

話題の感染症

食中毒原因物質としての“クドア”に関する最新の知見

Epidemiological and Microbiological Features of *Kudoa septempunctata* causing Novel outbreaks.

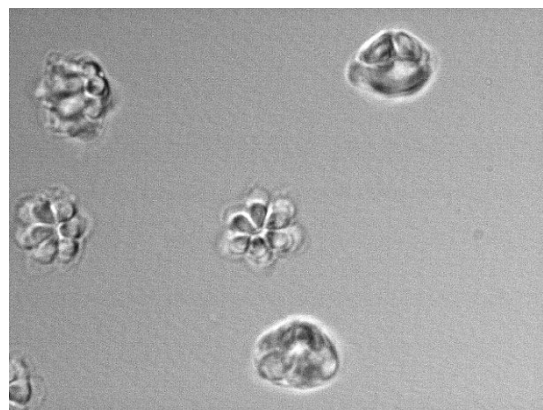
おおにし たかひろ
大西 貴弘
Takahiro OHNISHI

はじめに

昨年6月の厚生労働省の通知により、ヒラメに寄生する粘液胞子虫の *Kudoa septempunctata* が食中毒の病因物質として取り扱われることとなった。しかし、この *K. septempunctata* が病因物質として同定される以前から、食後数時間程度で一過性的の下痢や嘔吐を呈し、軽症で終わる有症事例が地方自治体の方々から報告されており、原因食品の1つにヒラメが推測されていた。しかしながら、患者の喫食残品からは既存の食中毒細菌やウイルス、化学物質などが検出されず、検出されたとしても患者の症状とは合致しないことから、原因の特定に至らず、自治体の方々が対応に苦慮されているということであった。そういった中で、われわれはこの有症事例は *K. septempunctata* が高濃度に寄生しているヒラメを生食することにより発症することを明らかにした。本稿では、*K. septempunctata* に関するこれまでの知見、および最近の研究から明らかになってきた *K. septempunctata* に関する最新の知見について紹介したい。

I. 病因物質の同定

これまでの調査から有症事例患者は共通してヒラメを喫食していることが明らかになっているため、この原因不明の有症事例を調査するにあたりヒラメに着目して研究を開始した。最初に市場に流通しているヒラメの調査を行った。60尾のヒラメを検査した結果、韓国産ヒラメ1尾から新種の寄生虫 *K. septempunctata* が発見された(写真1)。しかし、この

写真1 *K. septempunctata* 胞子

時点では *K. septempunctata* が本有症事例の病因物質であるとは考えられていなかった。その後、地方自治体の皆様のご協力を得てヒラメの生食による有症事例の喫食残品の収集を開始した。しかし、やはり喫食残品からは食中毒細菌やウイルス、マリントキシンは検出されなかった。そこで喫食残品と市場流通ヒラメ、それぞれに含まれるDNAを網羅的に読み取り、比較するメタゲノミック解析を行った¹⁾。その結果、当初最も多く含まれると考えられていた細菌のDNAは、喫食残品に特異的に含まれるDNA全体の内、0.005%にすぎなかった。しかしこれに対して、クドア属の粘液胞子虫のDNAは非常に多く、全体の2.56%に上った。また、このクドア属の粘液胞子虫のDNA配列をさらに解析したところ、喫食残品に特異的に存在するクドア属の粘液胞子虫は *K. septempunctata* であることが明らかになった。さらにPCR法によって喫食残品中のクドア属のDNAをスクリーニングしたところ、事例の83%からクドア属のDNAが検出された。そこで、*K. septempunctata* 感染ヒラメから *K. septempunctata* の胞子を精製し、

実験動物や培養細胞を用いた系で胞子の毒性を確かめたところ、食中毒症状と同様の症状を引き起こすことを確認した。これらの結果から、*K. septempunctata* がヒラメの生食による原因不明有症事例の病因物質として同定された¹⁾。

