

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04540

研究課題名(和文) 食中毒の原因になる不顕性感染型クドア属粘液胞子虫のリスク評価

研究課題名(英文) Risk assessment of kudoid myxozoans showing asymptomatic infection causing a foodborne disease

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(農学部)・助教

研究者番号：70261956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒラメに寄生する粘液胞子虫ナナホシクドアと同様、不顕性感染型クドアと人間の食中毒との関連が疑われている。本研究では、メジマグロのムツボシクドアの寄生実態を調査し、マグロ満1歳未満の幼魚に多いものの、それは育成場所に影響することが示された。毒性をヒト腸管上皮細胞(Caco-2細胞)と下痢症モデル動物(乳のみマウス)を用いて調べた結果、ナナホシクドアに比べて1/50程度であった。またCaco-2細胞のDNAマイクロアレイ解析により、IL8などの炎症性サイトカインや嘔吐に関連する遺伝子発現が上昇した。最終的に、マグロ筋肉中の感染許容量は10の7乗孢子/g以下と推定された。

研究成果の概要(英文)：As well as a myxosporean *Kudoa septempunctata* infecting the olive flounder *Paralichthys olivaceus*, several *Kudoa* species showing an asymptomatic infection in marine fishes have been recently suspected as causative agents of food-poisoning in humans. In the present study, epizootiological studies on *K. hexapunctata* from Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* indicated that infection with *K. hexapunctata* were found mostly in juvenile tuna fish less than 1-year old and influenced by nursery ground, rather than origin of seedlings (natural or artificial). Pathogenicity tests with human intestinal epithelial cells (Caco-2 cells) and diarrhea-model animals (suckling mouse) proved that pathogenicity of *K. hexapunctata* was 1 to 50 lower than that of *K. septempunctata*. Finally, the lowest limit of *K. hexapunctata* in tuna muscle was shown to be 10 the 7th power of spores / g-muscle.

研究分野：農学

キーワード：魚病学 寄生虫 食中毒 公衆衛生

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生鮮魚介類を摂食後、数時間で下痢や嘔吐を呈する原因不明の食中毒が増加しており、問題となっていた。2011年6月、厚生労働省の通知により、養殖ヒラメの筋肉に寄生して肉眼的症状を伴わない粘液胞子虫ナナホシクダア (*Kudoa septempunctata*) が原因であると発表された。発症は一過性であり深刻な食中毒ではないものの、クダア汚染海域のヒラメ養殖業者は廃業または魚種転換を余儀なくされ、いわゆる風評被害も伴って、水産業および公衆衛生上、大きな被害を受けた。さらに近年、他の魚種からも同様の不顕性感染型クダアが続々と発見され、食中毒リスクが懸念されている。事実、メジマグロ (クロマグロの幼魚) に寄生するムツボシクダア (*K. hexapunctata*) と食中毒との関連が強く疑われている。また、市販のブダイ、サワラ、アブラガレイなどからも未記載と思われるクダアが次々に見つかり、すでに把握されているクダアは氷山の一角であり、人間に病害性のあるクダアは普遍的に存在している可能性が示された。

### 2. 研究の目的

近年、ヒラメに寄生するナナホシクダアと同様、他の魚種からも不顕性感染型クダア (メジマグロのムツボシクダア、ブダイの *Kudoa igami*、サワラとアブラガレイの *Kudoa* spp.) が次々に発見され、食中毒との関連性が疑われている。本研究では、海産魚における不顕性感染型クダアの実態を網羅的に調べ、養殖期間中の定期調査により、地理的分布や季節的消長を時系列的に明らかにする。

また各クダアの病原性を実験動物 (乳のみマウス) と細胞レベル (Caco-2 細胞) の2つのアッセイ系により実験的に確認する。さらにクダア胞子を接種した Caco-2 細胞において発現した遺伝子を解析することにより、病原性メカニズムを解明する。

総合的に鑑みて、各クダアが実際にどの程度、人間に健康被害を及ぼすか、リスク評価を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

養殖・天然マグロ類、ブダイ、サワラ、アブラガレイなど各種海産魚を材料とし、不顕性感染型クダア属粘液胞子虫の寄生状況の調査を網羅的に行う。クダアの形態と遺伝子の解析から種同定を行った後、病理組織観察により感染が顕在化しない要因を分析する。

クダアの病原性に関与する因子を特定するため、ヒトの腸管上皮細胞の実験モデルとして用いられる Caco-2 細胞に接種したときの経上皮電気抵抗値 (TER) および炎症や免疫関連遺伝子の特異的発現、乳のみマウスに投与したときの腸管内液体貯留値 (FA 値) および腸管内への侵入動態等を解析し、病原性メカニズムを解明する。さらに胞子の活性

