The background of the slide is a microscopic image showing several Giardia trophozoites. These organisms are pear-shaped and have a characteristic eight-lobed internal structure, with four pairs of flagella extending from the periphery. They are arranged in a somewhat circular pattern across the frame.

グジアによる 新しい寄生虫性食中毒

国立医薬品食品衛生研究所
大西貴弘

原因不明食中毒とは

既知の病原物質が検出されない

症状

- 食後、2時間から数時間程度で発症
- 一過性の嘔吐、下痢、予後良好

原因食材

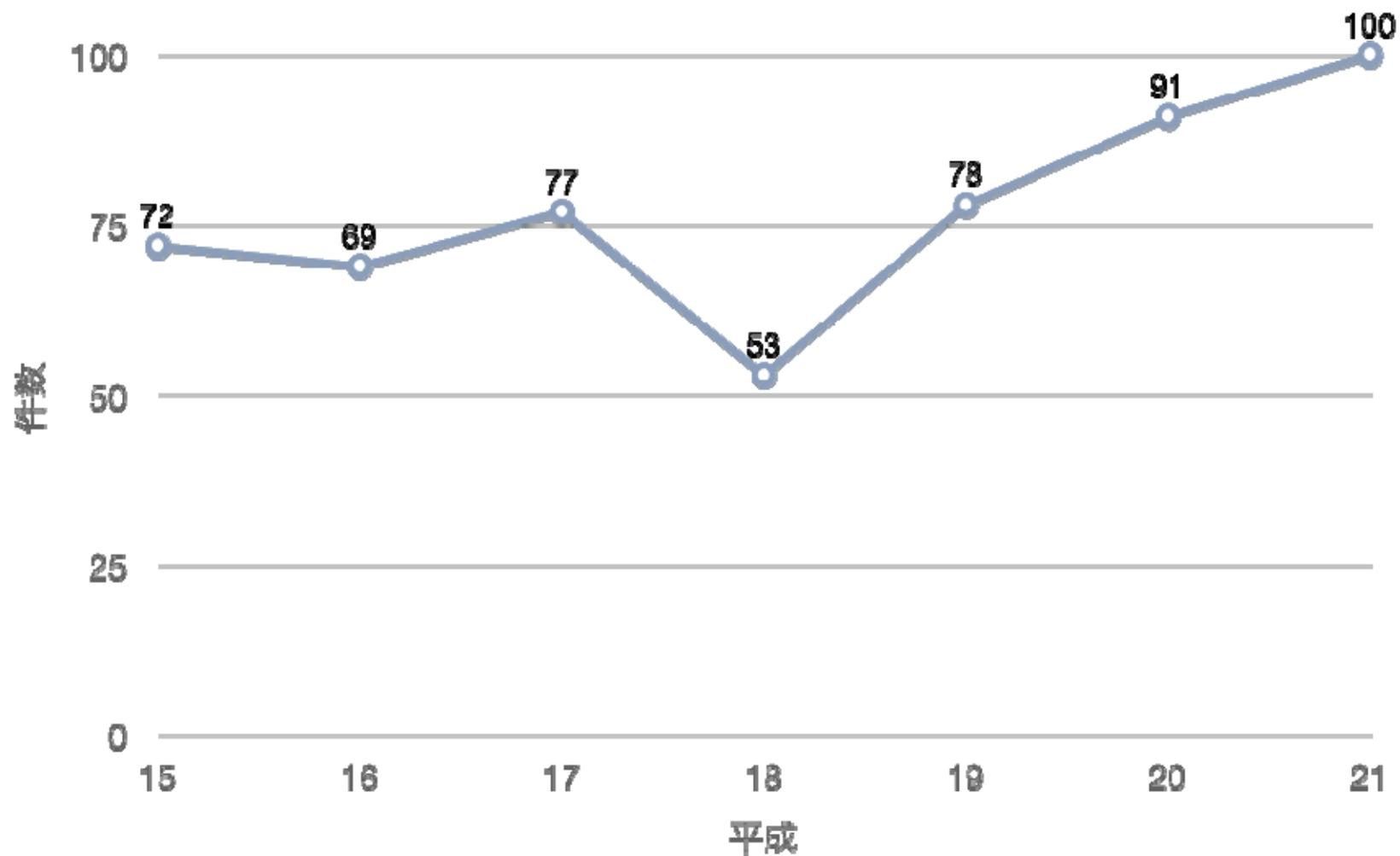
- 新鮮魚介類や生鮮獣肉

発生状況

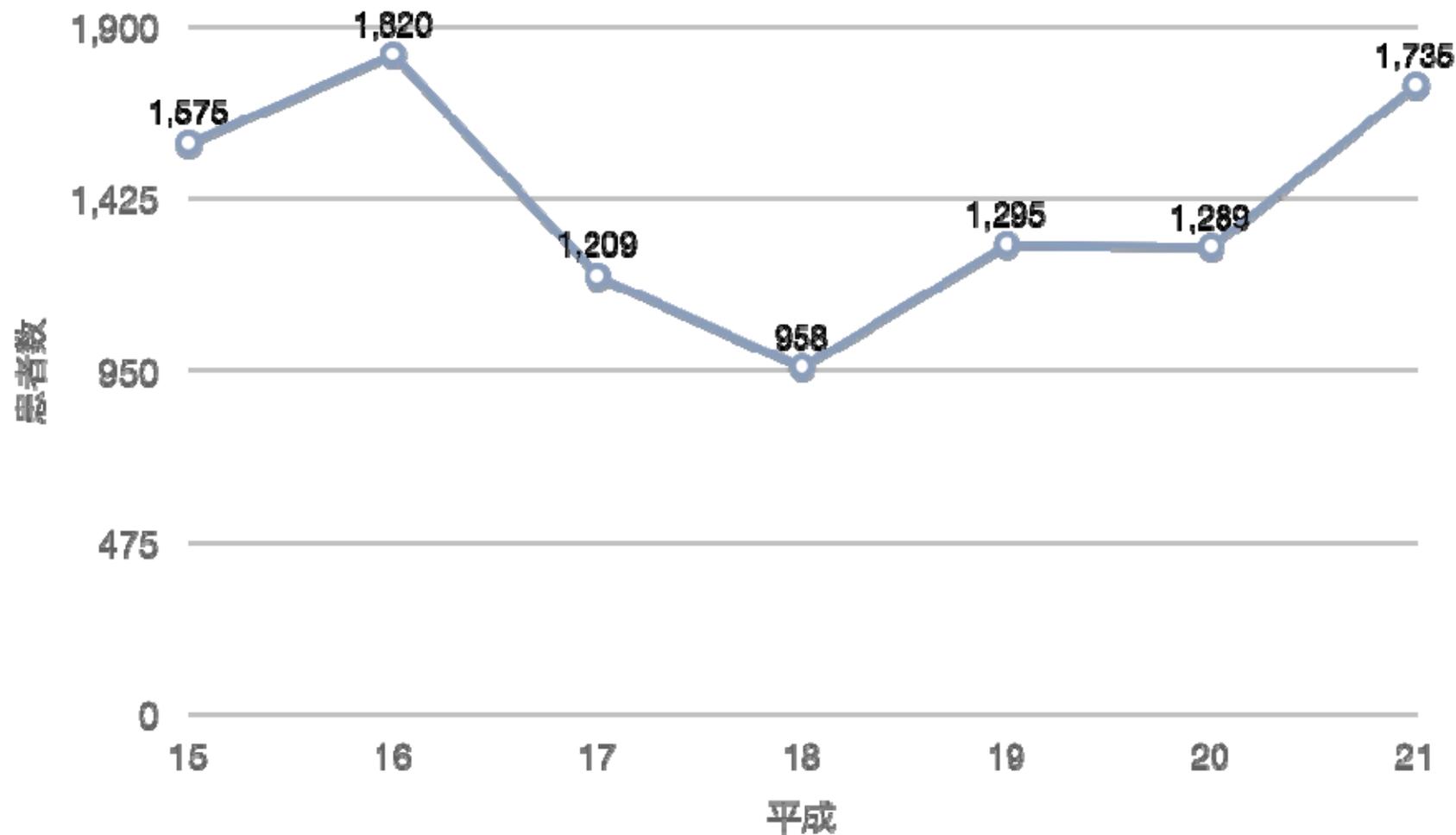
- 年間100件を超える事例が発生
- 平成22年10月
A県で患者数113名の集団発生

