

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580259

研究課題名(和文)天然魚のクドア属粘液胞子虫による食中毒のリスク評価

研究課題名(英文) Risk assessment of food poisoning caused by myxosporeans of the genus Kudoa in wild fishes

研究代表者

横山 博 (YOKOYAMA, Hiroshi)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70261956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒラメ寄生粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* による食中毒が問題になっているが、他のクドアについても人への毒性が疑われている。天然海産魚に寄生する *Kudoa iwatai* は宿主によって感受性が異なり、寄生率ではキチヌが高く、シストの成熟度や胞子の生残率ではスズキが高かったが、毒性を証明するには至らなかった。メジマグロ(クロマグロの幼魚)に寄生する種類を *Kudoa hexapunctata* として新種記載した後、ヒト腸管培養細胞(Caco-2細胞)に対する毒性を確認し、毒性が発現する胞子数、胞子が失活すると考えられる冷凍・冷蔵条件などから、食中毒リスクについて検討した。

研究成果の概要(英文)：Food poisoning caused by *Kudoa septempunctata*, a myxosporean infecting the muscle of olive flounder *Paralichthys olivaceus*, has been a problem in Japan. Recently, other *Kudoa* spp. has been also suspected to be aetiological agents of food poisoning in humans. Prevalence of infection with *Kudoa iwatai* was relatively high in yellowfin seabream *Acanthopagrus latus*, whereas maturity of cysts and viability of spores were high in Japanese seabass *Lateolabrax japonicus*. Toxicity of *K. iwatai* could not be demonstrated in Caco-2 cell monolayer permeability assay. On the other hand, toxicity of *Kudoa hexapunctata*, a newly described species from juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*, to Caco-2 cells were shown. Risk assessment of *K. hexapunctata* was made based on some information of spore dose with toxic effects on Caco-2 cells and treatment conditions inactivating the spores.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病 食中毒 寄生虫 粘液胞子虫 クドア キチヌ クロマグロ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生鮮魚介類を摂食後、数時間以内に一過性の下痢や嘔吐を呈する食中毒が増加していたが、2011年4月、厚生労働省で開催された薬事・食品衛生審議会において養殖ヒラメに寄生する粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が原因であると発表された。その後、厚労省を中心とするグループが流通・消費段階での対策、水産庁や東大(申請者)を中心とするグループが生産段階での対策の開発を目的として研究が行われ、その成果をもとに実効が上がりつつある。

しかし最近、ヒラメ以外の魚種に寄生する他のクドア属粘液胞子虫でも食中毒の原因になっているのではないかと疑われている。たとえば、キチヌやスズキなど数種の天然海産魚の筋肉に寄生して径1mm前後の白い球状シストを作る *Kudoa iwatai* や、メジマグロ(クロマグロの幼魚)の筋肉に寄生して偽シスト(筋繊維の細胞内に寄生するため肉眼では判別できない)を形成する *Kudoa sp.* が「原因不明食中毒」事例の残品から検出されている。そこで、これらのクドアについての生物学的、生態学的特性を調べると同時に、人に対する毒性の有無を実験的に検討し、食中毒のリスクを定量的に解析する必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) クドア寄生の実態調査: 食中毒に関与することが疑われている *K. iwatai* と *Kudoa sp.* について、寄生の実態調査を行うことで、それぞれのクドアの生物学的、生態学的特徴を調べる。*K. iwatai* については、浜名湖で漁獲される天然魚を材料とし、定期的にサンプリング検査することで、寄生に季節性があるかどうか、魚種により感受性の違いがあるかどうかを調べる。

*Kudoa sp.* については、まず形態と遺伝子解析により分類学的位置づけを明らかにして種の同定を行う。その後、各地で漁獲される天然マグロ類および養殖クロマグロの幼魚を集め、寄生の季節性や地理的分布についての知見を集積する。

以上の結果から、寄生の高い時期や漁獲場所および魚種を回避することで *Kudoa spp.* による食中毒リスクを減らすことができるかどうかを検討する。

(2) クドアの毒性評価: *K. iwatai* と *Kudoa sp.* の人への毒性について、ヒト腸管培養細胞(Caco-2細胞)を用いた *in vitro* 試験により検証する。Caco-2細胞は分化すると腸管上皮細胞特有のタイトジャンクションを形成し細胞同士が密着するので、細胞層の両側で物質の透過性が妨げられ電気抵抗が発生する。ここに何らかの要因が加えられて物質の透過性が亢進されると(すなわち下痢状態)、電気抵抗が低下する。この経上皮電気抵抗値(TER)の変化を調べることで、クドアの毒性

