

長崎県で発生した *Kudoa septempunctata* を原因とする食中毒事例

高木 由美香、田栗 利紹

ヒラメに寄生する粘液胞子虫の一種である *Kudoa septempunctata* (以下、クドア) は、喫食後数時間以内に一過性の下痢・嘔吐を引き起こす食中毒の原因となる。平成 23 年にクドアが食中毒原因物質に指定されて以降、長崎県内で発生した食中毒疑い事例 5 件のうち、検査によりクドアが原因とされた 3 事例について、概要と検査結果を報告する。また、これまでの検査結果における、便検体採取時期とクドア遺伝子陽性率の関係について調査したところ、大阪府の報告<sup>1)</sup>と同じく、喫食から検体採取までの期間が遺伝子陽性率に大きく影響しており、クドアを原因とする食中毒が疑われる場合には、可能な限り迅速な便検体の採取が重要であることが明らかとなった。

キーワード: クドア・セプタンプンクタータ、ヒラメ、リアルタイム PCR

## はじめに

*Kudoa septempunctata* (以下、クドア) は、ヒラメの筋肉に寄生する粘液胞子虫の一種である。クドアが多数寄生したヒラメを刺身または加熱不十分な調理物として喫食すると、数時間(約 2 時間～20 時間)以内に一過性の下痢、嘔吐を起こすことがあり、平成 23 年に食中毒原因物質として指定された(平成 23 年 6 月 17 日付厚労省医薬食品局食品安全部長通知)。当該通知以降に全国では年に 20～40 件発生しており(表1)、長崎県では 5 件検査対応し、3 件からクドアが検出されている。ここでは県内の事例について、概要を報告する。

食中毒事例におけるクドアの検査は、ヒラメを検体とする公定法(平成 28 年 4 月 27 日 厚労省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「クドアの検査法について」)、および有症者便を検体とする参考法<sup>2)</sup>(平成 26 年 5 月 26 日 食中毒患者便からのクドア遺伝子検査法(参考)について、以下通知法という)があり、当センターにおいてもこれらの方法により、食中毒疑いの事例について搬入された検体の検査を行っている。

また、大阪府衛研の久米田らは、有症者便を用いた検査において、発症から検体採取までの期間が遺伝子検査陽性率に大きく影響すると報告している<sup>1)</sup>。本報では、当センターでこれまでに実施した 5 件の検査について、発症から検体採取までの期間と遺伝子陽性率について考察する。

## 方法と材料

ヒラメは公定法に基づき、顕微鏡検査とリアルタイム PCR 法による検査を実施した。

表 1 食中毒発生状況

	全国		長崎県	
	事件数	患者数	事件数	患者数
平成23年 <sup>※1</sup>	33	473	0	0
平成24年	41	418	0	0
平成25年	21	244	0	0
平成26年	43	429	1 (2)	4 (6)
平成27年	17	169	0	0
平成28年	22	259	2	20

※1 平成23年6月～12月

顕微鏡検査法では、ヒラメ 0.5 g の上に目開き 200  $\mu\text{m}$  のメッシュをおき、PBS を加えて軽く潰し、その溶液を 100  $\mu\text{m}$  のメッシュに通した後遠心(1,500 rpm、10 分、10°C)する。沈渣に PBS 0.5 mL を正確に加えて懸濁したものを 10  $\mu\text{L}$  とり、同量のトリパンブルー溶液と混合して、白血球用血球計算盤で 6～7 個の極嚢を有するクドア胞子を計測する。計測の結果、 $10^5$  copies/g 以上を顕微鏡検査陽性と判定した。

リアルタイム PCR 法では、QIAamp DNA Mini Kit(キアゲン社)を用い、「組織からのプロトコール」に準じてヒラメ検体 35～50 mg から DNA を抽出した。公定法のプライマー、プローブ(図 2)を用いて、検体および段階希釈した陽性対照をリアルタイム PCR 反応に供した。陽性対照のコピー数を縦軸に、Ct 値(Threshold Cycle: 閾値と増殖曲線が交わるサイクル数)を横軸にプロットし、検量線を作成し、そこから検体のコピー数を算出した。コピー数が  $10^7$  copies/g を陽性と判定した。

ヒラメの検査において、リアルタイム PCR 法は、スクリーニング検査として実施するものであり、顕微鏡検査

で陽性となった検体を最終的にクドア陽性とする。また、顕微鏡検査で陽性となった場合でも、リアルタイム PCR 法等により、定性的に確認することが望ましいとされている。

便検体では、通知法に準じて、生便 300 mg 以上を検体とし、リアルタイム PCR 法により検査を実施した。FastDNA SPIN Kit for Feces (MP biomedical)を用い、