病原物質を特定できないため、
対策を講じることが困難

原因不明食中毒事例数



原因不明食中毒の患者数



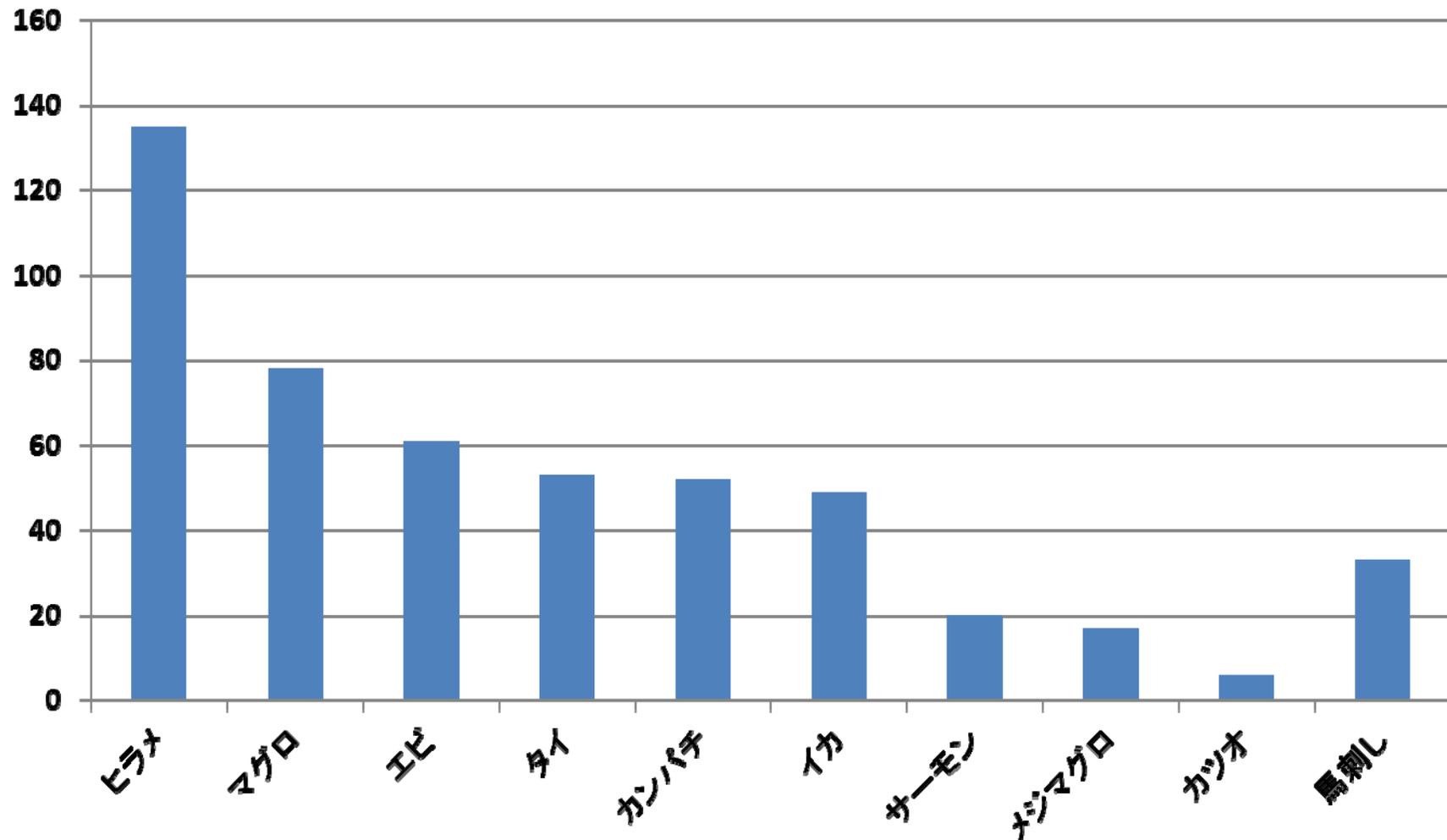
潜伏時間が短い

- 食後2時間から数時間程度
- 化学物質にしては遅すぎる
- 細菌やウイルスにしては早すぎる

何らかの未知の物質が関与している可能性

メニューに含まれていた生鮮魚介類

件数



ヒラメに含まれるDNAの網羅解析

- 食中毒残品のヒラメと市場流通ヒラメ、それぞれに含まれるDNAを網羅的に解析
- 食中毒残品にだけ含まれているDNAを同定
- 原因微生物を推定

食中毒残品
DNA

—

市場流通品
DNA

=

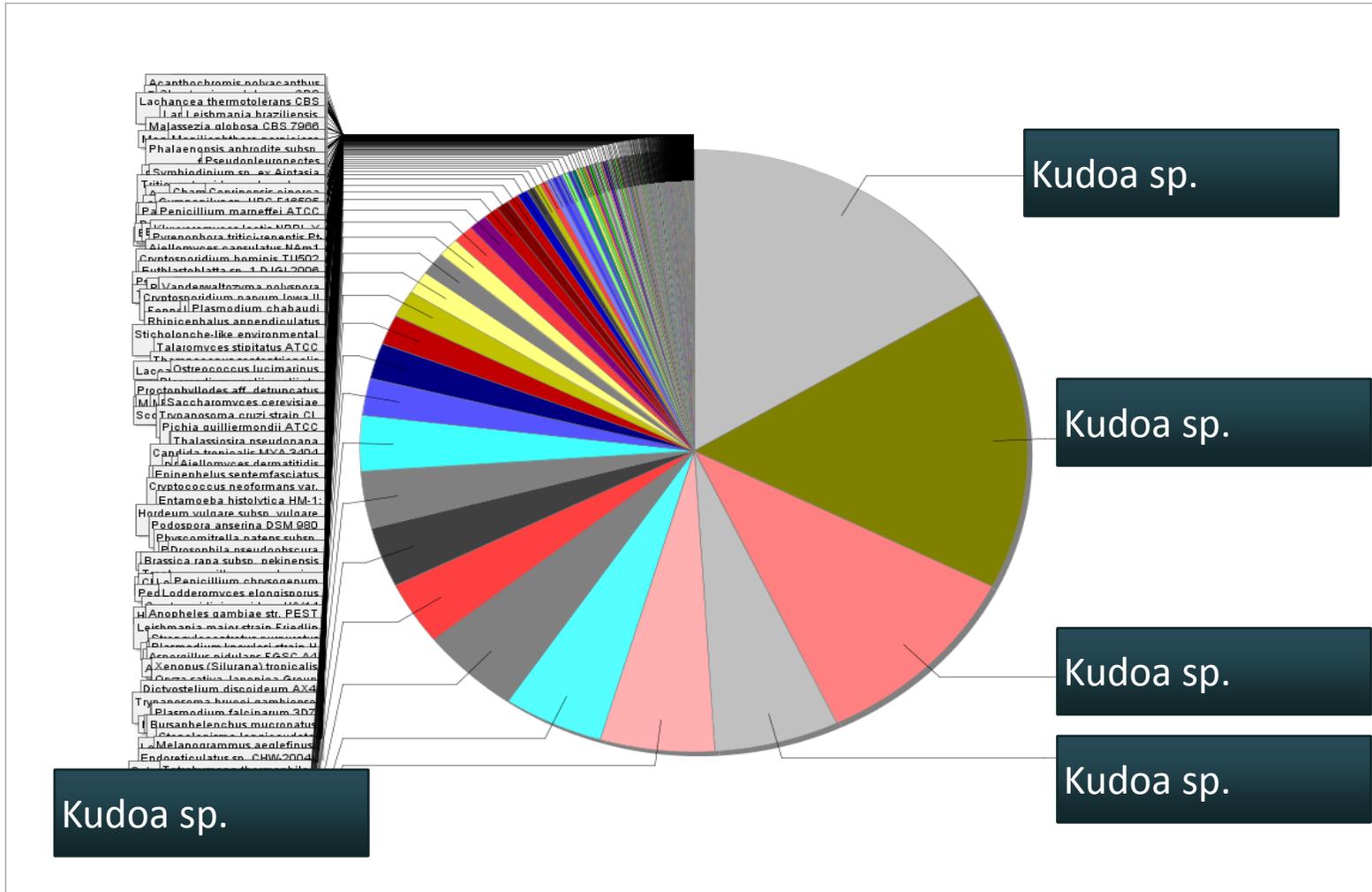
原因微生物の
DNA

ヒラメに含まれていたDNA

- 2,832,970リード中
 - 細菌 783
 - 真核生物 476,439
 - ウイルス 797
 - 不明 28,580
 - No hit 2,326,371

DNA網羅解析による病原体候補

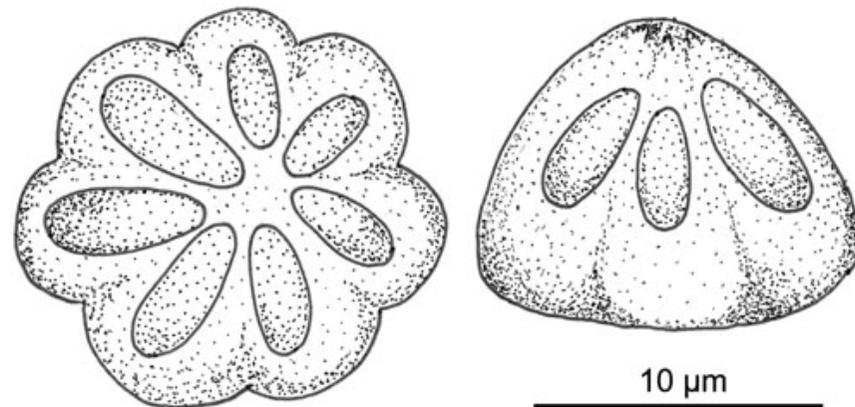
Taxa identified for 'HIRAME-0904-80mer.trimmed_HirameCon-NoHits_megablast-nt.rma'