Ⅱ. *K. septempunctata* による食中毒の特徴

K. septempunctata による食中毒は以前より瀬戸内沿岸において発生が認識されていた。当初は地方における散発事例であると認識されたこともあったが、その後の調査から、多くの都道府県で発生が確認されるようになってきている。この食中毒の症状として、潜伏時間が非常に短く、食後2時間程度から数時間程度で発症し、一過性であるが非常に激しい下痢や嘔吐を起こすことが、事例に共通した症状として知られている。平成22年10月にA県で*K. septempunctata* を原因とする大規模な食中毒が発生している。この事例では懸賞の景品として送付されたヒラメを喫食した約500人の内、約100人が嘔吐や下痢などの症状を呈している。この事例では発症者、非発症者あわせて233人から疫学情報が収集され、解析されている。その結果によると潜伏期の中央値が5時間で、最も短い場合で1時間と非常に潜伏期が短かった。患者が呈した症状は下痢が79.7%と最も多く、次いで嘔吐が57.6%、発熱が19.6%であった。下痢を呈した患者の下痢の回数は中央値が3回で、最も多い場合では24時間以内に22回の下痢を呈した患者もいた。この事例におけるヒラメの喫食量は100g以上120g未満が27.4%で最も多く、40g以上60g未満が26.9%であった。男女間および喫食者の基礎疾患の種類と発症との間に有意な差は見られなかった。この事例と同一ロットのヒラメ筋肉中の*K. septempunctata* 数を調べてみたところ、ヒラメ筋肉1gあたり $10^6 \sim 10^7$ が25.7%と最も多く、高濃度の*K. septempunctata* が寄生していることが明らかになった(表1)。

本食中毒にははっきりとした季節性があり、8月～10月に発生件数が急増することが知られている。ヒラメの取扱量は夏期にはむしろ減少するため、発生件数の増加と取扱量との間に関連性はないと思われる。現時点でこのような季節性が現れる原因はよくわかっていないが、海水温の上昇と何らかの関係

表1 同一ロット中の*K. septempunctata*胞子数の分布

Kudoa 胞子数 (胞子数/g)	個数	全検体に占める比率
$> 10^7$	0	0.0
$10^6 - 10^7$	19	25.7
$10^5 - 10^6$	9	12.2
$10^4 - 10^5$	8	10.8
$10^3 - 10^4$	2	2.7
$< 10^3$	36	48.6

があるのではないかと考えられている。また、*K. septempunctata* による食中毒の多くは養殖ヒラメによるものであるが、天然ヒラメによる事例も報告されている。天然ヒラメであっても*K. septempunctata* 生息海域から水揚げされたものは*K. septempunctata* が寄生している可能性は十分にあると思われる。養殖ヒラメだけでなく天然ヒラメに関しても注意していく必要がある。また、すべての事例でヒラメの産地が明らかになっているわけではないので正確な割合はわからないが、輸入ヒラメ、特に韓国産の食中毒事例が多数報告されている。さらに輸入ヒラメは成魚だけでなく、種苗としても国内に流入していることが示唆されていることから、種苗導入時には輸入先が明らかであり、*K. septempunctata* の感染が見られないロットを選ぶことが、本食中毒の予防には重要であると考えられる。

昨年の7月に厚生労働省より*K. septempunctata* の暫定検査法が発出されている。この検査法は顕微鏡検査で直接*K. septempunctata* の胞子を確認する顕微鏡検査と、リアルタイムPCRによる遺伝子検査からなっている。しかし、ヒラメへの*K. septempunctata* の寄生は特徴的であるため、検査には注意が必要である。まず、*K. septempunctata* の生活環が回っていない養殖場のような環境では、*K. septempunctata* のもう一つの宿主であるミミズやゴカイの仲間が存在しないため、*K. septempunctata* 寄生魚から他の魚へ寄生が広がっていかないことに注意する必要がある。*K. septempunctata* は、ミミズやゴカイを介さずに魚から魚へ直接寄生することができないため、このような状況が発生すると考えられている。表1は先ほど紹介したA県での集団発生と同一ロットのヒラメ中の*K. septempunctata* 数の分布を見たものであるが、魚から魚へ直接寄生が広がらないという*K. septempunctata* の特徴から、同じ養殖場の同じ生簀の中の魚であっても、ヒラメ1gあたり 10^7 や 10^6 近い寄生が

