

[ノート]

ヒラメが原因食品と推定される集団嘔吐下痢症

齋藤 悦子* 秋山 由美 近平 雅嗣

Food-borne Vomiting and Diarrhea Caused by *Kudoa septempunctata* parasitizing Olive Flounder

Etsuko SAITO*, Yumi AKIYAMA and Masatsugu CHIKAHIRA

Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Science, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

During June to September in 2011, 7 cases of food borne illness presenting with symptoms vomit and diarrhea suspected to be caused by *Kudoa septempunctata* parasitizing olive flounder occurred in Hyogo prefecture.

Eight leftover olive flounders on 7 cases were subjected to *K. septempunctata* detection. Seven olive flounders were *K. septempunctata* gene positive by PCR, and 6 except 1 frozen were *K. septempunctata* spore positive (1.1×10^5 – 8.6×10^6 /g) with microscopic test.

In one case, 28S ribosomal DNA of *K. septempunctata* and *K. septempunctata* spores (6.0×10^6 /g) were detected from trunk muscle of leftover olive flounder. In this case, we examined 9 olive flounder kept in the corf with *K. septempunctata* positive. No olive flounder was *K. septempunctata* positive suggesting the importance of proper sample collecting.

In 3 case 28S ribosomal DNA of *K. septempunctata* was detected in vomited matter. This suggested the usefulness of vomitus for detecting *K. septempunctata* in case of food poisoning caused by *K. septempunctata*.

I はじめに

クドア属は魚類の筋肉に寄生する粘液胞子虫の一種であり、宿主の死後筋肉中にプロテアーゼを分泌して筋肉融解を起こし、いわゆるジェリーミートの原因となる。このことからクドア属は加工・出荷時に問題となる寄生虫として知られているが、ヒトには無害であると考えられてきた。しかし近年、クドア属の新種である *Kudoa septempunctata* がヒラメの筋肉中から発見され¹⁾、*K. septempunctata* が寄生した魚類が食中毒事例の原因物質となりうることが示された。これを受け、当該寄生虫

が原因と考えられる有症事例が報告された時は、食中毒事例として取り扱われることとなった²⁾。これに基づき、本県においても平成23年6月から9月に*K. septempunctata*の関与が疑われる7事例の調査を行い、有症者に提供されたヒラメ残品、有症者の吐物、有症者便を入手し *K. septempunctata*検出を試みたのでその概要を報告する。

II 材料と方法

1. 検査材料

平成23年6月から9月に県内健康福祉事務所（保健所）から管内で発生した食中毒7事例で搬入された、有症者に提供されたヒラメの残品6検体、1事例の提供ヒラメと同じ生け簀で保管されていたヒラメ9検体、有症者吐物3検体を材料とした。有症者便については他自治体で発生した事例に関連して依頼のあったもの12検体を材料と

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 齋藤 悦子

した。

2. *K. septempunctata*の検査方法

2.1 ヒラメ

ヒラメからの*K. septempunctata*検出は、厚生労働省より通知された「*Kudoa septempunctata*の検査方法について（暫定版）」³⁾に基づき実施した。

- 1) ヒラメ筋肉25 mgを採取し、QIAGEN社のQIAamp DNA mini kit（組織プロコール）によりDNAを抽出した。TaqMan probeを用いたリアルタイムPCR法でクドア属遺伝子を検出した。
- 2) ヒラメ筋肉0.5 gを秤量し、PBSを加えて軽く潰し、メッシュを通した溶液をさらに100 μmのメッシュに通してろ液を回収した。1500 rpm, 10°Cで10分間遠心し、上清を取り除き、沈渣をPBS 0.5 mLに懸濁して検体とした。血球計算板で6~7の棘囊を有する*K. septempunctata*様胞子を計測し、1 gあたりの胞子数を算出した。
- 3) リアルタイムPCR法で陽性となった検体は、28SリボソームDNAを標的としたコンベンショナルPCR法⁴⁾により*K. septempunctata*, *K. thyrsites*, *K. lateolabracis*遺伝子の検出を行った。

2.2 吐物および便

有症者の吐物はpHを中性付近に調整後、3000 rpm, 10分遠心した上清200 μlからQIAamp DNA mini kit（血液・体液プロトコール）によりDNAを抽出し、ヒラメか

ら抽出したDNAと同様にしてクドア属遺伝子を検出した。有症者便はQIAamp DNA stool mini kitを用いてDNAを抽出し、クドア属遺伝子検出の検体とした。

