応条件・機器で実施した。なお、qPCR の定量用コントロールとして国立医薬品食品衛生研究所から配布された KS の陽性コントロールプラスミドを使用した。食品及び患者便の判定基準は、KS の qPCR と同様とした。

3.3 鏡検

刺身 4 検体について、厚生労働省通知¹⁾に従って実施した。

3.4 遺伝子による同定

Kudoa spp. の qPCR で陽性となった検体について、その DNA をコンベンショナル PCR で増幅し、シーケンス後、NCBI サイトの BLAST により、登録されているクドア種との相同性を検索した。また、得られた塩基配列を MEGA6 を使用した系統樹解析 (Neighbor joining 法) により種を決定した。

コンベンショナル PCR は、Yokoyama ら⁴⁾のプライマーを使用した (表 2)。1tube あたり 50.0 μ L とし、45.0 μ L の RT-PCR 反応液 (TaKaRa EX Taq HS (タカラバイオ) 1.0U、最終濃度で 1 \times PCR Buffer \cdot 0.2mM dNTP \cdot 0.1 μ M 各プライマー及び滅菌蒸留水) に抽出 DNA 5.0 μ L を加え、94°C30 秒、56°C45 秒、72°Cで 1 分の反応を 30 回繰り返した。PCR 産物の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法により決定した。

4. 結果

聞き取り調査協力が得られた患者 12 名の潜伏時間を図 1 に、症状を図 2 に示した。患者 12 名中 8 名が食後 8~12 時間に発症していた。症状は、12 名全員に下痢の症状があり、吐気はあったものの嘔吐した患者はいなかった。潜伏時間及び症状は、*Kudoa* spp.を原因とした食中毒に合致していた。

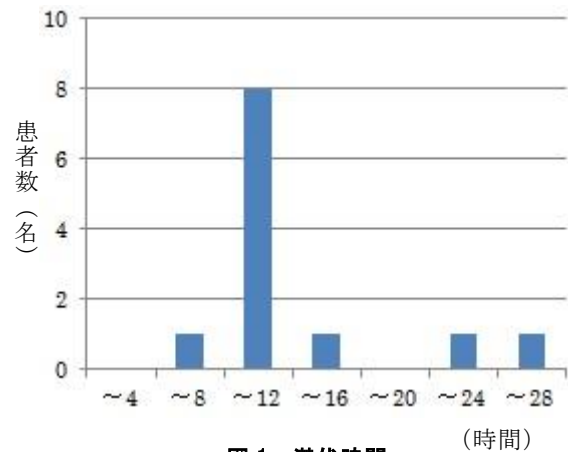


図 1 潜伏時間

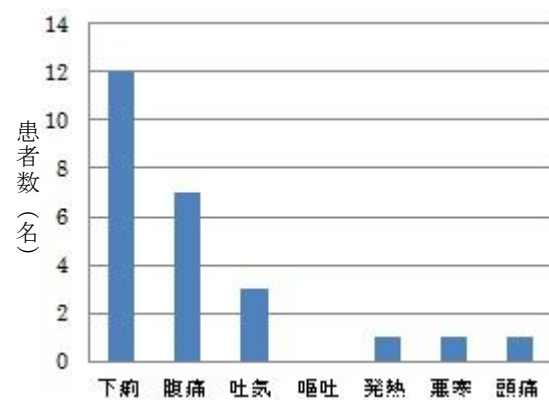


図 2 症状

鏡検の結果は、刺身 4 検体中 1 検体、メジマグロのみから 6 極囊のクドア属胞子 (7.0 \times 10⁵/g) を確認した (図 3)。

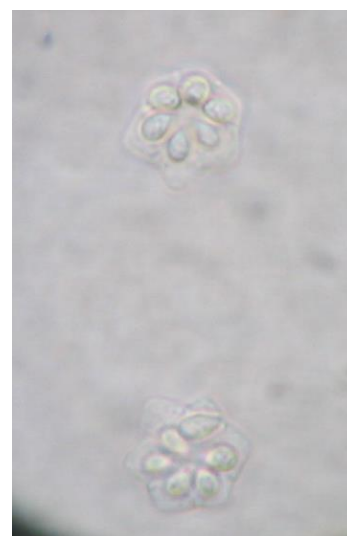


図 3 クドア属胞子

qPCR の結果を表 3 に示す。KS は患者便及び刺身の全てにおいて陰性であった。*Kudoa* spp.については、患者便 2 検体及び刺身 1 検体 (メジマグロ) が陽性であり、*Kudoa* rDNA はメジマグロ 9.4 \times 10⁷ コピー/g で

