

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07722

研究課題名(和文) クドア食中毒の迅速発症に免疫介在性機序が関与している可能性の実験的検証

研究課題名(英文) Experimental demonstration of the involvement of immune-mediated mechanism(s) for rapid manifestation of Kudoa food poisoning after consumption of raw fish

研究代表者

佐藤 宏 (Sato, Hiroshi)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90211945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：クドア食中毒は、Kudoa属粘液胞子虫が寄生した生鮮海産魚を喫食した人で発症する疾患である。原因食の喫食4-19時間(平均5時間)後に下痢や嘔吐が発症することが疫学研究から示され、その発症までの潜伏期間の短さについて解明することを目的に本研究は開始された。生活環が未解明で実験室維持できないKudoa粘液胞子虫について、実験室での解析に必要な胞子を確保できる天然魚を網羅的に探索した。宮古島周辺海域で水揚げされたテングハギからの*K. thalassomi*、タイワンブダイ、ツユベラ、シロタスキベラでのKudoa *igami*寄生は重度であり、安定して多くの胞子を確保できる天然魚として特定できた。

研究成果の概要(英文)：'Kudoa food poisoning' was newly recognized in 2011 as a human disease manifested by diarrhea and vomiting after consumption of fresh marine fish with Kudoa spores. Since pre-symptomatic time is 4 to 19 (average 5) hours after raw fish consumption, not only mechanical destruction of the epithelium of gastrointestinal mucosa, but also immune-mediated deterioration of mucosal lesion(s) might be suspected. To carry out laboratory demonstration using model systems, abundant numbers of Kudoa spores should be prepared. To find such sources of spores, commercially available marine fish were checked widely, and at last 12 known species and five new species were isolated from marine fish around Japan. It is finally concluded that bluespine unicornfish with Kudoa *thalassomi*, Carolines parrotfish, African coris, and Pasterl ringwrasse with Kudoa *igami*, all of which were fished in the sea around Miyako Island, Okinawa, could provide sufficient number of Kudoa spores for laboratory uses.

研究分野：寄生虫学

キーワード：Kudoa food poisoning クドア食中毒 marine fish 海産魚 Myxozoa ミクソゾア Myxosporea 粘液胞子虫

1. 研究開始当初の背景

クドア食中毒は、生鮮海産魚(刺身や寿司)喫食に関わる原因不明食中毒様症状事例の頻発を受けて発足した研究班により、従来は人体への病原性はないとされてきた *Kudoa* 属粘液胞子虫の人体消化管上皮破壊による食中毒として 2011 年に認定された。症状は一過性下痢と嘔吐を主徴とし、集団食中毒事例の発生時には、ヒラメ体側筋に寄生する *Kudoa septempunctata* の感染の有無が厚労省通知により義務化された (Sugita-Konishi et al. 2014)。その後、マグロやその他の海産魚においても、その固有のクドア種寄生が食中毒を引き起こす可能性が示唆されてはいるが、また、その発症機序解明が進んでいないこともあり、病原性を明確に論じるには至っていない。クドア食中毒で海産魚寄生が問題となる *Kudoa* 属粘液胞子虫は、2016 年末段階で世界的に 108 種が記載され、日本での食用海産魚からはそのうち 26 種が確認されている。

2. 研究の目的

クドア食中毒は、*Kudoa septempunctata* (ヒラメ寄生) をはじめとする粘液胞子虫が寄生した生鮮魚の喫食にとともに、食後 4-19 (平均 5) 時間後に下痢や嘔吐が引き起こされることが疫学研究から示されている。下痢の発症には、消化管上皮に接着した胞子から放出された原形質体細胞が宿主上皮を貫通することで引き起こされる上皮組織破壊が主要な原因と推測されているが、極めて短い潜伏期間 (平均 5 時間) を説明するためには何らかの他の要因が関与している可能性が高い。また、クドア食中毒の集団発症事例では、同程度の胞子経口摂取数にも関わらず、発症者と非発症者が見られることがある。このことから、他の要因が関わる可能性が示唆される。日本人は刺身や寿司の喫食をとおして日常的にクドア抗原への暴露機会をもつことから、クドア食中毒の発病機序に免疫機序が関わっている可能性を考えると、クドア食中毒の迅速発症も説明ができる。この推測を実験的に証明したいと本研究を計画した。