も考慮したうえで、クダアの毒性評価系を確立する。

最終的に、食中毒を発症する摂取孢子数の閾値、魚体内の孢子密度、人間の魚肉摂食量の推定値などから、食中毒リスクのあるクダア種や魚種、季節や産地を評価する。

### 4. 研究成果

(1) メジマグロにおけるムツボシクダアの寄生調査: クロマグロ人工種苗を A 県の生簀に冲出しし、2013年7月~12月および2014年8月~2015年10月の2年級群にわたって定期的に寄生調査を実施した。その結果、ムツボシクダアは9月以降に魚へ侵入すること、寄生率は2014年11月に100%となり2015年9月まで継続すること、寄生強度 (筋肉1g当たりの孢子密度) は12月までは10の4乗~6乗個/g、翌年4月~9月には5乗~7乗個/gに達したが、10月には0個/gになった (図1)。

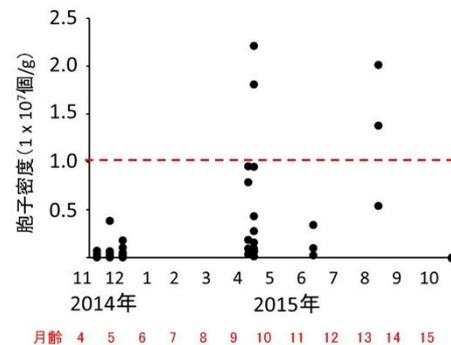


図1. A県のクロマグロ養殖場におけるムツボシクダアの寄生強度 (孢子密度) の定期調査。黒丸は1尾のマグロのデータを示す。

同じ養殖場における、2016年12月~2017年2月の調査でも、寄生率は最大97%、寄生強度は3乗~6乗/gレベルに達した。

2017年度に新たに実施した天然種苗の調査においては、日本海や太平洋側で漁獲されたメジマグロにはほとんど寄生が見られず、和歌山県に導入してから感染が起こることが示された。

なお、サワラに寄生するクダアについては、すでに別グループ (Sakai et al., 2018) により *K. konishiae* という新しい種名で報告されてしまったため、形態観察や遺伝子解析などは実施しなかった。

(2) Caco-2 細胞を用いたアッセイ系による毒性評価: Caco-2 細胞の単層膜にムツボシクダア胞子の希釈系列を接種して TER を測定した結果、胞子10の7乗個以上を接種した場合のみ、安定して TER が減少した (図2)。以上の結果より、ムツボシクダアの毒性はナナホシクダアの1/50程度、発症用量は孢子数にして10の9乗個/人と見積もられた。しかし、ヒラメとマグロの平均喫食量 (マグロ井は約100g/人) の違いも考慮すると、マグロ筋肉中の感染許容量は10の7乗個/g以下と推定された。

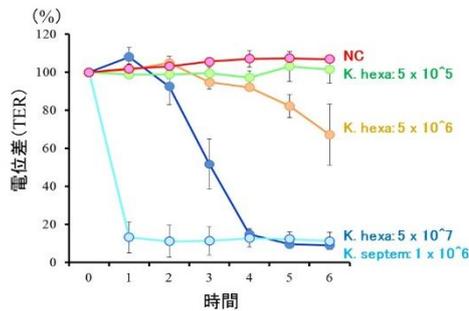


図2. Caco-2細胞を用いたアッセイ系によるナナホシクドア(K. septem)とムツボシクドア(K. hexa)の毒性評価。数字は各ウェルに接種した胞子数。NCは陰性対照。電位差が減少するほど、毒性が強いことを示す。

(3) 乳のみマウスを用いたアッセイ系による毒性評価：マウス1個体あたりムツボシクドアの胞子 $1 \times 10^7$ の7乗個を経胃投与してもFA値にほとんど顕著な上昇が見られなかったことから、ナナホシクドアよりは病原性が低いことが示された(表1)。また加熱処理はムツボシクドアの不活化に有効であることも示唆された。

表1. ムツボシクドアの胞子を $5.4 \times 10^7$ 個/マウス(n=3)投与した後のFA値の変化

| 経過時間  | 投与群    | 対照群<br>(PBS投与) |
|-------|--------|----------------|
| 1.5 h | 0.067  | 0.063          |
| 3 h   | 0.065* | 0.053          |
| 6 h   | 0.061  | 0.051          |
| 12 h  | 0.055  | 0.050          |

\*対照群より統計的に上昇(p<0.006)

(4) Caco-2細胞アッセイ系を用いた遺伝子発現解析：ナナホシクドア接種または非接種のCaco-2細胞からtotal RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ法によりGene Ontology解析した結果、接種群ではIL8などの炎症性サイトカイン産生の上昇や細胞骨格の機能低下、白血球遊走に関わるケモカイン関連遺伝子の発現が上昇するとともに、嘔吐に関連すると考えられるパスウェイ上の遺伝子上昇がみられた。