見られるヒラメが多数存在する一方で、*K. septempunctata* の寄生を確認できなかったヒラメが全体の50%近くも存在しているという結果につながる。つまり、同一ロットのヒラメでも *K. septempunctata* 数のばらつきは非常に大きくなっている。このため、宴会などの大規模で複数尾のヒラメが提供されているような事例では、*K. septempunctata* が高濃度に寄生しているヒラメとそうでないヒラメが混在して提供される可能性がある。そうすると *K. septempunctata* が高濃度に寄生しているヒラメを喫食した場合には発症し、そうでないヒラメを喫食した場合には発症しないなど、同じヒラメを喫食した場合でも、発症する場合としない場合にばらつきが生じることが考えられる。よって、本食中毒の事例ではヒラメのオッズ比が低く出る傾向がみられる¹⁾。このため、場合によってはヒラメが原因食材であることを見逃す可能性があるため、注意が必要である。また同じ理由で、喫食残品と同一ロットのヒラメしか手に入らなかったような場合も注意が必要である。例えば喫食残品は残っていなかったが、厨房の冷蔵庫を開けてみると同じ仕入先のヒラメが残っていたような場合である。この冷蔵庫に残っていたヒラメを検査して *K. septempunctata* が検出されなかったとしても、実際に患者が喫食したヒラメの中に *K. septempunctata* が含まれていたかもしれない。またその逆で、冷蔵庫に残っていたヒラメから *K. septempunctata* が検出されたとしても、実際に患者が喫食したヒラメの中に *K. septempunctata* が含まれていたかどうかはわからない。よって、同一ロットのヒラメを検査する場合には注意が必要である。このような理由から、最近では吐物や患者便から PCR を使って *K. septempunctata* の検出を行う試みがなされている。ヒラメは高級食材であり通常少量で提供されるため、喫食残品が残っていない場合が多い。そのため、吐物や便からの検出法が確立されれば *K. septempunctata* の検出は容易になると思われる。しかし、*K. septempunctata* による食中毒は非常に潜伏時間が短い。また、細菌やウイルスと異なり患者の体内で増殖し、持続的に便から排出されたりはしない。つまり、喫食したヒラメに含まれていた *K. septempunctata* が排出されるだけである。このような理由から、吐物や便から *K. septempunctata* の検出を行う場合は検体採集のタイミングが重要である

と思われる。これらの問題点が解決されれば、今後は吐物や便からの *K. septempunctata* 検出が本食中毒の検査法の中で重要な位置を占めてくるものと考えられる。

Ⅲ. *K. septempunctata* の病原性

K. septempunctata はミクソゾア門に属する粘液胞子虫でヒラメの筋肉に寄生する。粘液胞子虫は極囊の数や配置により形態学的に分類されるが、*K. septempunctata* は7つもしくは6つの極囊を持ち、特徴的な花びら状の形態を示す²⁾ (写真1)。体長は約10 μ mと細菌などに比べるとかなり大きく、通常の顕微鏡観察で容易に識別できる²⁾。ただし、他の粘液胞子虫のように筋肉中でシストを形成しないため、肉眼によって寄生を確認することはできない。現在のところ *K. septempunctata* の詳しい生活環は明らかになっていないが、他の粘液胞子虫の生活環から、ヒラメとミミズやゴカイなどの環形動物を交互に宿主にしていると考えられている³⁾。また、*K. septempunctata* 以外にも4つの極囊を持つクダア属の粘液胞子虫が存在する。これらの粘液胞子虫は魚の死後に産生するプロテアーゼによって、魚の筋肉が融解する、いわゆるジェリーミートの原因微生物と知られている。このように粘液胞子虫は魚の商品価値を落とすために水産学的には問題の多い寄生虫であったが、基本的に公衆衛生的には無害であると考えられてきた。これに対して *K. septempunctata* はヒトに対して一過性だが激しい下痢や嘔吐を引き起こす。このようにヒトに対して病原性を示す粘液胞子虫は、現時点では *K. septempunctata* だけである。この *K. septempunctata* の病原性は乳のみマウスやunksusを用いた感染実験や、培養腸管細胞を用いた感染モデルによって確認できる。例えば、ヒラメから精製した *K. septempunctata* の胞子を乳のみマウスに経口的に投与すると、投与後約1.5時間で腸管に顕著な水分貯留が認められ、4時間後には下痢便として排出される¹⁾。その後の予後は良好である。また、unksusに *K. septempunctata* の胞子を経口的に投与、もしくは *K. septempunctata* が高濃度に寄生しているヒラメをunksusに食べさせた場合、投与後20~30分後にunksusは嘔吐を始め、1時間の間で2,3回嘔吐を繰り返す¹⁾。乳のみマウスの場