III 結果および考察

1. 食中毒事例における*K. septempunctata*の検出状況
今回調査した7事例はいずれも主要症状は嘔吐・下痢であり、潜伏時間の中央値も6時間前後と発症経過や臨床症状がほぼ共通していた。

供試したヒラメ残品6検体中5検体で*K. septempunctata*が陽性となり、鏡検法による胞子数は $1.1 \times 10^5 \sim 8.6 \times 10^6/g$ であった。それぞれの事例での有症率や*K. septempunctata*胞子数等をTable 1に示した。2事例では同一ヒラメについて身と縁側が採取されたため、それぞれに含まれる*K. septempunctata*胞子数を比較したところ、どちらも部位によって10倍程度の差が認められたが、胞子が多く検出される部位は区々であった（Table 1）。また、リアルタイムPCR法でクドア属陽性となった検体は、全てコンベンショナルPCR法で*K. septempunctata*陽性となり、ヒラメのジェリーミートの原因となる他の2種類のクドアは検出されなかった。

2. 代表的事例の概要

事例1)

6月24日に健康福祉事務所が医療機関より「食中毒症状を呈する患者を診察した」との通報を受けた。調査の

Table 1 Prevalence and number of *K. septempunctata* spores of olive flounder.

	Prevalence	(%)	<i>K. septempunctata</i> of olive flounder		<i>K. septempunctata</i> of vomit
			spore/g	DNA	DNA
Case 1	6 / 11	(54.5)	ND ^{a)}	positive	-
	18 / 52	(34.6)	6.0×10^6	positive	-
Case 2	11 / 52	(21.2)	8.6×10^6	positive	-
Case 3	12 / 33	(36.4)	- ^{b)}	-	positive
Case 4	4 / 10	(40.0)	ND	negative	positive
Case 5	11 / 12	(91.7)	3.2×10^5	positive	-
			$2.2 \times 10^{6c)}$	positive	
Case 6	2 / 3	(66.7)	1.3×10^6	positive	-
			$1.1 \times 10^{5c)}$	positive	
Case 7	2 / 2	(100.0)	-	-	positive

a) The olive flounder was frozen for preservation.

b) There was no olive flounder left.

c) Number of *K. septempunctata* spores of engawa.



Fig. 1 Spore of *K. septempunctata*

結果、6月23日に市内の飲食店を利用した1グループ11名のうち6名が嘔吐、下痢等の食中毒症状を呈しており、有症者にはヒラメ刺身が共通食として提供されていた。この施設は6月24日にも複数のグループから予約を受けており、同事務所による前日の事例の立ち入り調査時点で既に会食を開始していた1グループ以外にはヒラメを除いたメニューが提供されていた。6月25日になって、このヒラメを喫食したグループから有症者が出たとの連絡があり再び調査したところ、52名の喫食者中18名が食中毒症状を訴えていた。なお、24日にヒラメを除いたメニューを提供した6グループ20名からは有症者は出なかった。23日と24日に調製されたヒラメは同一の業者から仕入れられていた。

23日提供のヒラメ残品（冷凍）および24日提供のヒラメ残品（冷蔵）からリアルタイムPCR法でクドア属遺伝子が検出され、コンベンショナルPCR法で*K. septempunctata*遺伝子が検出された。24日提供ヒラメ残品から鏡検法で6~7個の棘囊を有する*K. septempunctata*と思われる $6.0 \times 10^6/\text{g}$ の孢子が検出された（Fig.1）。以上の結果から、本事例は*K. septempunctata*が寄生したヒラメを介した食中毒であることが強く示唆された。

23日提供のヒラメからは鏡検法で*K. septempunctata*孢子を確認することはできなかったが、ヒラメの加熱や凍結によって*K. septempunctata*の病原性が失われることから⁵⁾、冷凍保存により孢子が壊れたためと考えられた。

提供された個体と一緒に同施設の生け簀で保管されていた残余ヒラメ9尾についても鏡検法を実施したが、*K. septempunctata*様孢子は検出されなかった。魚類の*K. septempunctata*感染には環形動物の介在が必要であり、同じ養殖場由来のヒラメであっても汚染状況は個体によって大きな差があるとされている⁵⁾。このため、*K. se-*

*ptempunctata*の関与が疑われる事例の調査では、有症者に提供されたヒラメそのものの残品を確実に採取することが重要であると考えられた。

事例2)