(5) 結論：以上より、メジマグロのムツボシクドアが人間に対して病害性を有することが実験的に確認されたが、その程度は、ヒラメのナナホシクドアより弱く、1/50程度、発症用量は10の9乗個/人と見積もられた。しかし、マグロの平均喫食量を考慮すると、マグロ筋肉中の感染許容量は10の7乗個/g以下と推定され、実際に発生しているマグロ食中毒がマグロ丼(マグロ肉にして約100g)を食して発生していることと符合した。

感染リスクはクロマグロ満1歳未満の幼魚、とくに9ヶ月齢~13ヶ月齢(4月~8月)に

多いが、それは人工、天然にかかわらず、育成場所が強く影響していることが示された。

対策としては、ヒラメのムツボシクドアと同様、冷凍または加熱処理することが最も効果的と考えられるが、この時期、このサイズのメジマグロの喫食を避けることも重要である。

#### <引用文献>

Sakai H, Kato E, Sakaguchi S, Setsuda A and Sato H (2018) Morphological and molecular genetic characterization of *Kudoa konishiae* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) in the muscle of Japanese Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*), Parasitology Research, 117, 893-904.

#### 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7件)

Jinnai M, Kawai T, Harada T, Nishiyama Y, Yokoyama H, 他7名, Production of a novel monoclonal antibody applicable for an immunochromatographic assay for *Kudoa septempunctata* spores contaminating the raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), International Journal of Food Microbiology, 査読有、259巻、59-67頁、2017年  
DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.003.

横山 博、クドア症、魚病研究、査読有、51巻、163-168頁、2016年  
DOI: 10.3147/jsfp.51.163

Yokoyama H, Funaguma N, Kobayashi S, In vitro inactivation of *Kudoa septempunctata* spores infecting the muscle of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Foodborne Pathogens and Disease, 査読有、13巻、21-27頁、2016年  
DOI: 10.1089/fpd.2015.2003

Nishioka T, Satoh J, Mekata T, Mori K, Ohta K, Morioka T, Lu M, Yokoyama H, Yoshinaga T, Efficacy of sand filtration and ultraviolet irradiation as seawater treatment to prevent *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) infection in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathology, 査読有、51巻、23-27頁、2016年  
DOI: 10.3147/jsfp.51.23

Shin S-P, Zenke K, Yokoyama H, Characterization of protease isolated from *Kudoa septempunctata*, Korean Journal of

Veterinary Research, 査読有、55 巻、  
175-179 頁、2015 年  
DOI:10.14405/kjvr.2015.55.3.175

Suzuki J, Murata R, Yokoyama H,  
Sadamasu K, Kai A. Detection rate of  
diarrhea-causing *Kudoa hexapunctata* in  
Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis*  
from Japanese waters, International  
Journal of Food Microbiology, 査読有、194  
巻、1-6 頁、2015 年  
DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.001

Shin S-P, Zenke K, Yokoyama H,  
Yoshinaga T. Factors affecting sporoplasm  
release in *Kudoa septempunctata*.  
Parasitology Research, 査読有、114 巻、  
795-799 頁、2015 年  
DOI: 10.1007/s00436-014-4305-y

〔学会発表〕(計 5 件)

横山 博、食中毒の原因になる魚類の粘液  
胞子虫、食の安全研究センター・創立 10 周  
年記念シンポジウム、2017 年 2 月 22 日、東  
京大学農学部弥生講堂(東京都、文京区)

横山 博、養殖魚の寄生虫病に関する最近  
の話題について、動物医薬品協同組合・講演  
会、2016 年 8 月 9 日、東京薬業厚生年金基  
金(東京都、中央区)

横山 博、食の安全を守る研究最前線！魚  
の寄生虫と食中毒のコト、東大・食の安全研  
究センター・第 19 回サイエンスカフェ、2016  
年 7 月 28 日、東京大学農学部(東京都文京  
区)

横山 博、城村 怜、小林 彰子、良永知義、  
クロマグロの筋肉寄生ムツボシクドアの毒  
性評価、第 36 回日本食品微生物学会学術総  
会、2015 年 11 月 13 日、川崎市教育文化会  
館(神奈川県川崎市)

Yokoyama H, Funaguma N, Kobayashi S.  
In vitro inactivation of *Kudoa*  
*septempunctata* spores, the causative  
myxosporean of a food poisoning in  
humans, 9<sup>th</sup> International Symposium on  
Fish Parasites, 2015 年 8 月 31 日、バレンシ  
ア市(スペイン)

〔図書〕(計 1 件)

横山 博(共著)(株)生物研究社、水産  
海洋ハンドブック第 3 版、2016 年、395 ~ 399  
頁

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
該当なし

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

河合 高生(KAWAI, Takao)  
大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主幹  
研究員  
研究者番号：30150319

(2)研究分担者

小林 彰子(KOBAYASHI, Shoko)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准  
教授  
研究者番号：90348144

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし