

## クドア食中毒事例等における患者便からのクドア遺伝子の検出について

徳島県立保健製薬環境センター

下野 生世・石田 弘子・嶋田 啓司

Detection of *Kudoa septempunctata* 18S rDNA in Patient Fecal Samples from Outbreaks of food poisoning caused by  
*Kudoa septempunctata*

Ikuyo SHIMONO, Hiroko ISHIDA and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

### 要 旨

H23年～24年度に県内で発生した *Kudoa septempunctata* (以下「クドア」という。)による食中毒2事例の患者便について、クドア遺伝子の検出を試みたところ、8検体中6検体から検出された。また、同様の方法で、過去にクドア食中毒が疑われたが、ヒラメ残品が入手できず、原因が特定できなかった1事例の患者凍結便8検体について検査を実施したところ、8検体中3検体からクドア遺伝子が検出され、当該事例もクドア食中毒であったことが推察された。

Key words : 糞便 Stool, クドア・セプテンpunkタータ *Kudoa septempunctata*

### I はじめに

平成23年6月17日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知<sup>1)</sup>により、ヒラメに寄生する *Kudoa septempunctata* 及び馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* が食中毒原因物質として取り扱われることとなった。また、平成23年7月11日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知により「*Kudoa septempunctata*の検査法について(暫定版)」が示され、ヒラメの筋肉から顕微鏡による検査法、リアルタイムPCRによるスクリーニング法が示されているところである<sup>2,3)</sup>。

一方、患者の症状や喫食調査等の状況証拠からクドア食中毒を疑う事例であっても、原因食品となったヒラメの残品の確保が難しいことから、原因不明となる事例も多くある。患者便からのクドア遺伝子の検出については、現在のところ公定法は無いが、原田らが開発したスクリーニング方法<sup>4,5)</sup>が公開されている。

そこで、今回この方法を用いて、クドア食中毒2事例を含む3事例の患者便からクドア遺伝子のスクリーニング検査を実施したので報告する。

### II 材料及び方法

#### 1 材料

##### (1) 患者便

クドア食中毒2事例における患者便計8検体、及び症状や喫食調査からクドアが原因として疑われたが、ヒラメ残品が無く原因が特定できなかった1事例の患者便(−20℃凍結保存)8検体を使用した。

##### (2) 事例詳細

###### ① 事例1

平成24年11月10日夕食喫食者25名(2グループ)中7名(1グループ)、翌11日の昼食若しくは夕食喫食者32名(4グループ)中15名(3グループ)が発症し、発症率は38.6%であった。症状は、嘔吐(81.8%)、下痢(81.8%)を主徴とし平均潜伏時間は5時間13分であった。なお、患者7名の検便からノロウイルスや有意な食中毒細菌は検出されなかった。また、2日間に使用したヒラメ3匹のうち1匹の残品から $3.2 \times 10^7$  個/gのクドア胞子が検出されたことから、クドアが食中毒の原因物質であると特定された。

## ② 事例2

平成24年1月27日夕食喫食者8名（2グループ）中7名が発症し、発症率は87.5%であった。症状は、下痢（100%）、嘔気（71.4%）、悪寒（71.4%）を主徴とし平均潜伏時間は、7時間30分であった。なお、患者便2検体からノロウイルス及び、有意な食中毒菌は検出されなかった。

また、夕食に供されたヒラメ残品から、 $1.3 \times 10^7$  個/gのクドア孢子が検出されたことから、クドアが食中毒の原因物質であると特定された。

## ③ 事例3

平成23年9月28日に提供された食事の喫食者46名（3グループ）中17名（2グループ）が発症し、発症率は37.0%であった。症状は、下痢（76.0%）、発熱（76.0%）、倦怠感（76.0%）を主徴とし平均潜伏時間は8時間であった。なお、患者便8検体からノロウイルス、有意な食中毒菌は検出されなかった。

この事例については患者グループに共通した食材（ヒラメ等生食用魚介類）が提供されていたが、残品が無く原因物質の特定には至らなかった。

## 2 方法

### (1) ポジティブコントロールDNAの作成

クドア陽性のヒラメ筋肉を用いてクドア孢子液を作成した後、顕微鏡法<sup>3)</sup>にて孢子数を測定後、 $10^6$  個/gオーダーに希釈し、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals社)を用いDNA抽出後ポジティブコントロールとした。

### (2) 糞便からのDNA抽出

糞便からのクドア遺伝子の抽出には、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals社)を用い、原田らの方法<sup>4)</sup>に準じ実施した。なお、機器の都合上FastPrep Instrumentの代わりにマルチビーズショッカー（安井器械）を用い2500 rpm 90 secの条件で試料の破碎を行った。