キット付属のマニュアルに従って DNA を抽出した。通知法のプライマー、プローブ(図 1)を用いて、検体をリアルタイム PCR 反応に供した。Ct 値が 41 以下を示した検体を陽性と判定した。

調査対象を下記の 3 事例とし、各事例において、採取されたヒラメおよび便検体を材料とした(表 3)。

表 2 公定法および通知法におけるプライマー、プローブ一覧

ヒラメ (公定法)	
Forward primer	CATGGGATTAGCCCCGGTTTA
Reverse primer	ACTCTCCCAAAGCCGAAA
Probe	FAM-TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA
患者便 (通知法)	
Forward primer	CGGTCATATCAGCCATGGATAAC
Reverse primer	CTATCGACAAATTAATGTTTCGATATGC
Probe	FAM-TCACCATGTAAATGGTGGGAGCATT-Iowa Black FQ



図 1 公定法と通知法における PCR 標的部位

【事例 1】

平成 26 年 9 月 27 日、飲食店で会食した 1 グループ 9 名のうち 4 名が、喫食後数時間で嘔吐、下痢を発症した。患者らはヒラメ刺身を喫食しており、有症者便からクドアの遺伝子を検出した。

【事例 2】

平成 28 年 8 月 19 日に飲食店を利用した 17 グループ 79 名中、2 グループ 7 名が喫食から 3~15 時間後に嘔吐、下痢の症状を呈した。メニューにはヒラメの薄造りが含まれており、有症者便からクドア遺伝子を検出した。

【事例 3】

平成 28 年 10 月 23 日に飲食店を利用した 43 名のうち 13 名が、食事から平均 3.7 時間のうちに下痢、嘔気・嘔吐、腹痛等の食中毒症状を呈した。ヒラメの刺身の提供があり、残品のヒラメおよび有症者便からクドアの遺伝子が検出された。

表 3 3 事例における調査検体数

	ヒラメ	便検体	
		有症者(うち無症状者)	従事者
事例1	3	2	3
事例2	2	4(1)	0
事例3	2*	9	0

※長崎市保健環境試験所で検査を実施

結果

【事例 1】

ヒラメ 3 検体は、リアルタイム PCR によるスクリーニング検査陰性であった。従事者便 3 検体からクドア遺伝子は検出されず、有症者便 2 検体(発症後 3 日以内に採取)では、クドア遺伝子陽性であった。

表 4 事例 1 における検査結果

検体	喫食から採取までの時間(hr)	判定	コピー数もしくはCt値
ヒラメ1		陰性	No Ct
ヒラメ2		陰性	No Ct
ヒラメ3		陰性	No Ct
有症者1	61	陽性	Ct=37.71
有症者2		陽性	Ct=39.66
従事者1~3		陰性	No Ct

【事例 2】

ヒラメ 2 検体はともに顕微鏡検査陰性であった。便検体では、有症者 1 検体および無症状喫食者便 1 検体において、クドア遺伝子陽性であった。同じ有症者から、喫食後 3 日目に採取された検体(有症者 2)から遺伝子は検出されなかった。

表 5 事例 2 における検査結果

検体	喫食から採取までの時間(hr)	判定	コピー数もしくはCt値
ヒラメ1、2		陰性	検出せず(顕微鏡検査)
有症者1	16	陽性	Ct=32.97
有症者2	~65 (喫食後3日目)	陰性	No Ct
有症者3		陰性	No Ct
無症状者1		陽性	Ct=38.70

※有症者検体1、2は同一人物由来

【事例 3】

有症者便 9 検体のうち、7 検体がクドア遺伝子陽性であり、当該検査における陽性率は 77.8%であった。

また、長崎市保健環境試験所で実施されたヒラメの残品(えんがわ、切り身)の検査において、えんがわは顕微鏡検査および遺伝子検査両方で陽性の結果であった。

さらに、長崎市ではヒラメの遡り調査を実施しており、同一ロットのヒラメ 21 枚が長崎市保健環境試験所および国立医薬品食品衛生検査所において検査されたが、すべて陰性であった。

表 6 事例 3 における検査結果

検体	喫食から採取までの時間(hr)	判定	コピー数もしくはCt値
有症者1	42.5	陽性	Ct=31.31
有症者2		陽性	Ct=33.94
有症者3		陰性	No Ct
有症者4		陽性	Ct=37.04
有症者5	45.5	陽性	Ct=36.16
有症者6		陽性	Ct=37.24
有症者7		陰性	No Ct
有症者8		陽性	Ct=38.49
有症者9		陽性	Ct=32.98
ヒラメ(えんがわ)		陽性	5.2×10 <sup>5</sup> copies/g(顕微鏡検査)
ヒラメ(切り身)		陰性	検出せず(顕微鏡検査)