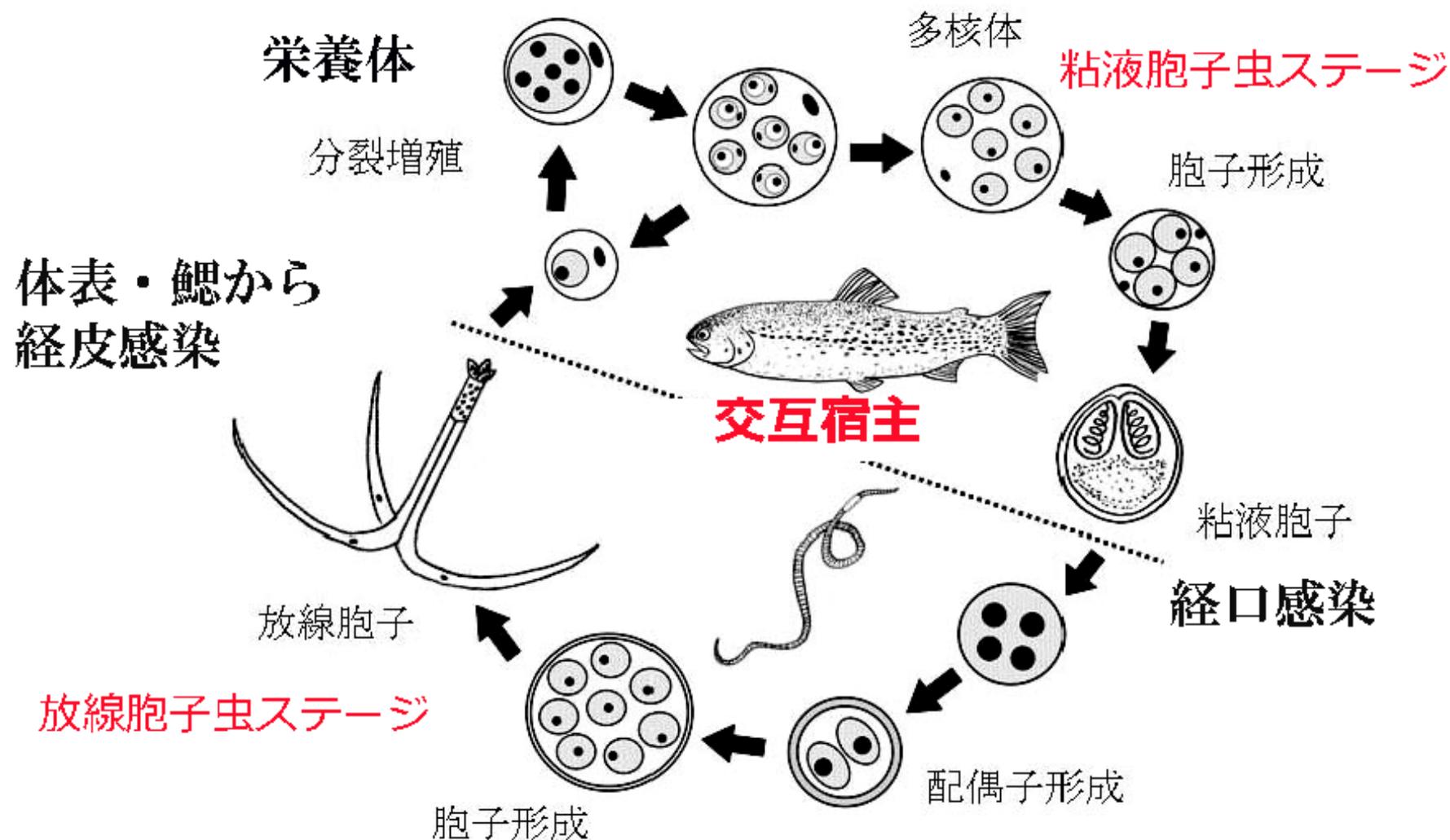
NID 微生物ゲノムセンター 黒田 誠 博士 提供

*Kudoa septempunctata*とは

- 新しい粘液胞子虫の一種でヒラメの筋肉に寄生する
- 6もしくは7の極嚢を有する
- 10 μm
- 生活環は魚と環形動物との間で維持されている
- 発症推定摂取量 7.2×10^7



生活環



環形動物（淡水種はイトミミズ、海産種はゴカイ等）が介在

A県事例品と同一ロットヒラメ中のクドア孢子数

Kudoa孢子数 (孢子数/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

クドア孢子の毒性評価法

下痢毒性

- 乳のみマウス試験

嘔吐毒性

- スンクスの嘔吐試験

ヒトへの毒性

- ヒト腸管細胞

乳のみマウスに対する下痢毒性

乳のみマウスの胃内に精製クドアを直接投与

投与後1.5時間

- 腸管に液体貯留
が認められる



投与後4時間

- 下痢症状呈する
- 液体貯留は解消される



スunksに対する嘔吐毒性

スunksは嘔吐する実験動物として、
各種嘔吐モデルに使用されている

精製クダアをスunksの胃内に直接投与

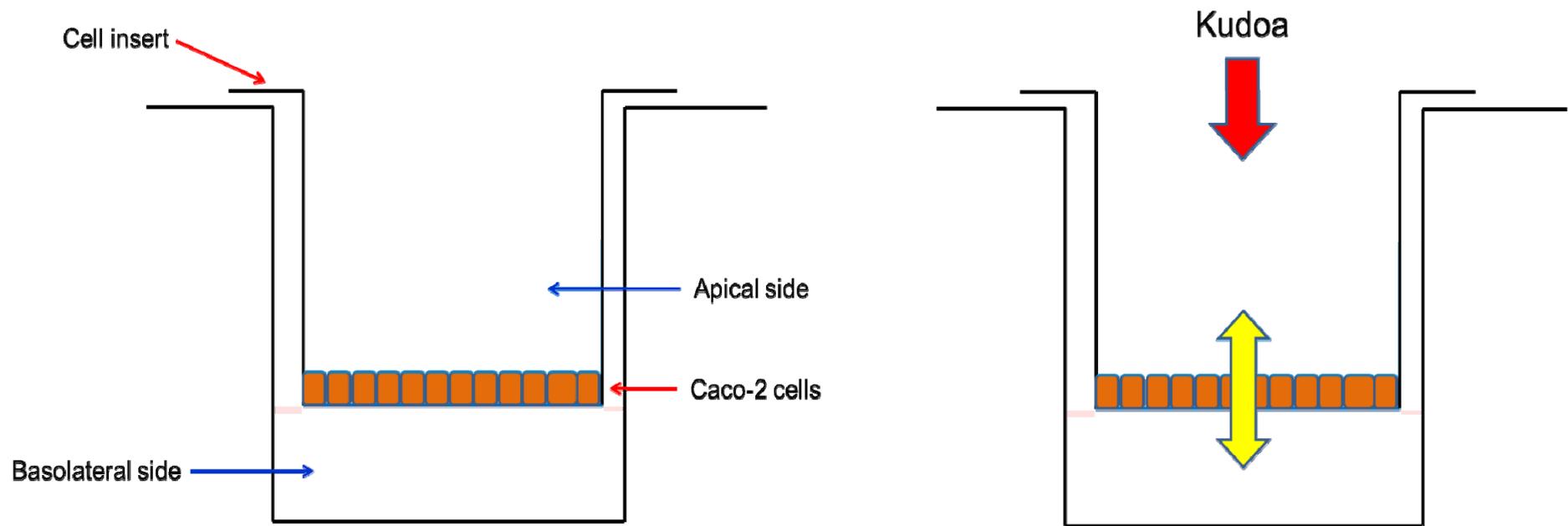
投与後20～30分で嘔
吐を開始する



1回の投与で3回以上
の嘔吐を繰り返す

- ヒラメを食べるように訓練したスunksに摂食させても嘔吐は起こる
- クダアの容量依存的に嘔吐を起こす確率が上昇する
- 凍結したクダアでは嘔吐を起こさない
- 冷蔵保存すると活性が減少

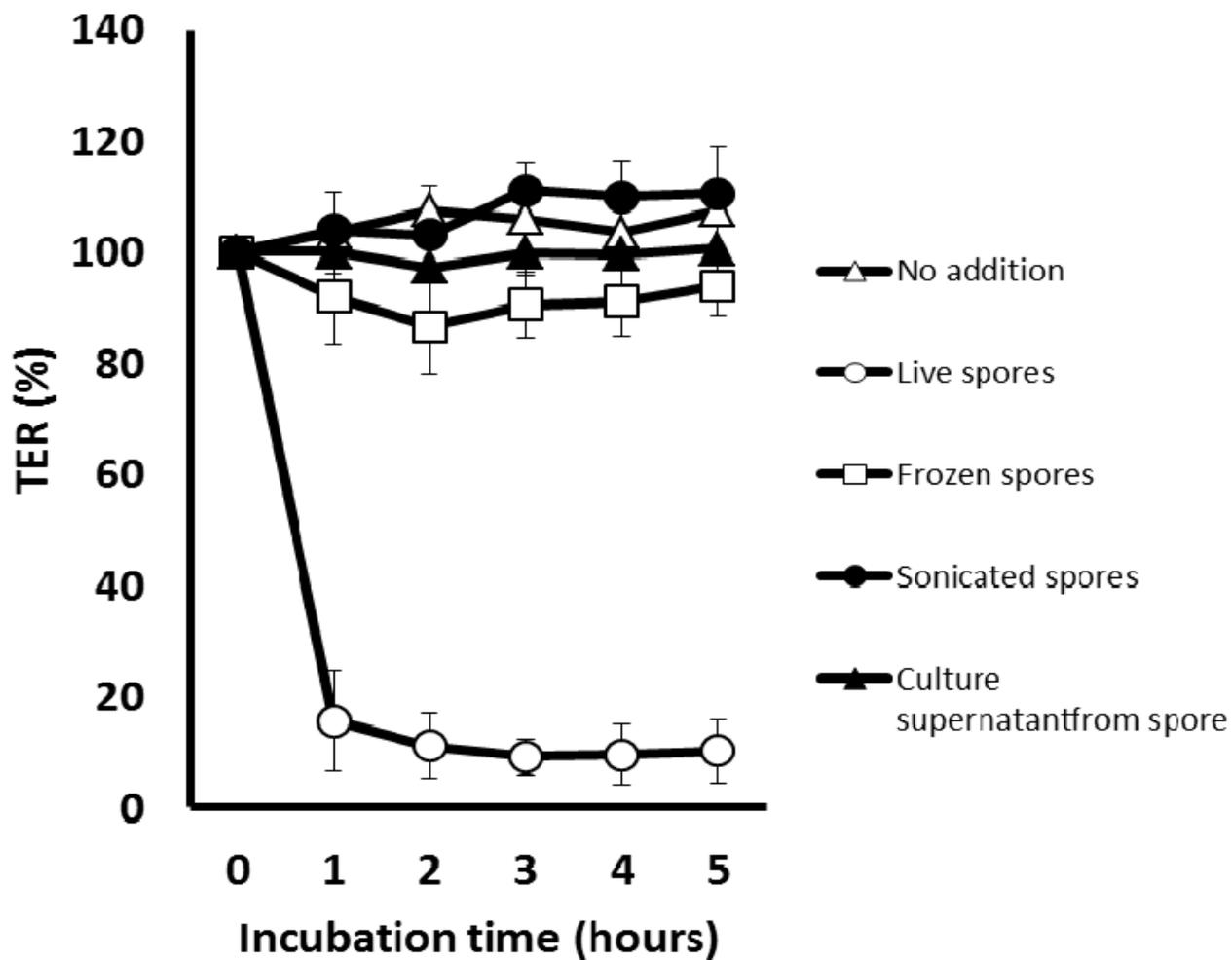
*Kudoa*感染モデルの作成



Caco-2細胞層の物質透過性を測定

*Kudoa*感染によって物質透過性が変化するか？

*Kudoa*のCaco-2細胞に対する毒性



*Kudoa septempunctata*の病原性

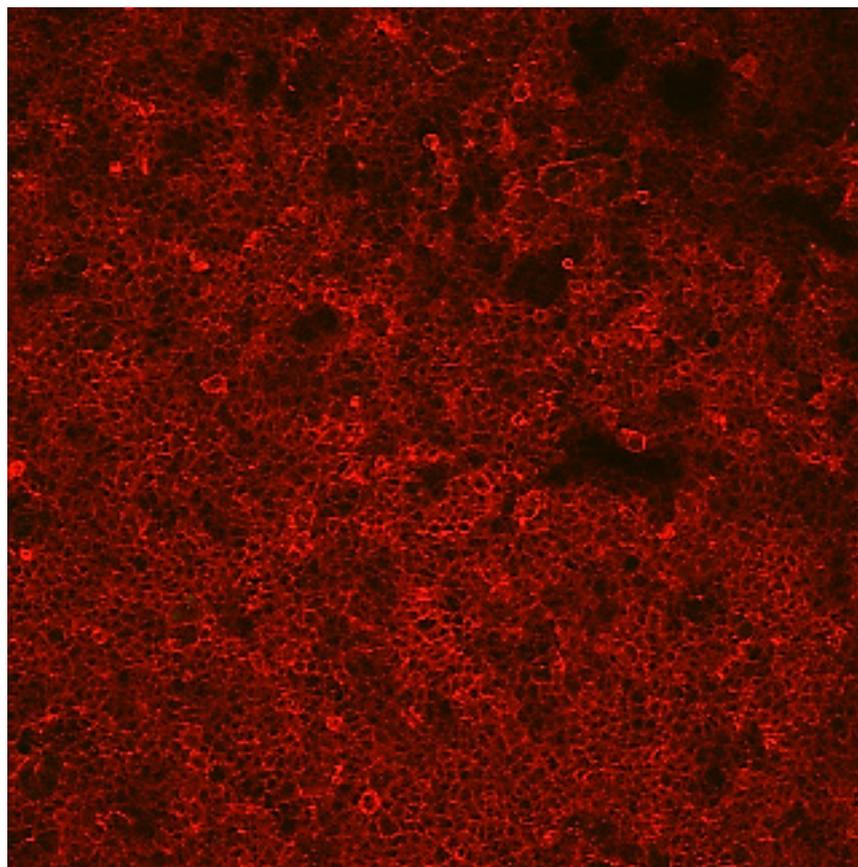
- 毒素
- 細胞侵入



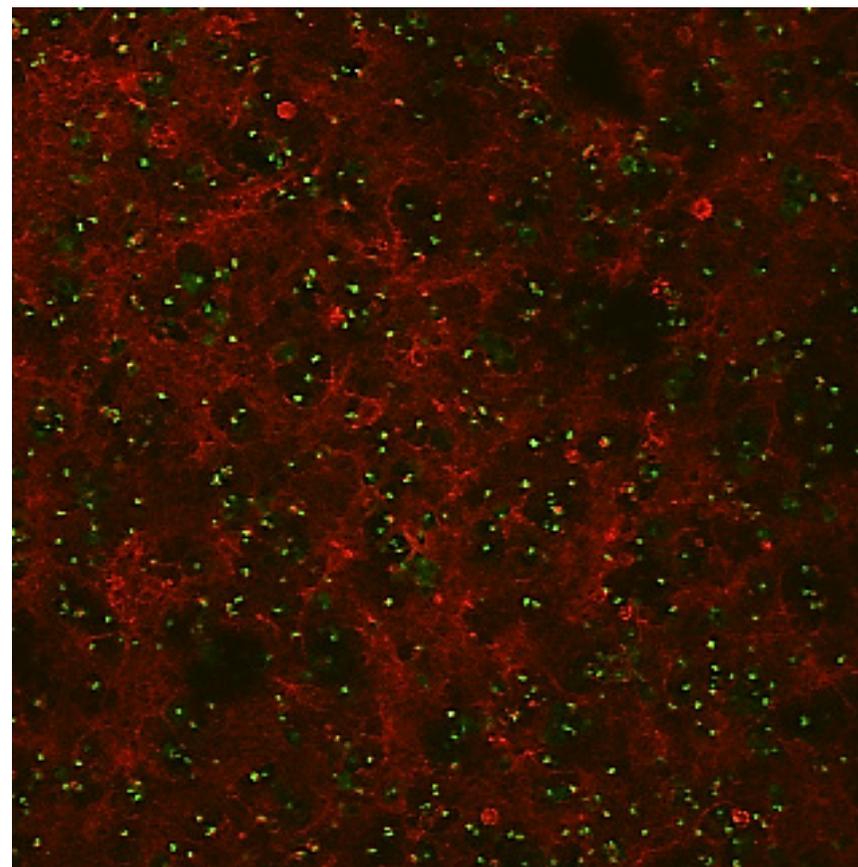
- 下痢原性
- 催嘔吐性

*Kudoa*のどのようなファクターが病原性に結びつくのか？

*Kudoa*のCaco-2細胞に対する毒性

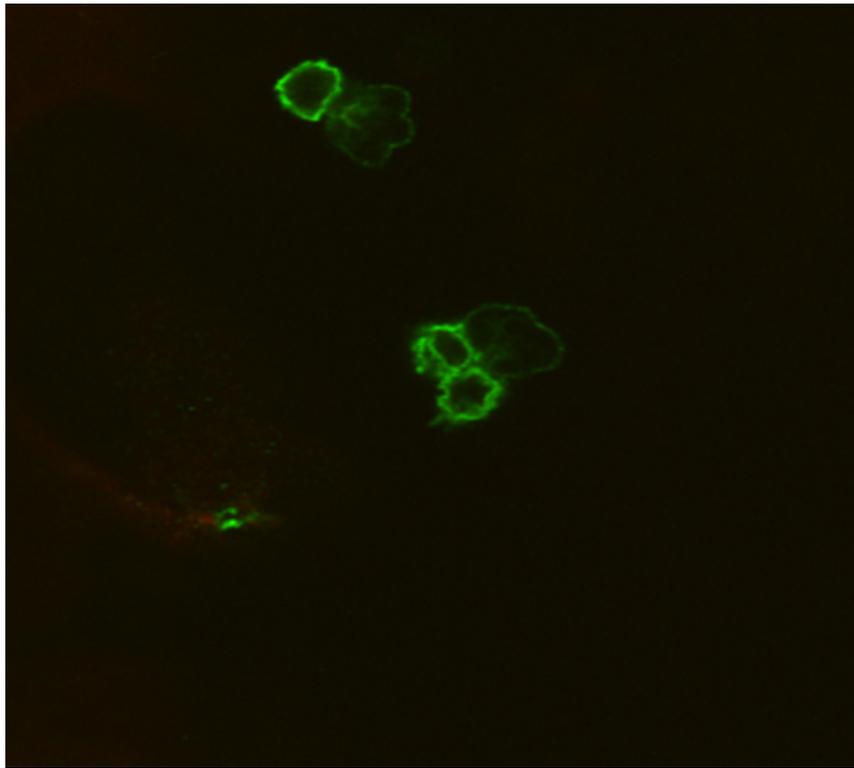


コントロール

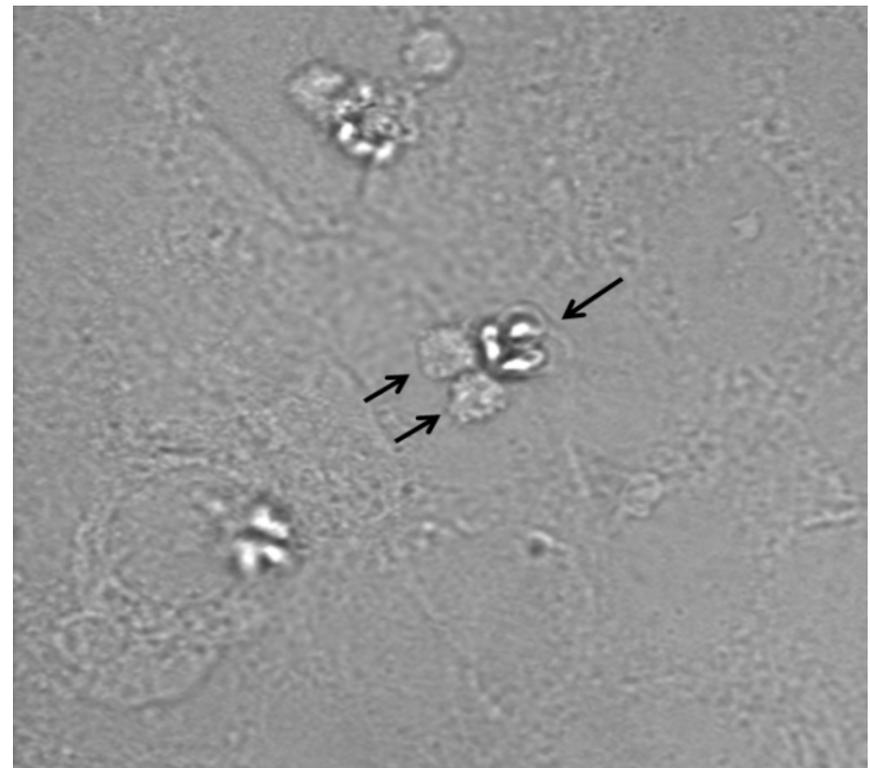


*Kudoa*接種後1時間

孢子原形質

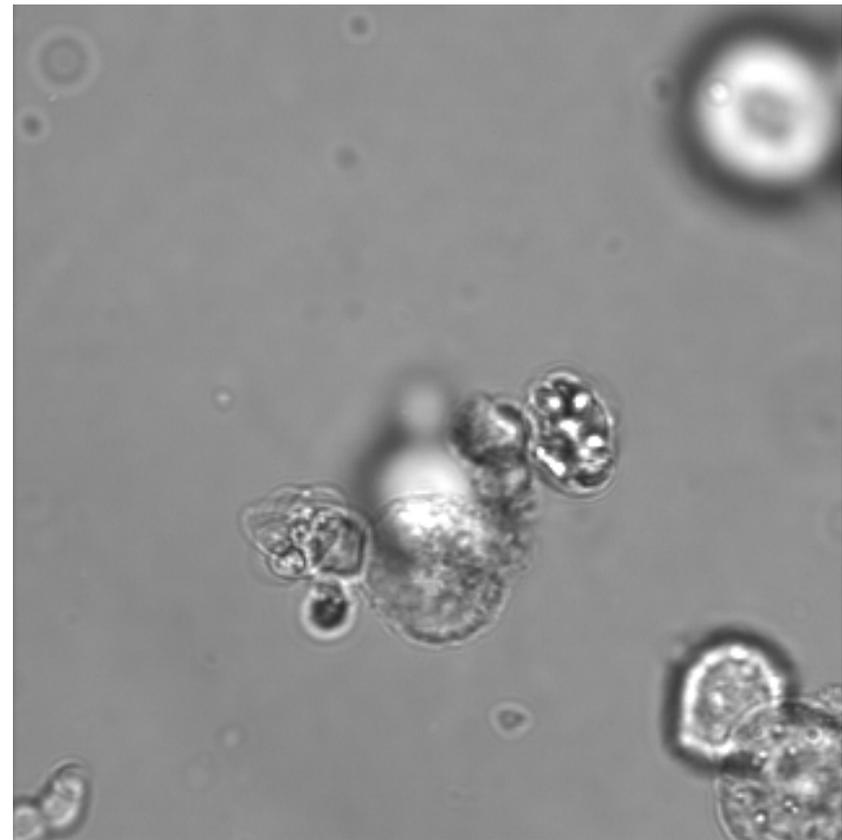
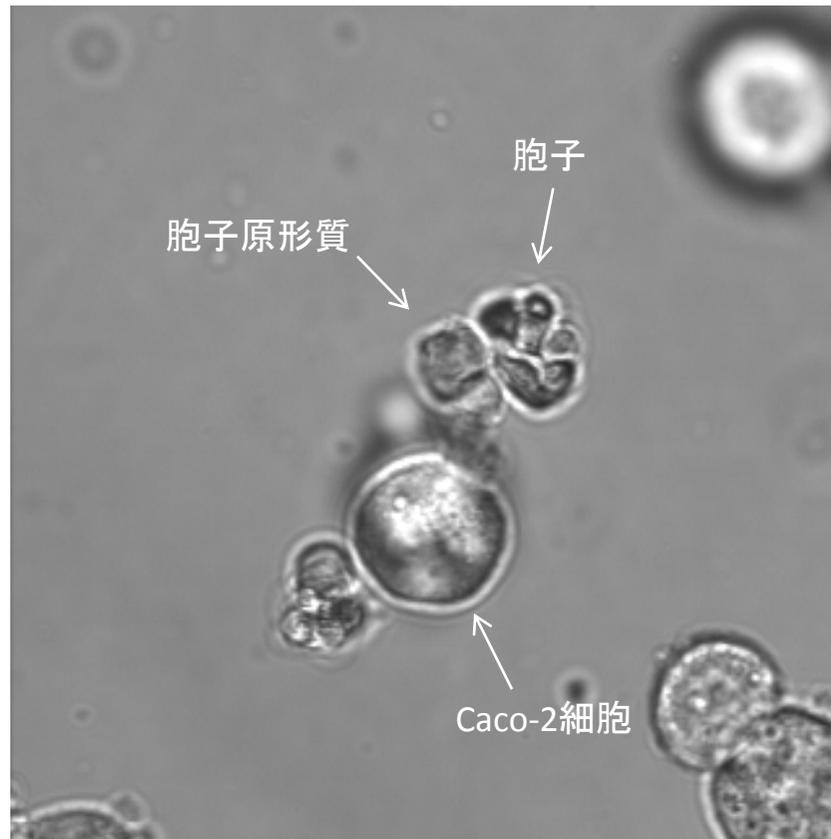