また、糞便試料については、希釈なしと10倍希釈で調整し、両者で検出率の比較を行った。

### (3) リアルタイムPCRによる検出

原田らが開発したK.septempunctataの18S rDNAの検出系<sup>5)</sup>に一部変更を加えた方法を用い実施した。すなわち、リアルタイム反応液を表1のとおり作成し、サンプルを2  $\mu$ Lを加えた後リアルタイムPCR装置 (ABI7500 Fast) を用い、95  $^{\circ}$ C 30秒、[95  $^{\circ}$ C 5秒  $\rightarrow$  60  $^{\circ}$ C 30秒] 45サイクルで実施した。

表1 リアルタイムPCR反応調整液

反応調整液	1 assay
Premix EX Taq(2 $\times$ )	12.5 $\mu$ l
プライマー・プローブミックス*	2.5 $\mu$ l
ROX Reference Dye II	0.5 $\mu$ l
D. W.	7.5 $\mu$ l
Template	2 $\mu$ l
(反応液 total)	25 $\mu$ l

\* 最終プライマー濃度0.4  $\mu$  M, プローブ濃度0.2  $\mu$  M

## III 結果及び考察

各事例における糞便試料の状況及び検査結果は表2のとおりである。

表2 各事例における検体情報及び検査結果

事例No	検体情報			クアスクリーニング検査	
	摂食～搬入	潜伏時間	便性(搬入時)	便(希釈なし)	10倍希釈便
1	2.5日	8:00	普通	陽性	陽性
	3日	8:00	普通	陰性	陰性
	3日	5:00	普通	陽性	陽性
	3日	4:00	普通	陽性	陽性
	3日	4:30	普通	陽性	陽性
	4日	2:30	普通	陽性	陽性
	4日	7:00	軟便	陰性	陰性
2	1.5日	10:30	軟便		陽性
3	1.5日	6:30	水様		陽性
	1.5日	7:00	普通		陽性
	2.5日	11:30	普通		陰性
	2.5日	11:30	水様		陰性
	2.5日	5:30	軟便		陽性
	2.5日	3:30	軟便		陰性
	2.5日	11:00	普通		陰性
	3.5日	16:00	普通		陰性

事例1の糞便試料で、原液及び10倍希釈便についてクドア遺伝子の検出を試みた結果、検体の希釈の有無にかかわらず、7検体中5検体で増幅産物が検出された。このことから、検体の取り扱いが容易である10倍希釈便の使用が可能であると考え、以降の検体は10倍希釈便を使用した。

原田らの報告<sup>6)</sup>によれば、原因物質の喫食から検体採取までの時間が2.5日を越えると検出率はかなり低下するとされている。事例1では、喫食から検体搬入までの時間が3日であり、事件の迅速な探知と検便容器の配布により、短時間で検体搬入がされたことが、高い検出率(71.4%)につながったと考えられた。

事例2においては、1検体中1検体から増殖産物が検出された。

事例3では、8検体中3検体から増殖産物が検出され、事例3はクドア食中毒であることが推察された。

この事例では原因物質の喫食から、検体採取までの時間が2.5日未満であったにもかかわらず、検出率がやや低い結果であった。原田らは、便の粘度や組成の違いにより、抽出効率や増幅効率に変化すると述べている<sup>6)</sup>。今回の検体は、凍結保存検体であり、凍結による便性の変化が検出率に影響していることも考えられた。

#### IV まとめ

クドア食中毒の場合、提供されたヒラメが残っていないことも多く、原因の特定が困難となっている。今回、クドア食中毒（ヒラメ残品からクドア胞子を $1.3 \times 10^7$  個/g 及び $3.2 \times 10^7$  個/g 検出）2事例及びクドアが原因と疑われた事例（ヒラメ残品なし）に関連した患者便について、原田らの開発した系を用いクドア遺伝子の検出を実施したところ、全ての事例でクドア遺伝子が検出された。このことにより、ヒラメ残品の無かった1事例についてもクドアが原因であったことが推察された。いずれの事例も、喫食から検便まで2.5日以内であったと推定され、クドア食中毒において、探知から検便容器配布までの迅速な対応が原因究明に重要であると考えられた。

#### 謝辞

稿を終えるにあたり、糞便からのクドアの検出方法について技術指導いただきました、愛媛県立衛生環境研究所の鳥谷竜哉先生に深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 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，食安発0617第3号，平成23年6月17日
- 2) 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 の検査法について（暫定版），食安監発0711第1号，平成23年7月11日
- 3) kudoa 胞子の顕微鏡検査法，  
[http://www.nihs.go.jp/kanren/kudoa\\_houshi\\_20110711-01.pdf](http://www.nihs.go.jp/kanren/kudoa_houshi_20110711-01.pdf)
- 4) 大阪府公衆衛生研究所ホームページ：患者便からの kudoa septempunctata 遺伝子検出法＞試料からの DNA 抽出，  
<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik1.html>
- 5) 大阪府公衆衛生研究所ホームページ：患者便からの kudoa septempunctata 遺伝子検出法＞リアルタイム PCR による検出，  
<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik2.html>
- 6) Harada T, et al. : J. Clin. Microbiol. , 50, 2964-2968 (2012)