あった。他 3 種の刺身については、カンパチ 7.9×10^4 コピー/g、スズキ 1.0×10^5 コピー/g、ネギトロ 1.7×10^5 コピー/g であり、陰性の判定となった。

メジマグロから遺伝子を抽出し BLAST 検索したところ *K. hexapunctata* と 100%一致し、系統樹解析では *K. hexapunctata* と完全に一致した (図 4)。

なお、陽性を示した患者便 2 検体に関しては、Ct 値が 38.4 と 37.5 であったが、コンベンショナル PCR でバンドが検出されずシーケンス解析に至らなかった。

5. 考察

KS の検出においては、食品では平成 28 年 4 月 27 日付け厚生労働省通知¹⁾による KS に特異性が高いが他の *Kudoa* spp. も検出する可能性のあるプライマーが指定され、一方、便では参考として平成 26 年 5 月 26 日付け厚生労働省通知²⁾による KS に特異的なプライマーが通知された。今回のように、KS と *Kudoa* spp. と分ける場合、KS 検査には、便からの検出系 (KS に特異的なプライマー) を使用の方が判定に迷わないと思われた。

ヒトに食中毒症状を起こす 6 極囊のクドア属胞子は *K. hexapunctata* 及び *K. neothunni* が知られ、鏡検での判別は困難である。その判別には、28SrDNA のシーケンスによる系統樹解析が有効であり、28SrDNA では約 3,250bp をシーケンスする報告が多く見られる。しかし、野田ら⁵⁾の報告のとおり、この領域の 5'側に塩基配列の違いが集中しているため、当該 5'側の領域を含めた約 900bp の解析でも判別可能であった (図 5)。また、約 900bp 前後の塩基配列は遺伝子バンクの登録数が多いことから、約 3,250bp の解析に比べて、より多くのクドア属との配列解析が可能である。以上のことから約 900bp のシーケンス解析は、経費と時間の削減を可能とし、迅速に結果が得られることから、*Kudoa* spp. を疑う有症苦情事例の行政検査に有用であると思われた。

文 献

- 1) 厚生労働省, *Kudoa septempunctata* の検査法について, 平成 28 年 4 月 27 日, 生食監発 0427 第 3 号
- 2) 厚生労働省, 患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法 (参考) について, 平成 26 年 5 月 26 日, 事務連絡
- 3) Suzuki Jun, Murata Rie, Yokohama Hiroshi et al, Detection rate of diarrhea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters, Int J Food Microbiol, 194 : 2015, 1-6.
- 4) Yokoyama Hiroshi, Suzuki Jun, Shirakashi Sho, *Kudoa hexapunctata* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-description of *K. neothunni* in yellowfin tuna *T. albacares*, Parasitol Int, 63 : 2014, 571-579.
- 5) 野田万希子, 山口智博, 酢谷奈津 他, 食中毒・有症苦情事例のヒラメ及びマグロ検体から検出されたクドア属粘液胞子虫の形態学的特徴と遺伝子配列による種同定, 岐阜県保健環境研究所報, 24, 2016, 1-7.

表 1 リアルタイム PCR に使用したプライマー及びプローブ

検査	ターゲット	プライマー 及びプローブ	塩基配列 (5'→3')
Kudoa septempunctata 検出用 リアルタイム PCR (厚生労働省通知 ¹⁾)	18SrDNA	Kudoa-F	CATGGGATTAGCCCGGTTTA
		Kudoa-R	ACTCTCCCCAAAGCCGAAA
		Kudoa-P	FAM-TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA
クドア属粘液胞子虫検出用 リアルタイム PCR (Suzuki ら ³⁾)	18SrDNA	KuRT-F	TGGTGCATGGCCGTTCTTA
		KuRT-R2	TCGTTTCGTTACCGGAATAAACCT
		KuRT-P	FAM-TTGGTGGAGTGATCTGT-MGB-NFQ

表 2 コンベンショナル PCR に使用したプライマー

検査	ターゲット (バンド長)	プライマー名	塩基配列 (5'→3')
クドア属粘液胞子虫検出用 コンベンショナル PCR (Yokoyama ら ⁴⁾)	28SrDNA (約 900bp)	Myxo28S1F	AGTAACTGCGAGTGAAGCG
		Ku28R1	TCACGCATAGTTCACCATCT
	28SrDNA (約 2,370bp)	Myxo28S1F	AGTAACTGCGAGTGAAGCG
		Myxo28S3R	GAGCACTGGGCAGAAATC
	28SrDNA (約 3,250bp)	Myxo28S1F	AGTAACTGCGAGTGAAGCG
		Ku28R3	GCATTGCATCACTGGCCTAT