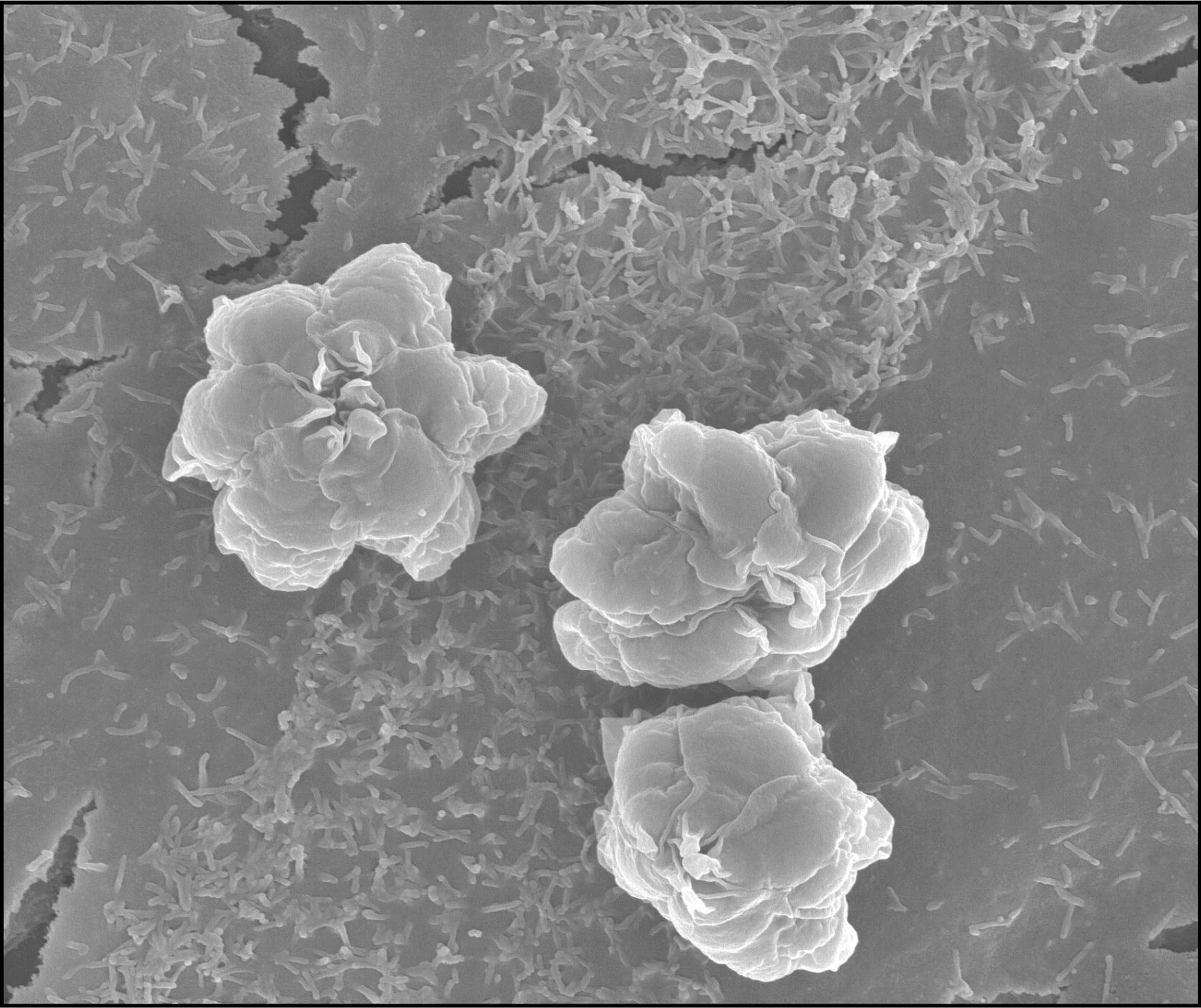
α -K. septempunctata

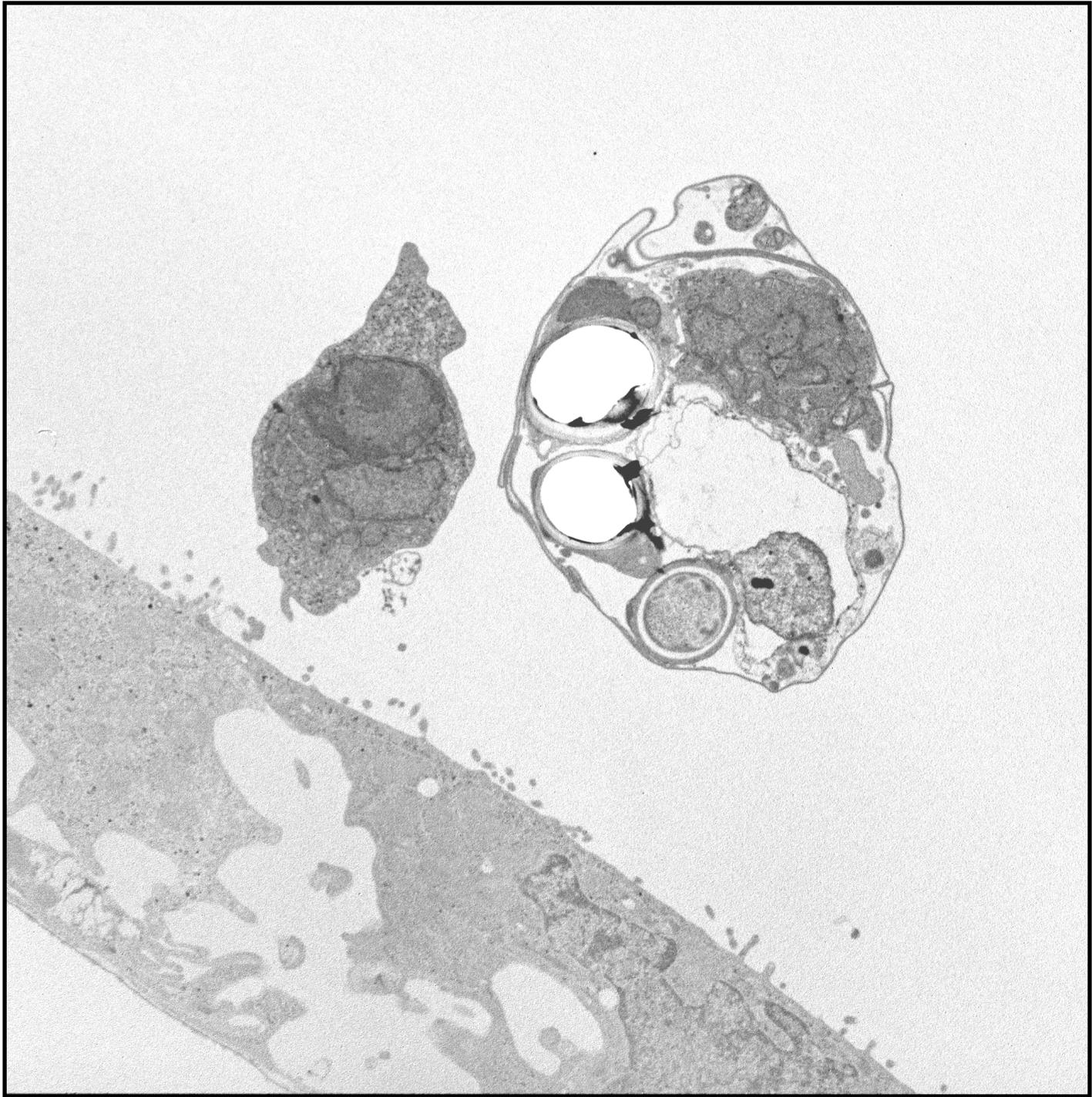


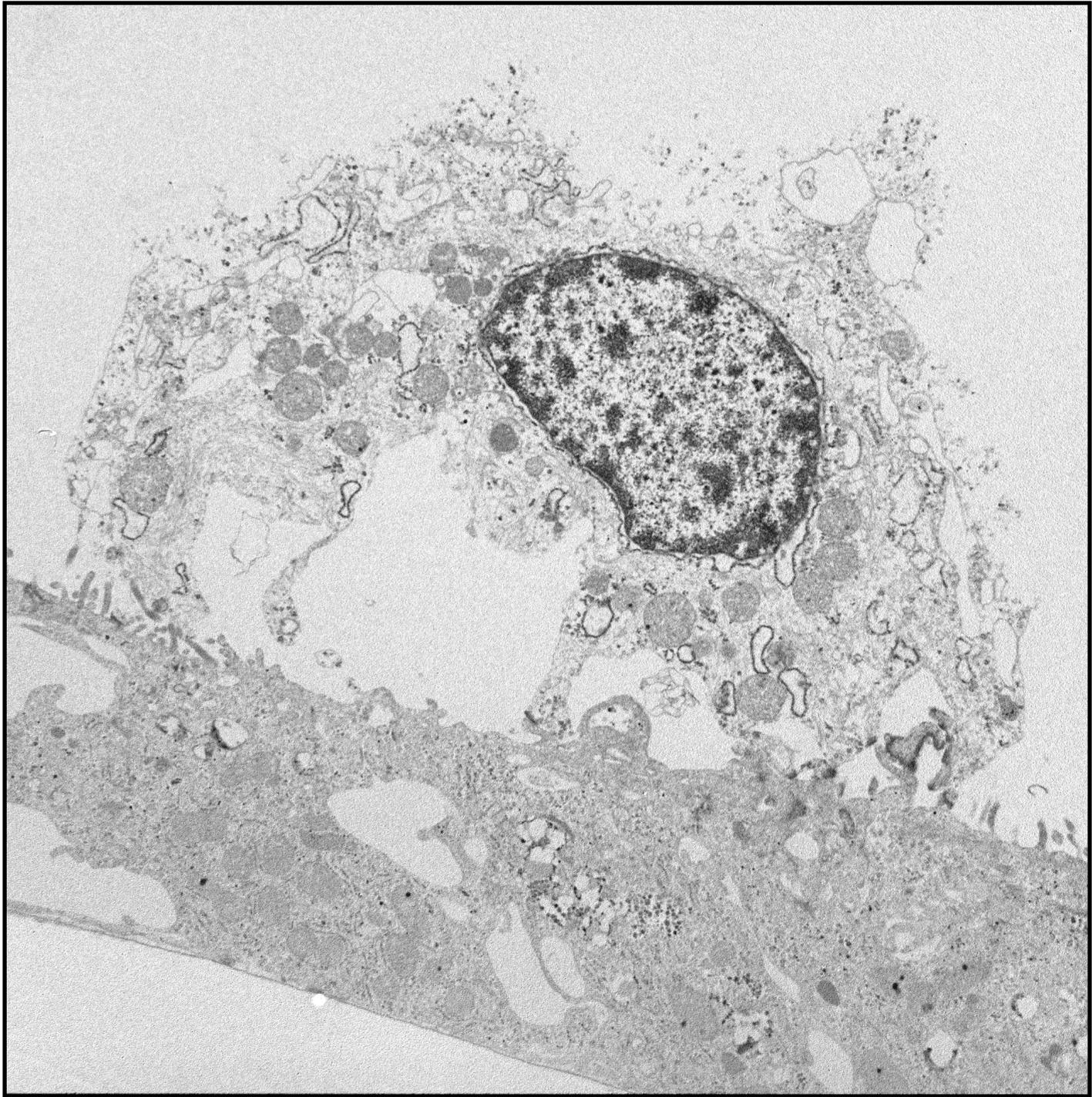
DIC

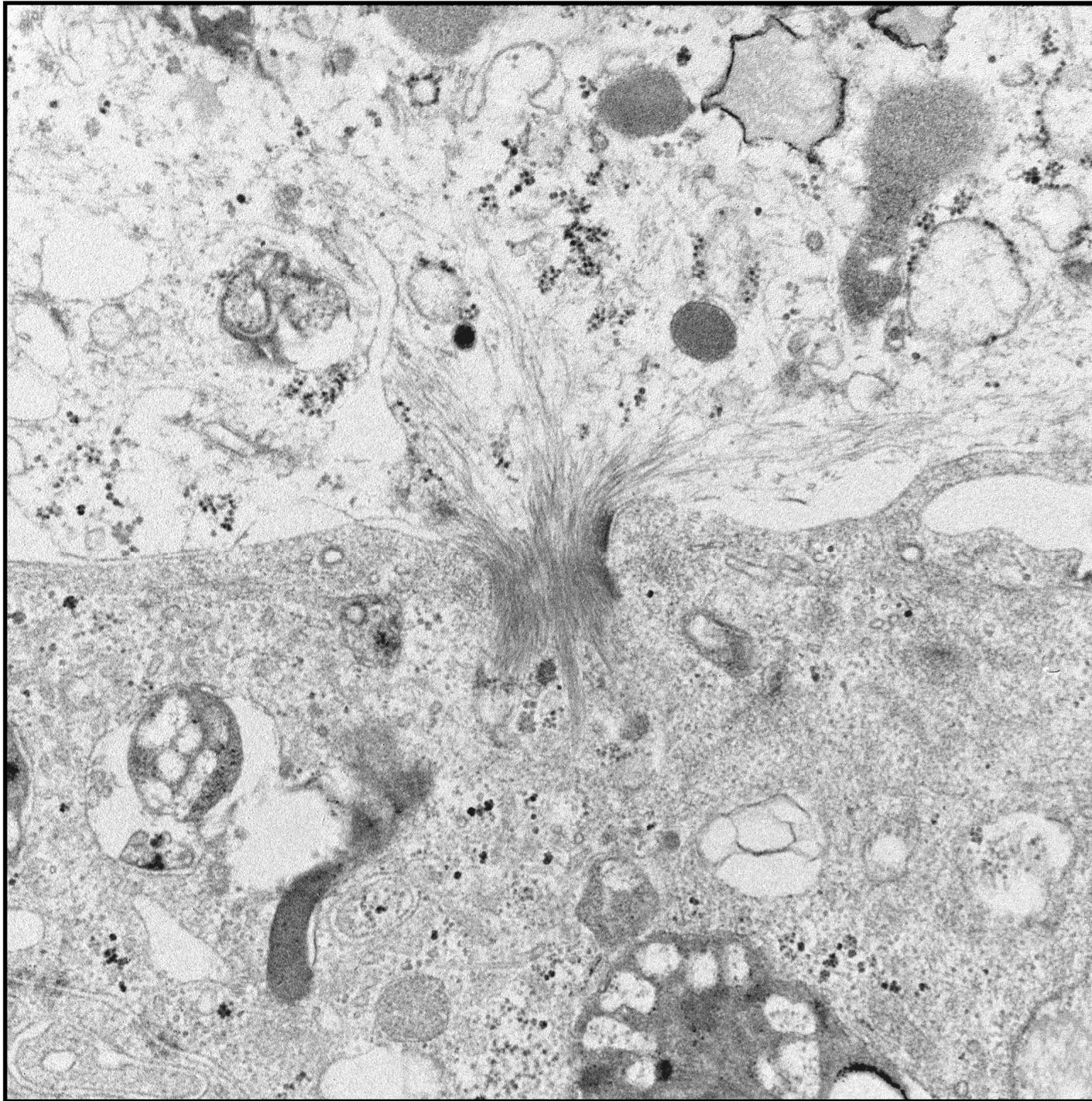