6月28日に飲食店から健康福祉事務所に、6月27日に施設を利用した数名が食中毒症状を呈しているとの通報があった。調査の結果、6月27日に同施設を利用した7グループ52名中4グループ11名が嘔吐や下痢等の食中毒症状を呈しており、有症者に提供されたメニューにはヒラメの刺身が含まれていた。この施設では4枚に卸したヒラメを仕入れ、調理場で刺身に調製して客に提供していた。提供ヒラメ残品からクドア属遺伝子、*K. septempunctata*遺伝子および*K. septempunctata*孢子（ $8.6 \times 10^6/\text{g}$ ）を検出した。

事例3)

8月1日に健康福祉事務所が医療機関より「7月31日に同一の飲食店を利用した複数の食中毒様患者を診察した」との連絡を受けた。調査の結果、7月31日に施設を利用した3グループ33名のうち12名が嘔吐、下痢等の食中毒症状を呈していることが判明した。有症者には共通してヒラメの刺身が提供されていた。

同施設ではヒラメを提供した31日当日に3尾を仕入れ、このうち2尾を刺身に調製して1尾を有症者が出た3グループを含む4グループに提供し、他の1尾は有症者が出なかった4グループに提供していた。ヒラメは全て消費されておりこの残品はなかったが、1名の有症者から吐物が採取された。この吐物は5回嘔吐したものを全て合わせたもので、米飯等ヒラメ以外の食品が大量に混在しており、ヒラメの肉片の有無を確認することはできなかった。このため、ヒラメや*K. septempunctata*孢子はある程度消化されていると考え、吐物をよく混合し、pH調整後遠心した上清を検体とした。リアルタイムPCR法でクドア属遺伝子を、コンベンショナルPCR法で*K. septempunctata*遺伝子を検出した。

3. 臨床検体からの*K. septempunctata*の検出

今回の7事例では、事例3)を含めた3事例で有症者吐物が採取され、その全てから*K. septempunctata*が検出されたことから、吐物が検体として有用であることが確認された。また、*K. septempunctata*による食中毒では有症者の吐物には原因食以外の食品が多く含まれることが想定される。これらが原因となり、検体の採取法やその後の保存法の違いによっては偽陰性の結果となる場合も考えられることから、*K. septempunctata*遺伝子の検出については、前処理や抽出法についてさらに検討が必

要と考えられる。

黄色ブドウ球菌や*K. septempunctata*のような嘔吐を初発や主要症状とする感染症であっても、吐物が検体として採取される機会は少ない。また、給食施設等と異なり一般飲食店では検食保存の基準はなく、さらにヒラメは生で喫食されることから調理当日に消費されることがほとんどで、提供ヒラメ残品が保存される場合も限られている。採材が比較的容易であるため、便を対象にした検出法についても今後検討する必要があると考えられる。今回、有症者便を対象にクドア属遺伝子の検出を実施したところ、リアルタイムPCR法で反応終盤に微弱なピークの上昇が認められる検体があったが、これらはコンベンショナルPCR法では*K. septempunctata*と確認することができなかつたため、最終的に*K. septempunctata*陰性と判定した。また、現在リアルタイムPCR法に推奨されているプライマーおよびTaqMan プローブは*K. septempunctata*以外のクドア属にも交差反応があることから、プライマー等の改良も必要と思われる。

IV 要 旨

平成23年に兵庫県内で*K. septempunctata*の関与が疑われる食中毒が7事例発生した。5事例で提供ヒラメ残品8検体が確保され、6検体で*K. septempunctata*様胞子 ($1.1 \times 10^5 \sim 8.6 \times 10^6/g$) を、7検体から*K. septempunctata*遺伝子を検出した。1事例では提供ヒラ

メと同一の水槽で保管されていたヒラメ9尾についても調べたが、鏡検法で*K. septempunctata*様胞子は確認されなかつた。3事例では有症者の吐物から*K. septempunctata*遺伝子を検出し、有症者吐物が検体として有用であることが確認された。有症者便からは明らかな陽性反応は確認できなかった。

文 献

- 1) Y. Matsukawa, H. Sato, S. Tanaka, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi: *Kudoa septempunctata* n.sp. (Myxosporae: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea., Parasitol. Res., 107, 865-872 (2010)
- 2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について、平成23年6月17日, 食安発0617第3号
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: *Kudoa septempunctata*の検査方法について(暫定版)平成23年7月11日, 食安監発0711第1号
- 4) 水産庁増殖推進部長通知: クドア属3種についてのPCR検査手順(2011年2月8日版)平成23年6月17日, 23水推第277号別紙
- 5) 大西貴弘: *Kudoa septempunctata*を原因微生物とする食中毒, 食品衛生研究, 61, 13-20 (2011)