表 3 リアルタイム PCR の結果

	検体数	陽性検体数	
		<i>K. septempunctata</i>	<i>Kudoa</i> spp
患者便	9	0	2 (Ct 値:38.4、37.5)
刺身	4	0	1 (コピー数:9.4×10 ⁷ コピー/g)

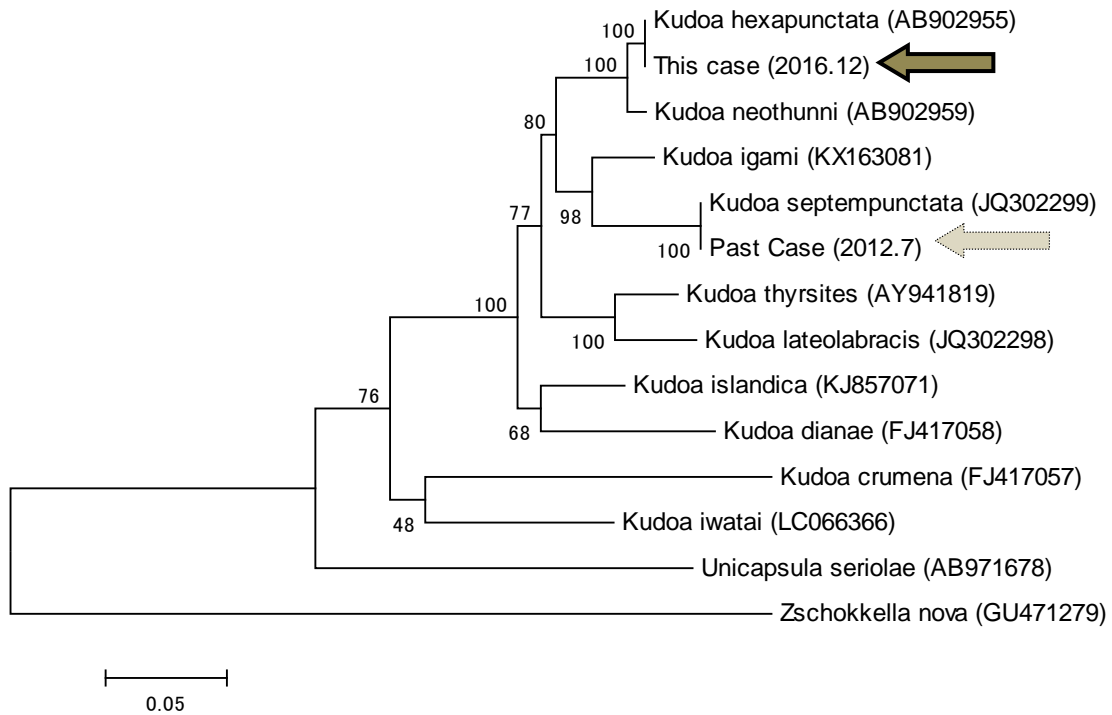


図4 28SrDNAの一部(約900bp)の塩基配列による系統樹解析

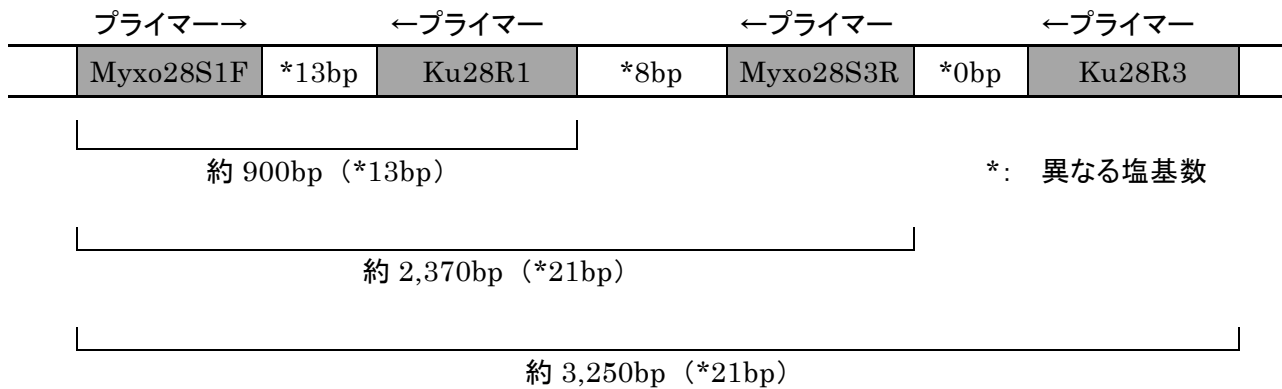


図5 28SrDNAの増幅長による *K. hexapunctata* と *K. neothunni* の塩基配列の違い