3. 研究の方法

本研究では実験的なクドア食中毒モデルを構築するために、免疫感作や動物実験において使用するクドア胞子、あるいは *in vitro* 系での観察に用いるクドア胞子の確保が重要な前提条件となる。日本近海で水揚げされ、本目的に適った入手可能な感染魚について確認する。

確保できたクドア胞子を用いた実験モデルでの実証的研究により、クドア粘液胞子虫の原形質体(感染細胞と)と宿主細胞/組織との相互作用を *in vitro* 培養系での観察、実験動物モデルを用いた *in vivo* での相互作用の観察、粘液胞子虫アレルゲン暴露による実験動物モデルでの IgE 抗体産生誘導と、クドア

胞子投与実験モデルでの特異的 IgE 介在性組織破壊の誘導実験を行う。

4. 研究成果

実験観察に用いるクドア胞子の入手先を確保するために、国内で入手できる生鮮海産魚について網羅的探索を進めた。この研究のなかで、クドア粘液胞子虫に関わるいくつかの重要な新事実が確認され、下記のように学術誌での論文公開、あるいは学会発表として成果発表も行った。主要点をまとめると、以下のとおりである。

1) マゴチやマアジなど近海魚での *Kudoa iwatai* や *Kudoa trachuri* などシスト形成する種は散発的に検出される。文献検索において、生鮮マゴチの喫食による食中毒事例が、生鮮ヒラメ喫食による食中毒可能性の報告以前に記録されていることが判明した (Kasai et al. 2015)。

2) 三陸沖で水揚げされたメカジキで死後筋肉融解現象を引き起こす種として *Kudoa musculoliquefaciens* が記載 (Matusmoto 1954) されているが、その詳細は不明であった。また、アラスカ産シマホッケで死後筋肉融解現象を起こす種については、*K. musculoliquefaciens* に類似した胞子をもつことと事例発生の簡単な報告のみで寄生虫学的な観察はなかった。両者の比較検討を行い、別種を原因とする市販魚の死後筋肉融解現象であることを明らかにした (Kasai et al. 2016a)。北海道近海産のホンホッケでも、アラスカ産シマホッケと同一種の寄生が確認されたが、寄生率は 50% と高いが、寄生密度は低いことも明らかにした。本種は、*Kudoa pleurogrammi* として新種報告した (Kasai et al. 2016a)。

3) カワハギ科の魚は、2 種混合養殖の候補として、あるいは生鮮魚としての新たな消費を目指した海産魚養殖の有望な候補魚として位置づけられてきた。カワハギ、ウマヅラハギなど西日本各地で水揚げされたカワハギ科魚類 4 種 75 尾を検査し、ヒラメ以外から初めて *K. septempunctata* の寄生をウマヅラハギで確認した (Kasai et al. 2016b)。また、*Kudoa thyrsites* や *Kudoa shiomitsui* などヒラメで寄生報告のある種が同様にカワハギ科魚類で確認された。ウマヅラハギ寄生の *Kudoa parathyrsite* を新種報告した (Kasai et al. 2016b)。

4) 高知県沖で水揚げされたタカノハダイ筋肉にシードシスト形成して寄生する *Kudoa whippsi* を豪州近海以外で初めて検出した (Kasai et al. 2017a)。また、有明海産のハゼクチ体側筋に寄生する *Kudoa akihiotoi* と *Kudoa empresmichikoe* を新種記載した。

5) 日本で消費されるクロマグロ(市販段階ではヨコワと表示)やキハダマグロに寄生する *Kudoa hexapunctata*、*Kudoa neothunni*、シスト形成して寄生する *Kudoa thunni* について、詳細な rDNA 塩基配列の特徴づけを行った (Kasai et al. 2017b)。

6) 日本近海産のサワラの体側筋にシュードシスト形成して寄生する種は6極嚢で、マグロ寄生種の孢子とも類似性が高い。本種について、*Kudoa konishiae* として新種記載するとともに、6極嚢孢子を特徴とする種間で明確な種鑑別ができる塩基配列マーカーとしてミトコンドリアDNAのcox-1遺伝子の有用性を報告した(Sakai et al. 2018)。

7) 2017年6月に沖縄県宮古島近海で水揚げされたテングハギでの*Kudoa thalassomi* 寄生、タイワンブダイ、ツユベラ、シロタスキベラでの*Kudoa igami* 寄生は重度であり、また、それぞれの種記載において標準的とされた極嚢数とは明らかに異なる極嚢数をもつ孢子が特徴となることを確認した(坂井ら, 2018学会発表)。

8) 研究最終年度になって、安定して多くの孢子を確保できる天然魚を特定できた。*Kudoa* 属粘液孢子虫の生活環は未知で、実験室で維持した寄生虫を実験観察に回すことができない。今後、引き続き、当初の研究課題に沿った研究展開を図っていきたい。一方、研究材料確保のために行った網羅的な市販魚の調査研究から、国内で消費される海産魚に26種の*Kudoa* spp.の寄生があることを明らかにし、そのうち5種は本研究の一環として新種記載された(佐藤・笠井 2016)。また、詳細不明であった既知種についても豊富なデータによる特徴づけを行い、今後の研究に寄与できる成果をあげた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Sakai H, Kato E, Sakaguchi S, Setsuda A, Sato H: Morphological and molecular genetic characterization of *Kudoa konishiae* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) in the muscle of Japanese Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). Parasitol Res 117: 893-904; 2018. 【査読あり】
[DOI: 10.1007/s00436-018-5770-5]
2. Jinnai M, Kawai T, Harada T, Nishiyama Y, Yokoyama H, Shirakashi S, Sato H, Sakata J, Kumeda Y, Fukuda Y, Ogata K, Kawatsu K: Production of a novel monoclonal antibody applicable for an immunochromatographic assay for *Kudoa septempunctata* spores contaminating the raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int J Food Microbiol 259: 59-67; 2017. 【査読あり】
[DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.003]
3. Kato E, Kasai A, Tomochi H, Li Y-C, Sato H: Four *Myxobolus* spp. (Myxosporea: Bivalvulida) from the gill lamellae of common carp (*Cyprinus carpio*) and Japanese silver crucian carp (*Carassius langsdorfii*) in the western part of Japan, with the description of three new species (*M. tanakai* n. sp., *M. para-toyamai* n. sp., and *M. ginbuna* n. sp.). Parasitol Res 116: 2427-2441; 2017. 【査読あり】
[DOI: 10.1007/s00436-017-5545-4]
4. Kasai A, Tsuduki H, Jimenez LA, Li Y-C, Tanaka S, Sato H: Incidence of three *Kudoa* spp., *K. neothunni*, *K. hexapunctata*, and *K. thunni* (Myxosporea: Multivalvulida), in *Thunnus* tunas distributed in the western Pacific Ocean. Parasitol. Res. 116: 1137-1150; 2017. 【査読あり】
[DOI: 10.1007/s00436-016-5369-7]
5. Kasai A, Setsuda A, Sato H: Morphological and genetic characterization of *Kudoa whippsi* (Myxosporea: Multivalvulida) from *Cheilodactylus zonatus* in the western Pacific Ocean off Japan, and two new *Kudoa* spp. (*K. akihittoi* n. sp. and *K. empessmichikoeae* n. sp.) from *Acanthogobius hasta* in the Sea of Ariake, Japan. Parasitol Res 116: 647-659; 2017. 【査読あり】
[DOI: 10.1007/s00436-016-5329-2]
6. 佐藤 宏, 笠井亨浩: 日本ならびにその近海で記録されたクドア属粘液孢子虫(1930~2016). 獣医寄生虫誌 15: 111-138; 2016. 【査読あり】
[http://jsvp.umin.jp/archive-j/JJVP15-2_PP111-138.pdf]
7. Sekiya M, Setsuda A, Sato H, Song K, Han J-K, Kim G-J, Yeo IK: *Enteromyxum leei* (Myxosporea: Bivalvulida) as the cause of myxosporean emaciation disease of farmed olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) and a turbot (*Scophthalmus maximus*) on Jeju Island, Korea. Parasitol Res 115: 4229-4237; 2016. 【査読あり】
[DOI: 10.1007/s00436-016-5200-5] 【査読あり】
8. Kasai A, Li Y-C, Mafie E, Sato H: New host records of monacanthid fish for three *Kudoa* spp. (*K. septempunctata*, *K. thyrssites*, and *K. shiomitsui*) prevalent in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), with the description of *K. parathyrssites* n. sp. from a black scraper (*Thamnaconus modestus*). Parasitol Res 115: 2741-2755; 2016. 【査読あり】
[DOI: 10.1007/s00436-016-5023-4]
9. Kasai A, Li Y-C, Mafie E, Sato H: Morphological and molecular genetic characterization of two *Kudoa* spp., *K. musculoliquefaciens*, and *K. pleurogrammi* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), causing myoliquefaction of commercial marine fish. Parasitol Res 115: 1883-1892; 2016. 【査読あり】
DOI: 10.1007/s00436-016-4928-2
10. Kasai A, Li YC, Setsuda A, Mafie E, Sato H:

Genetic characterization of *Kudoa iwatai* and *Kudoa trachuri* in commercial marine fish (*Platycephalus* sp. and *Trachurus japonicus*) for human consumption. Jpn J Vet Parasitol 14: 22-30; 2015. 【査読あり】
[http://jsvp.umin.jp/archive-j/JJVP14-1_pp2_2-30.pdf]

〔学会発表〕(計6件)

1. 坂井晴哉、説田景、柳田哲矢、佐藤宏: 日本近海魚から新たに得た7-9殻片/極嚢の胞子を特徴とするクドア3種: *Kudoa yasunagai*, *Kudoa thalassomi*, *Kudao igami*. 第87回日本寄生虫学会、2018年3月17日~18日、国立医療研究センター(東京都新宿区)
2. 友知久幸、笠井亨浩、関谷麻里子、説田景、柳田哲矢、佐藤宏: 高知県産イトヨリダイから検出した未知の多殻目 *Unicapsula* 種について. 第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月13日~15日、鹿児島大学(鹿児島市)
3. 笠井亨浩、友知久幸、坂井晴哉、説田景、柳田哲矢、佐藤宏: 山口県産ならびに鹿児島県産サワラから検出した未知の多殻目 *Kudoa* 種について. 第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月13日~15日、鹿児島大学(鹿児島市)
4. 加藤英悟、坂口星帆、笠井亨浩、説田景、柳田哲矢、佐藤宏: 山口市内のウナギから検出された双殻目粘液胞子虫5種. 第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月13日~15日、鹿児島大学(鹿児島市)
5. Mariko Sekiya, Aogu Setsuda, 佐藤宏, Kicheon Song, JunKyun Han, GyeongJu Kim, InKyu Yeo: Myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in farmed olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) and a turbot (*Scophthalmus maximus*) on Jeju Island, Korea. 第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月6日~8日、日本大学 生物資源学部(藤沢市)
6. 笠井亨浩、Eliakunda Mafie, Fatema Hashem Rupa、説田景、佐藤宏: 日本近海の天然魚タカノハダイとハゼクチからのクドア粘液胞子虫3種の検出. 第159回日本獣医学会学術集会、2016年9月6日~8日、日本大学 生物資源学部(藤沢市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 宏 (SATO, Hiroshi)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号: 90211945

(2)研究分担者

柳田 哲矢 (YANAGIDA, Tetsuya)
山口大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号: 40431837