を定量的に測定する。そこで、*K. iwatai* と *Kudoa sp.* の毒性評価系を標準化し、食中毒を起こす危険性がある孢子摂取量の閾値を推定する。

(3) リスク解析: (1)の野外調査と(2)の毒性試験の結果より、漁獲から流通、消費に至るまでの過程で、天然魚によるクドア食中毒に関与するリスク因子を解析し、食中毒を防止する対策を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) クドア寄生の実態調査

*K. iwatai* の調査: 浜名湖で漁獲されるキチヌ、スズキ、クロダイを定期的に採集して、調査材料とする。魚体を三枚卸した後、体側筋肉中にみられるシストの魚体内分布、シストの数(寄生強度)、シストの保有率(寄生率)、シスト1個あたりの孢子数を測定する。また、シストを病理組織学的に観察して、シストの成熟度や宿主反応を調べる。さらに、孢子を新鮮な状態で採集して、蛍光色素(Hoechst 33342 & Propidium iodide)を用いた生体染色法により、孢子の生残率を測定し、シストの成熟度との関係を推定する。

*Kudoa sp.* の調査: 各地で漁獲される天然マグロ類および養殖クロマグロ幼魚を採集して、調査材料とする。まず、*Kudoa sp.* 孢子の形態学的特徴と遺伝子(18S および28S rRNA 遺伝子)の解析を行い、分類学的位置を決定する。クロマグロの肉に寄生するクドアを定量化する方法(実体顕微鏡による簡易法、光学顕微鏡により孢子密度を測定する方法、定量PCRにより遺伝子量を測定する方法)を標準化する。養殖クロマグロの同一魚群を定期的にサンプリングし、寄生率や寄生強度の変化を時系列的に追跡する。

(2) クドアの毒性評価: MEM 培地等で継代維持したCaco-2細胞を、細胞培養プレートのウェルにセットしたセルカルチャー・インサート内で培養して、細胞分化を誘導する。魚肉から精製したクドア孢子をCaco-2細胞に接種し、TERをミリセル抵抗値測定システムによって測定する。TERの経時変化を観察して、接種孢子数や判定時間等の条件を確立する。標準化された実験系を用いて、食中毒を起こす孢子数の閾値を推定する。

## 4. 研究成果

### (1) クドア寄生の実態調査

*K. iwatai* の調査: 浜名湖の魚市場で水揚げされた天然魚(キチヌ、スズキ、クロダイ)を2012年3月~9月の間は毎月10尾ずつ、2013年6月から2014年11月の間は不定期に8回、毎回3~33尾ずつ、採集して検査した。その結果、キチヌにおける寄生率が42~100%ともっとも高く、際立った季節性はみられなかった。平均寄生強度は約30個/尾、

平均シスト径は約 1.5 mm で期間中あまり変動しなかった。また魚体サイズや年齢と寄生との関係は認められなかった。スズキとクロダイは寄生率も寄生強度もキチヌより低く、季節性はみられなかった。

病理組織学的観察により、シスト内部にまだ発育途中の栄養体が観察される「未成熟シスト」、シストが胞子で充満した「成熟シスト」、シスト中央部の胞子に変性して染色性を失い形態的に崩壊している「変性シスト」の3段階に分類された(図1)。

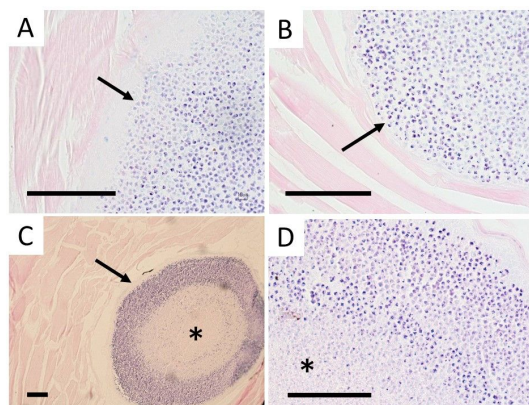


図1. キチヌの筋肉に寄生する *Kudoa iwatai* のシストの組織切片(ギムザ染色)。バーは100  $\mu$ m。A: 未成熟シスト、B: 成熟シスト、C: 変性シスト、D: 変性シストの辺縁部の拡大。矢印はシスト壁、星印は変性部位を示す。

このシストの成熟段階を魚種別にみると、キチヌでは変性シストが多く(60%)、次いで成熟シスト(22%)がみられたが、スズキでは成熟シスト(65%)、変性シスト(29%)の順でみられた。

胞子の生残率は、キチヌではシストの発育段階で異なり、未成熟シストで82%、成熟シストで61%、変性シストで34%の順であった。一方、スズキでは、成熟シスト(82%)と変性シスト(86%)の間では大差なかったが、未成熟シスト(66%)は低かった。

すべてのサンプルの平均では、スズキよりキチヌの方が変性シストの割合が多く、胞子の生残率が低かったが、時期によっては差がないこともあった。また、クロダイはサンプル数が少なかったものの、スズキと同様、成熟シストの割合が多く、胞子の生残率が高い傾向にあった。