合と同様、予後は良好である。乳のみマウス、スunks、いずれの場合も潜伏時間が非常に短く、予後が良好であるなど、ヒトの臨床症状と同様の症状を呈する。また、ヒトの培養腸管細胞である Caco-2 細胞を用いたモデルに *K. septempunctata* の胞子を接種すると、1 時間以内に腸管細胞の透過性が 5 倍以上に上昇し、下痢と同様の状態を示すことが明らかになっている。また、18 時間後には上昇していた透過性の回復が見られる。このように培養腸管細胞でも 1 時間という短時間で *K. septempunctata* は病原性を示し、短時間の間で回復するなど、臨床症状と同様の傾向が観察される。またクドアの失活方法であるが、 -80°C で 2 時間もしくは -20°C で 4 時間以上保存することによって *K. septempunctata* は病原性を失うことが明らかになっている。しかし、冷凍処理はヒラメの商品価値を下げるため、残念ながら本食中毒の予防法としては使用しづらい。流通段階における効果的な *K. septempunctata* 失活法の今後の開発が期待される。

IV. *K. septempunctata* の病原メカニズム

このような *K. septempunctata* の病原性がどのようなメカニズムによって発現するのかは長い間、不明であった。先ほど述べたように、そもそも粘液胞子虫がヒトに対して病害を示すということが想定されていなかったため、粘液胞子虫の病原メカニズムに関してはほとんど研究されていなかった。そのような訳で、病原メカニズムの解析に関してほとんどゼロからわれわれは研究をスタートさせた。最初に想定したのは *K. septempunctata* が何らかの毒素を産生して毒性を示すという可能性であった。そこで、*K. septempunctata* の超音波破碎物や *K. septempunctata* の培養上清を先ほどの Caco-2 細胞に投与してみたが、Caco-2 細胞の透過性に変化は見られなかった。この結果から、*K. septempunctata* の病原性が毒素や虫体成分が細胞に作用して毒性を示すという単純な系で発現しているわけではないことが明らかになった。その後、研究は思うように進まなかったが、Caco-2 細胞に感染させた *K. septempunctata* の胞子を観察していると、胞子から 2 つのアメーバ状の細胞が放出されるのに気が付いた (写真 2)。このアメーバ状の細胞は、*K. septempunctata* が環形動物

に経口的に取り込まれたときに、その腸管内で放出される胞子原形質であると考えられた³⁾。腸管細胞に感染させたときにだけ、この胞子原形質が放出されるため、この胞子原形質が *K. septempunctata* の病原性の鍵を握っているのではないかと考え、さらに研究を進めた。その結果、*K. septempunctata* の胞子から放出された胞子原形質 (写真 3) は腸管細胞内に侵入し 1 時間以内に、腸管細胞の基底膜側に達することが明らかになった。その侵入の過程で、胞子原形質は腸管細胞に $10\mu\text{m}$ 以上の大きな穴を形成することが明らかになった。1 時間という急速な細胞侵入はこの食中毒の特徴である短い潜伏時間と非常によく一致すると思われる。また、この胞子原形質の細胞侵入を阻害すると、腸管細胞の透過性の上昇を防ぐことができた。以上の結果から、胞子原形質の細胞侵入による腸管細胞の障害が、下痢の直接