※ヒラメの検査は長崎市保健環境試験所

考察

久米田らは、クドアはヒトの腸管内で増殖しないため、有症者便の検査においては、喫食から検体採取までの期間が遺伝子陽性率に大きく影響すると報告している(図 2)。当センターで実施したクドアによる食中毒疑い事例 5 件(表 1)、計 21 検体の便検体において、喫食から検体採取までの期間と遺伝子検査陽性率の関係を図 3 に示す。大阪府と同様に検体採取までの期間が長くなるほど陽性率が低下する傾向が認められた。これらの結果より、クドア食中毒を疑う事例においては、便検体を採取するタイミングが重要であることが確認された。

また、ヒラメの検査に関して、事例 3 においては有症者に提供されたものの残品からクドア胞子を検出したが、事例 1、2 および事例 3 の遡り調査における同一ロットと推定されるヒラメは、すべてクドア陰性であった。このことから、ヒラメにおけるクドアの寄生状況は同一ロットであっても個体差が大きいことが示唆された。

まとめ

これまで当センターで実施した検査事例から、クドアを原因とする食中毒を疑う場合には、検体の確保が最重要であると考え。ヒラメでは、有症者に提供した同

じ個体の残品を可能な限り入手すること、有症者便では事例が発生したら迅速に検体採取に努める必要がある。これらの2点について、情報を周知していかねばならない。

さらに近年、*K.septempunctata* 以外のクドア属や粘液胞子虫が寄生した魚介類による食中毒事例の報告があり、検査体制の構築および関係機関への情報提供は、今後も取り組んでいかねばならない。

謝辞

種々の情報を提供していただいた長崎県生活衛生課、長崎市保健所および保健環境試験所、長崎県立各保健所の関係各位に深謝する。

参考文献

- 1) 久米田, 大阪府衛研「食中毒患者便からの *Kudoa septempunctata* 遺伝子検出法と開発の経緯」を一部改変, 平成 26 年度食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者等研修会 (2014.10)
- 2) Harada, *et al*: Detection of *Kudoa septempunctata* 18S Ribosomal DNA in Patient Fecal Samples from Novel Food-Borne Outbreaks Caused by Consumption of Raw Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2963-2968 (2012)

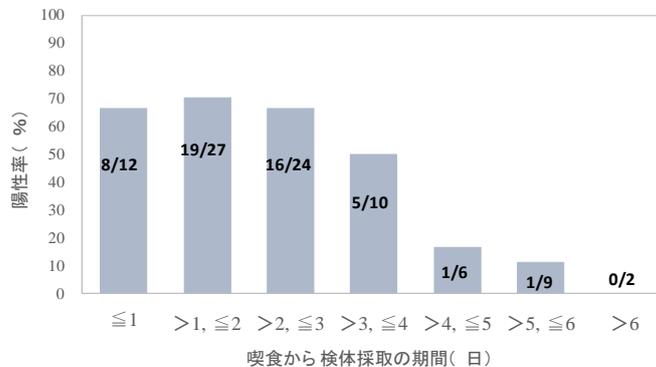


図 2 糞便採取時期と陽性率の関係(大阪府)<sup>1)</sup>

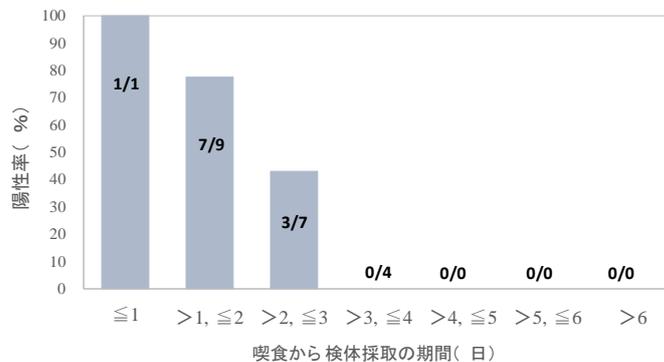


図 3 糞便採取時期と陽性率の関係(長崎県)

## Food Poisoning cases caused by *Kudoa septempunctata* in Nagasaki prefecture

Yumika TAKAKI and Toshitugu TAGAURI

*Kudoa septempunctata* (*Kudoa*), one of myxosporean parasites of fishes such as an olive flounder, causes human diarrhea and emesis within a few hours after eating. In this study, we report the outline of the examination of five suspected food poisoning incidents in Nagasaki since *Kudoa* designated as a causative agent of food poisoning by the Food Sanitation Act in 2011. We also analyzed the relationship between *Kudoa* positive rate and fecal sampling time. As a result, we confirmed that the fecal identification rate depends on the period from ingestion to examination as in Osaka. We recognize that it is important to collect feces as soon as possible.

Key words: *Kudoa septempunctata*, olive flounder, real-time PCR