以上の結果から、*K. iwatai* のシストは、キチヌでは発育段階を経るごとに胞子の生残率が低下して死んでいくことが示され、*K. iwatai* にとってキチヌは生活環を完結できる宿主ではないことが示唆された。また、成熟シストの割合が多いスズキの方がキチヌよりも人への毒性が高いと推察された。

*Kudoa* sp.の調査: メジマグロから分離された *Kudoa* sp.とキハダ由来の *Kudoa neothunni* を形態学的に比較した結果、胞子殻の尖り具

合を表す指標(胞子の縫合面の幅/胞子幅(%))と側面観の形態において、明らかに区別できた(図2)。*Kudoa* sp.は胞子の縫合面の幅/胞子幅の値が70%以上であり、上面観において丸型、側面観において辺縁部が丸みを帯びているのに対して、*K. neothunni* は胞子の縫合面の幅/胞子幅の値が70%以下で、上面観において尖り型、側面観において辺縁部が尖って伸長していた。

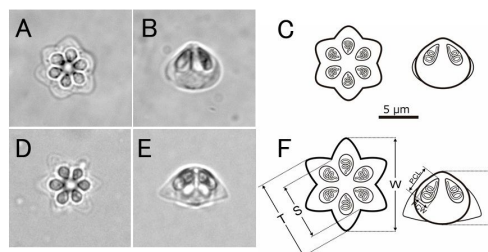


図2. クロマグロの *Kudoa hexapunctata* (A-C) とキハダの *K. neothunni* (D-F) の胞子のウェットマウント写真と模式図。W は胞子幅、S は縫合面の幅、T は胞子の厚さ (Yokoyama et al., 2014)。

また、両者は28S RNA 遺伝子の塩基配列においても明確にクラスターが分かれた。さらに *K. neothunni* の宿主はキハダのみでジェリーミートを呈するのに対して、*Kudoa* sp.はクロマグロとキハダに寄生しジェリーミートを呈さないという違いも確認された。以上の差異から、今回の *Kudoa* sp.を *Kudoa hexapunctata* (ムツボシクドア)と命名し、新種記載した。

さらに別の調査で、天然ブダイの筋肉から極嚢を6個有する類似のクドアが発見されたが、形態観察と遺伝子解析により別種であると結論付けられ、*Kudoa igami* として新種記載した。

*K. hexapunctata* の寄生強度を定量化する方法について、肉片をガラス板の間で押し潰して偽シストを実体顕微鏡下で観察し半定量的に(+~++++)評価する簡易法、肉片をスチールメッシュとナイロンメッシュ(セル・ストレーナー)でろ過後、血球算定盤で胞子密度を測定する方法、18S rRNA 遺伝子を標的とした定量PCR法を標準化した。

各地で漁獲された天然マグロ類および養殖クロマグロの検査をした結果、長崎、高知、青森産クロマグロ、さらに太平洋やインド洋で漁獲されたクロマグロやキハダから *K. hexapunctata* が検出された。筋肉1gあたりのコピー数は $10^6 \sim 10^{10}$ とバラつきがあったが、サンプル数が少ないため、地理的分布の傾向や季節性は認められなかった。

## (2)クドアの毒性評価

*K. iwatai* については、キチヌ、スズキ、クロダイ由来株を $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  胞子/well をCaco-2細胞層に接種したが、TERの変化は認められず、毒性は確認できなかった。同時期

の孢子生残率やシストの成熟度は検査しなかったが、変性シストから採集した活性の低い孢子を使用したために毒性が認められなかったのではないかと推測された。

*K. hexapunctata* については、 $5 \times 10^7$  孢子/well を接種したときに、ヒラメの *K. septempunctata* より3時間遅れてTERの減少が確認された(図3)。毒性顕在化の時間的遅れは、実際の患者に見られる潜伏時間の違いとも一致するよう思われた。

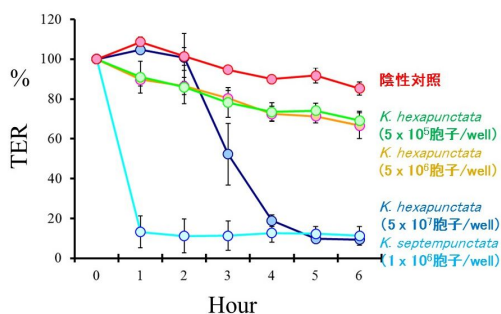


図3. Caco-2 試験におけるTERの変化。赤は陰性対照(培地のみ接種)、緑、黄、青は、*K. hexapunctata* 孢子を、それぞれ $5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^7$  個/well 接種、水色は *K. septempunctata* 孢子を  $1 \times 10^6$  個/well 接種した。

今回の実験では、*K. septempunctata* より50倍量の孢子を接種したときに初めてTERの減少が見られたことから、*K. septempunctata* より50倍毒性が低いことが示唆された。なお、ブダイから見つかった *K. igami* についてもCaco-2 試験を行ったが、毒性は確認されなかった。

また、冷凍保存した *K. hexapunctata* 孢子を接種してもTERは下がらなかったことから、冷凍処理により不活化できることが示された。また、*K. hexapunctata* 孢子を精製して1週間冷蔵保存後に接種した実験では毒性がみられなかったことから、孢子の毒性は冷蔵でも短期間に失われることが示唆された。

### (3) リスク解析

*K. iwatai* の毒性をCaco-2 試験では証明できなかったため、食中毒を起こす孢子数の閾値やシスト数を特定することはできなかった。寄生率や寄生強度ではキビレが高く、シストの成熟度や孢子の生残率ではスズキが高いことが分かったものの、現時点ではどちらの魚種の方がリスクが高いとは断定できない。いずれにしろ、*K. iwatai* はシストが肉眼的に見えるため、シストが確認されたら除去することが推奨される。

*K. hexapunctata* が食中毒を起こす孢子数の閾値を特定することはできなかったが、毒性は *K. septempunctata* より50倍程度弱いことが示唆された。しかし、人の喫食量はヒラメよりマグロの方がかなり多いと予想されるの

で、筋肉1gあたりの孢子密度としては、*K. septempunctata* と同レベル( $1 \times 10^6$  孢子/g)にまで注意しておいた方がよいかもしれない。事実、2009年から2012年までに東京都内で発生したマグロ関連食中毒事例の残品から検出された *K. hexapunctata* の孢子密度は、おおむね  $10^6 \sim 10^7$  孢子/g のレベルであること (Suzuki et al., 2015) から、その推定は妥当であると考えられる。

*K. hexapunctata* 孢子は、冷凍または1週間の冷蔵保存により失活する可能性が示された。これらの処理はマグロの成魚であれば実施可能であるが、メジマグロの場合は肉質に悪影響があると考えられる。魚体の成長とともに孢子密度が減少するという観察結果から、あるサイズ以下のメジマグロはなるべく避けるように注意喚起する方策が現実的かもしれない。

今後、*K. hexapunctata* が食中毒を起こす孢子数の閾値を特定したうえで、孢子を失活させる現実的な条件検討および食中毒を起こす孢子密度を下回るようになる魚体サイズまたは年齢の特定をすることで、食中毒リスクの低減対策を確立する必要がある。

### 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 3件)

Suzuki J., Murata R., Yokoyama H., Sadamasu K., Kai A. Detection rate of diarrhoea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters. International Journal of Food Microbiology, 査読有、194巻、2015、1-6  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.001>

Yokoyama H., Suzuki J., Shirakashi S., *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*. Parasitology International, 査読有、63巻、2014、571-579  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.03.006>

Shirakashi S., Yamane K., Ishitani H., Yanagida T., Yokoyama H., First report of *Kudoa* species in the somatic muscle of the Japanese parrotfish *Calotomus japonicus* (Scaridae) and a description of *Kudoa igami*, n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida). Parasitology Research, 査読有、113巻、2014、2515-2524  
 DOI 10.1007/s00436-014-3901-1

[学会発表](計 5件)

横山 博、クドア属粘液孢子虫の生物学、第30回生態学・疫学談話会、2015年3月20

日、杏林大学三鷹キャンパス（東京都・三鷹市）

横山 博・鈴木 淳・船隈奈緒子・小林彰子、クロマグロの筋肉寄生ムツボシクドアの毒性試験、第 35 回日本食品微生物学会学術総会、2014 年 9 月 19 日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス（大阪府・堺市）

Hiroshi Yokoyama, Jun Suzuki, Sho Shirakashi, A new species of *Kudoa* (Myxozoa) from the somatic muscle of Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis* possibly associated with food poisoning in humans, 13<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, August 13, 2014, Hotel Camino Real, Mexico City (Mexico)

横山 博・白樫 正、海産魚の筋肉に寄生する多殻目粘液胞子虫の多様性、第 73 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2013 年 10 月 12 日、国立科学博物館上野本館（東京都・台東区）

山根弘士・白樫 正・横山 博・石谷浩江・柳田 哲矢、ブダイにおけるクドア属粘液胞子虫の寄生、平成 25 年度日本魚病学会秋季大会、2013 年 9 月 18 日、三重大学生物資源学部（三重県・津市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 博 (YOKOYAMA, Hiroshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70261956

### (2) 研究分担者

白樫 正 (SHIRAKASHI, Sho)

近畿大学・水産研究所・講師

研究者番号：70565936