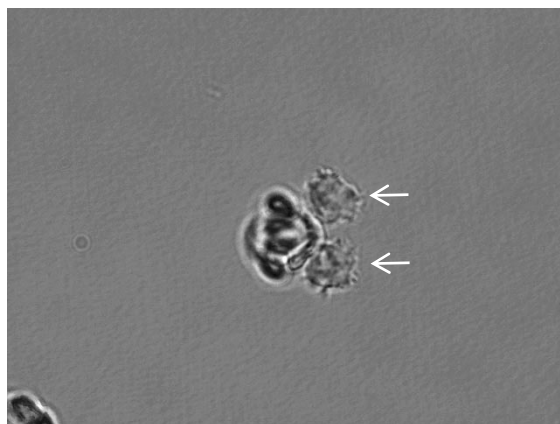


写真 2 *K. septempunctata* 胞子と胞子原形質 (矢印は胞子原形質を示す)

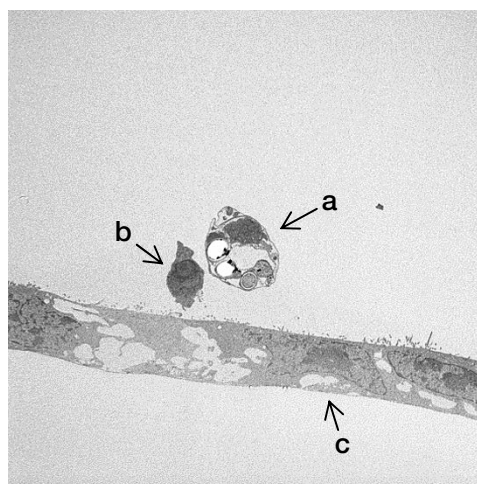


写真 3 腸管上皮細胞における胞子原形質の放出
a: 胞子, b: 胞子原形質, c: 腸管上皮細胞

的な原因であることが明らかになった。また、この結果から明らかなように、*K. septempunctata* の病原性の本体は、胞子から放出される胞子原形質が担っており、胞子自体は胞子原形質を収納するための「容器」にすぎないことが明らかになった。このようにして病原性を発揮する *K. septempunctata* であるが、腸管細胞に感染後、約2～4時間程度で胞子原形質が腸管細胞内で分解されている像が観察されるようになる。胞子原形質が分解される原因はまだ明らかになっていないが、もともと本来の宿主ではないヒトの腸管に寄生しているうえ、ヒラメが生息している海水とヒトの細胞内の浸透圧との違いなども手伝って、ヒトの腸管内では長い時間、生息できないのではないかと考えている。このあたりは腸管で増殖することのできる赤痢アメーバとは大きく違う点である。いずれにしても、この短時間での胞子原形質の分解が、臨床症状における予後が良好であるという本食中毒のもう一つの特徴につながっているものと考えられる。ただ、今回明らかになった胞子原形質による腸管細胞の障害だけでは *K. septempunctata* による食中毒のもう一つの大きな症状である嘔吐の発症を説明することができない。今後は *K. septempunctata* による嘔吐の発症機構に重点を置き研究を進めていきたいと考えている。

おわりに

K. septempunctata に関する通知が厚生労働省から発出されてから、間もなく一年になる。*K. septempunctata* の検査は多くの自治体でスタートし、順調

に進んでいるようである。しかしながら、*K. septempunctata* に関する研究はまだ始まったばかりである。特に粘液胞子虫の研究は魚病学的な観点からの研究がほとんどで、ヒトに対する病原性に関してはこれまでほとんどなされていない。また、流通段階における *K. septempunctata* の効果的な失活法もまだ開発されていない。今後さらに研究を進め、*K. septempunctata* の病原メカニズムを明らかにし、本食中毒の予防法につなげていきたいと考えている。

謝 辞

K. septempunctata の研究を開始するにあたって検体の収集、提供にご協力いただきました地方自治体および地方衛生研究所の皆様、大分県農林水産研究指導センターの福田 穰先生、独立行政法人 水産総合研究センター・増養殖研究所の乙竹 充先生、佐古 浩先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T. Identification of *Kudoa septempunctata* as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of *Paralichthys olivaceus* in Raw Fish. *Clin Infect Dis*. **54** (8): 1046-1052, 2012.
- 2) Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multi-valvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol Res*. **107**: 865-872, 2010.
- 3) 横山 博. 魚類に寄生する粘液胞子虫の生活環と起源 原生動物学雑誌. **37**: 1-9, 2004.