孢子原形質による細胞傷害

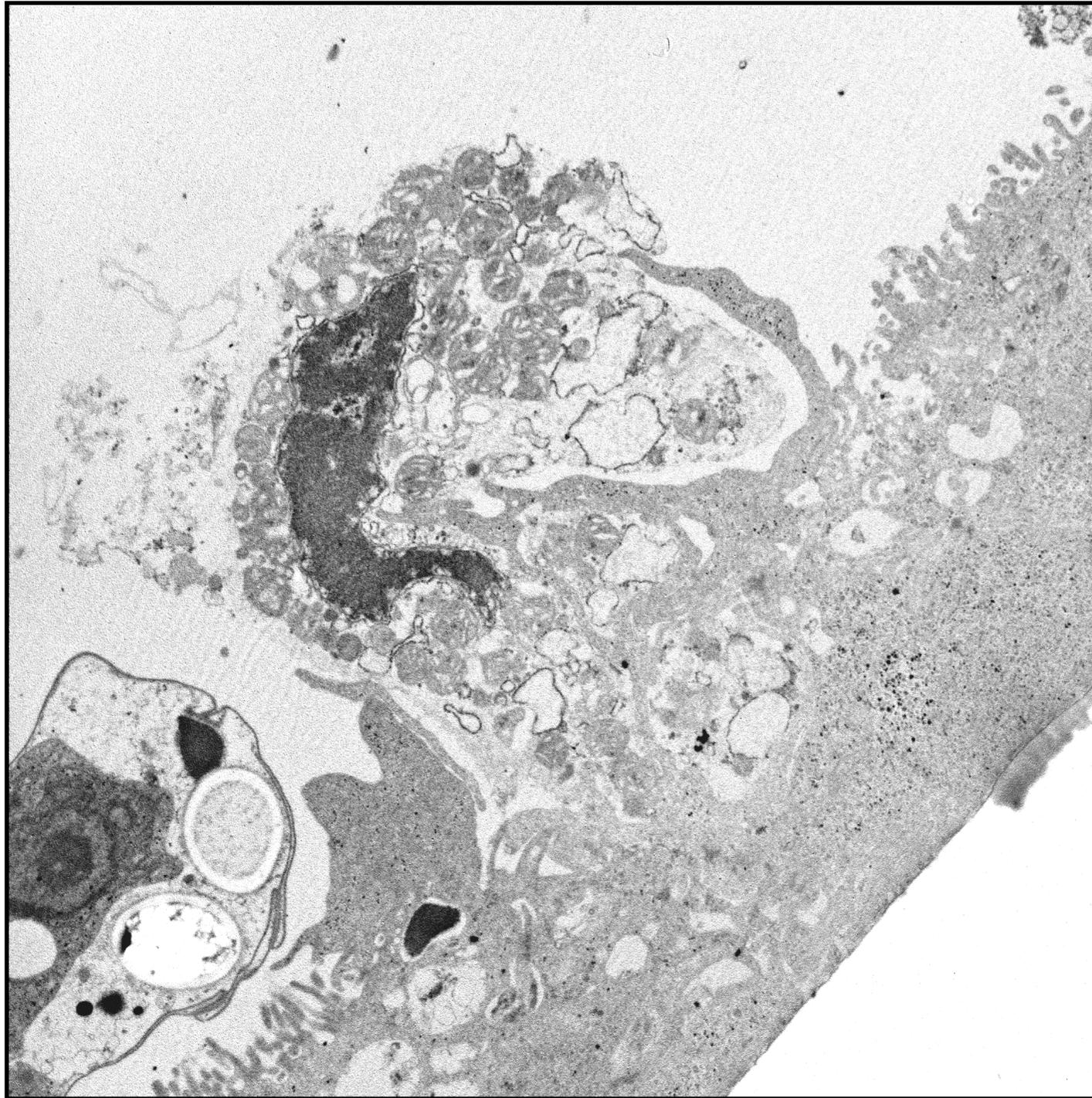


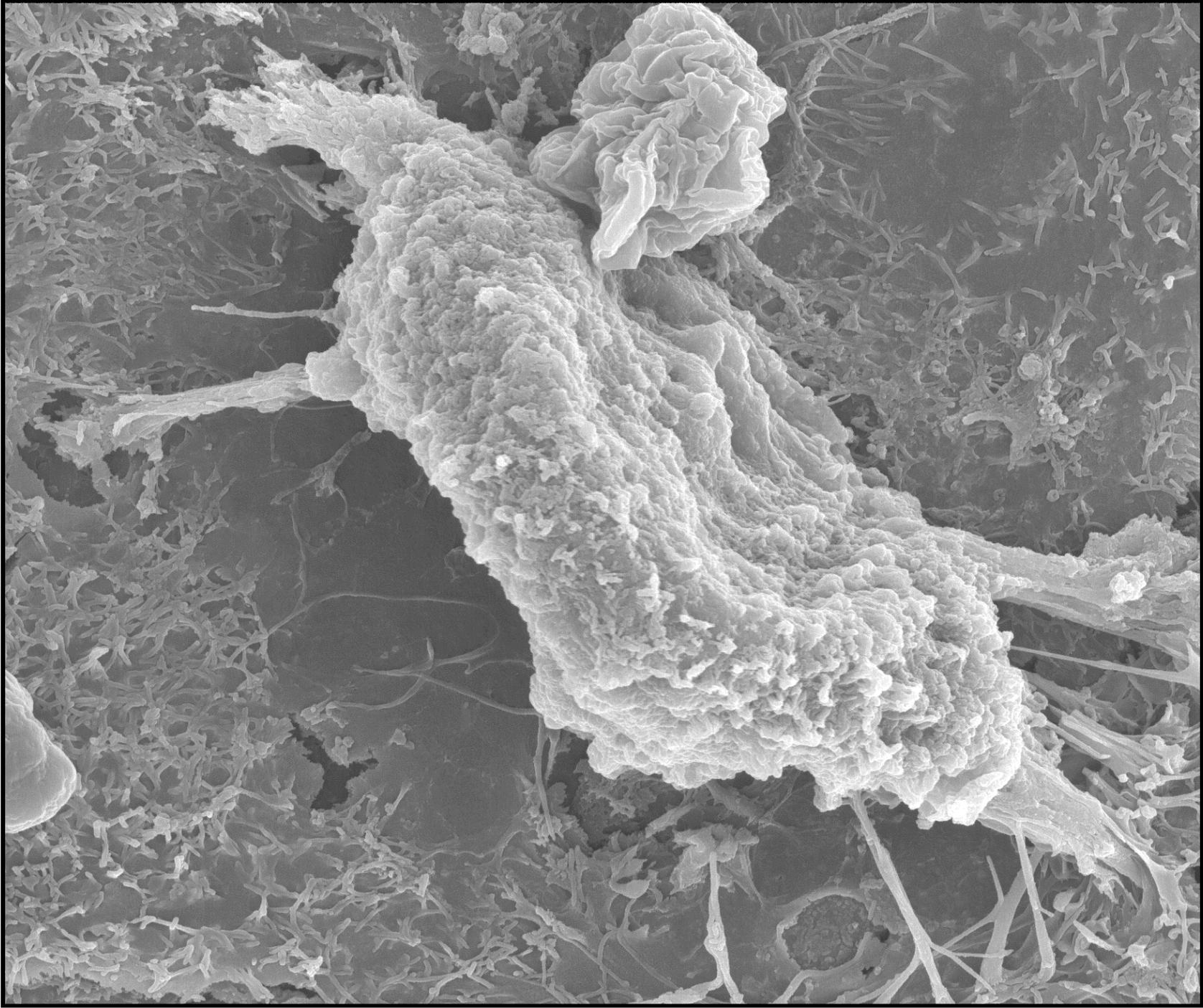


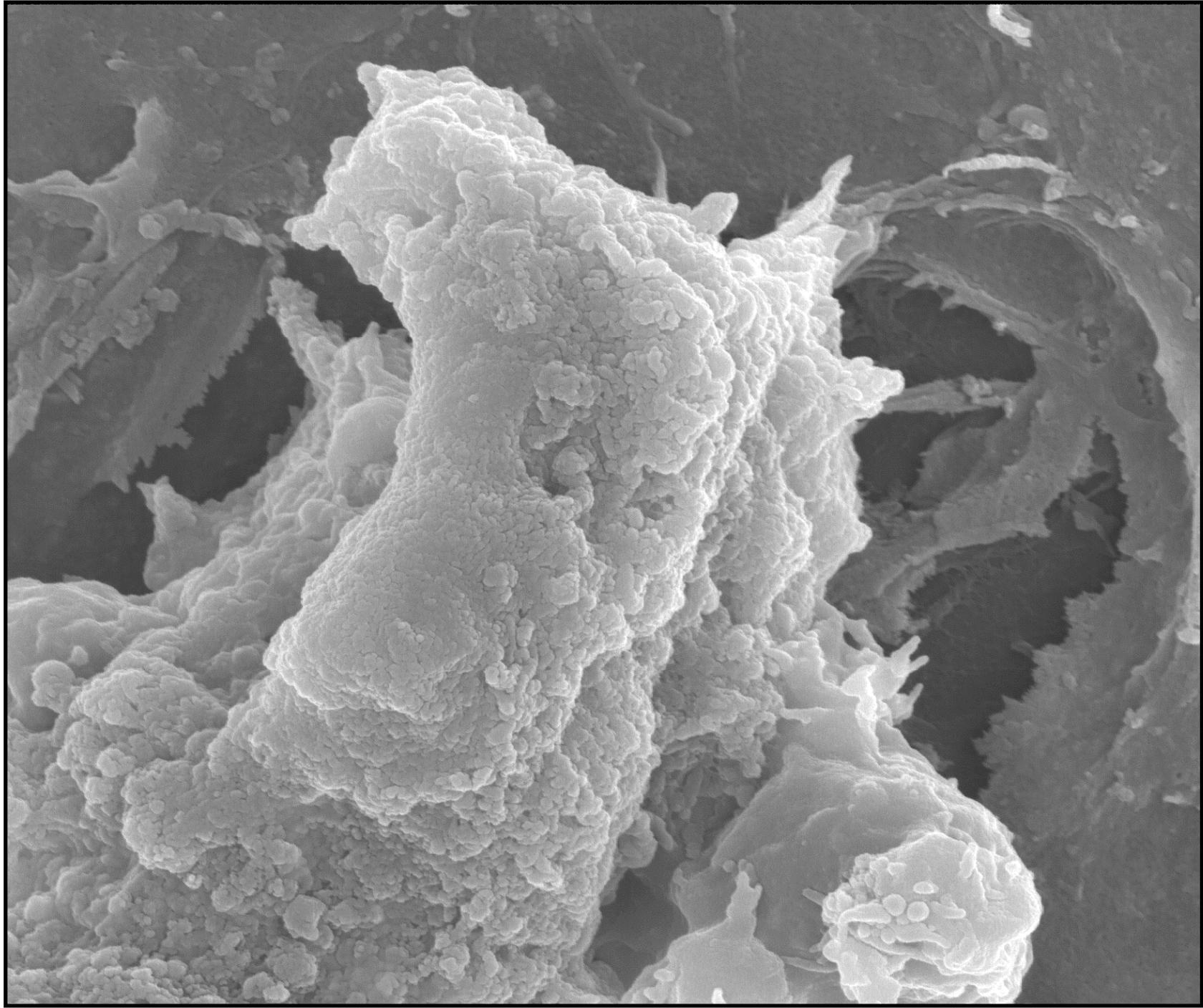


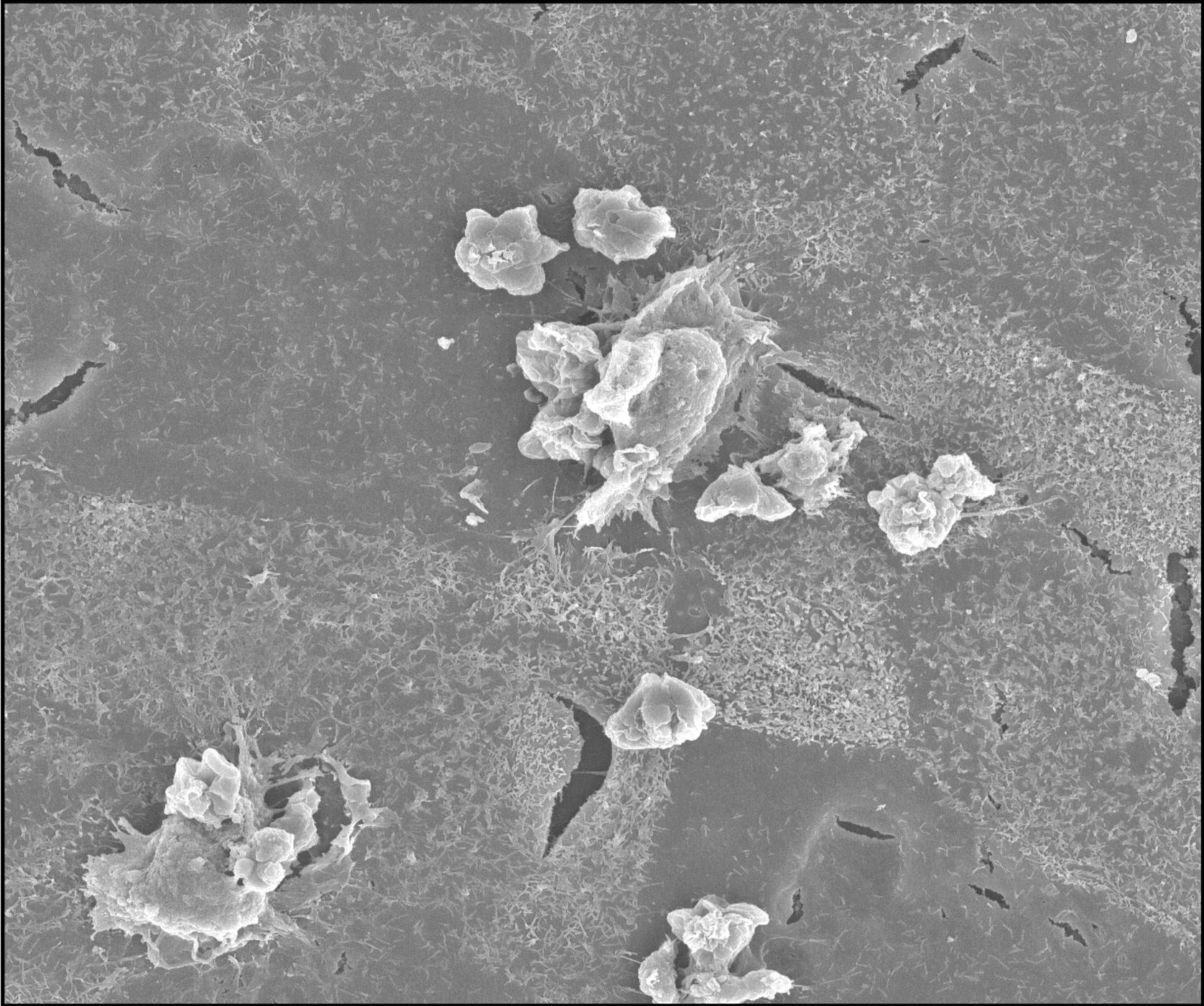


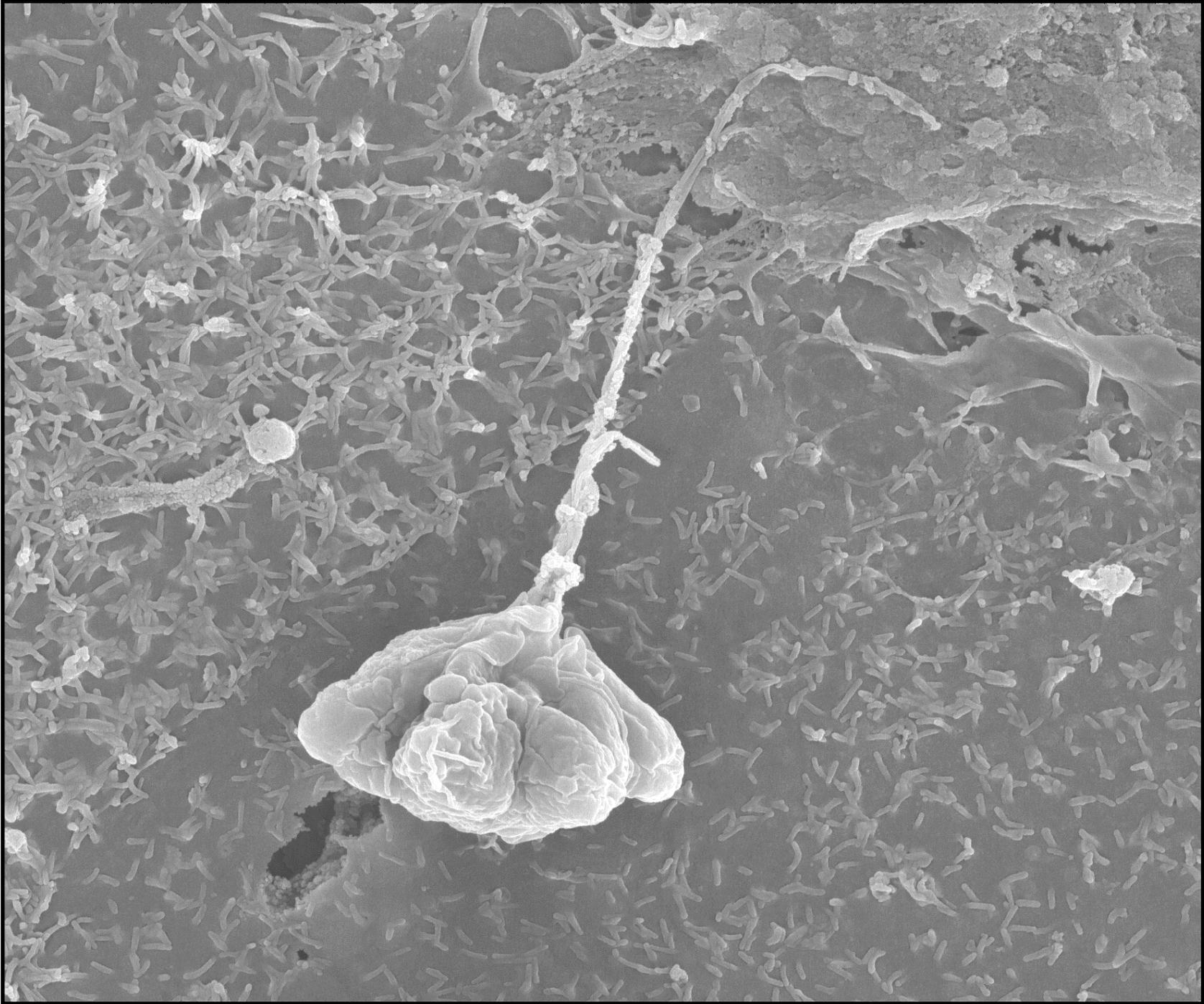






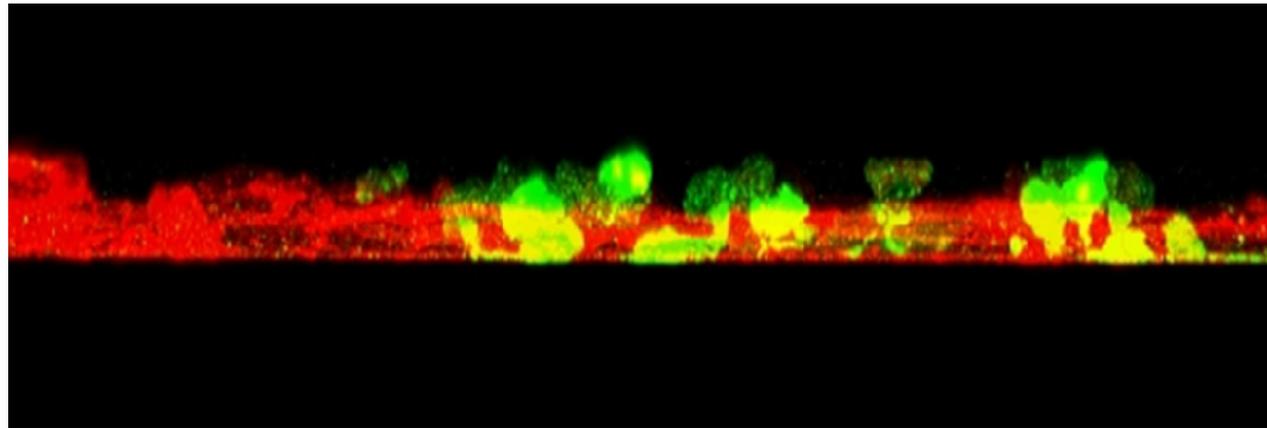




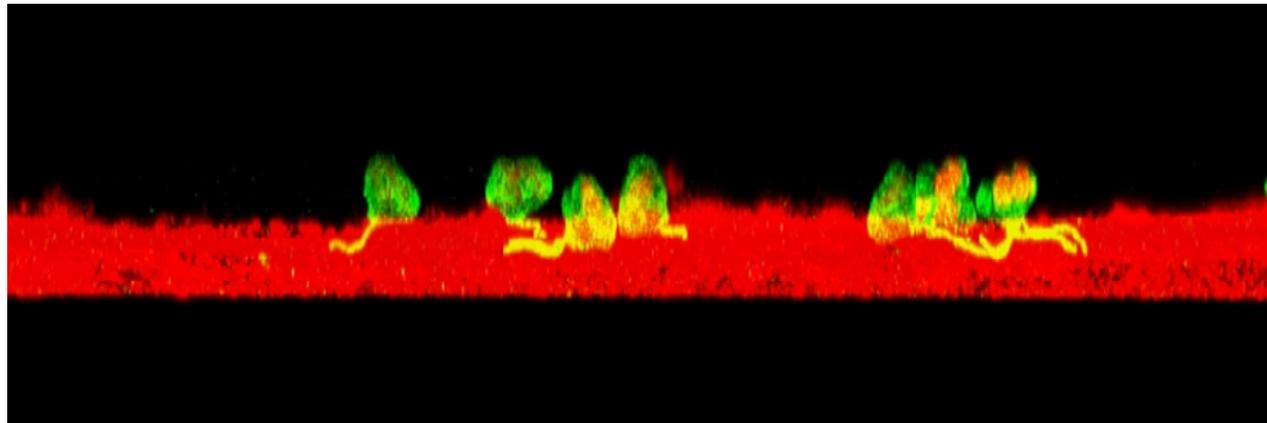


孢子原形質放出抑制実験

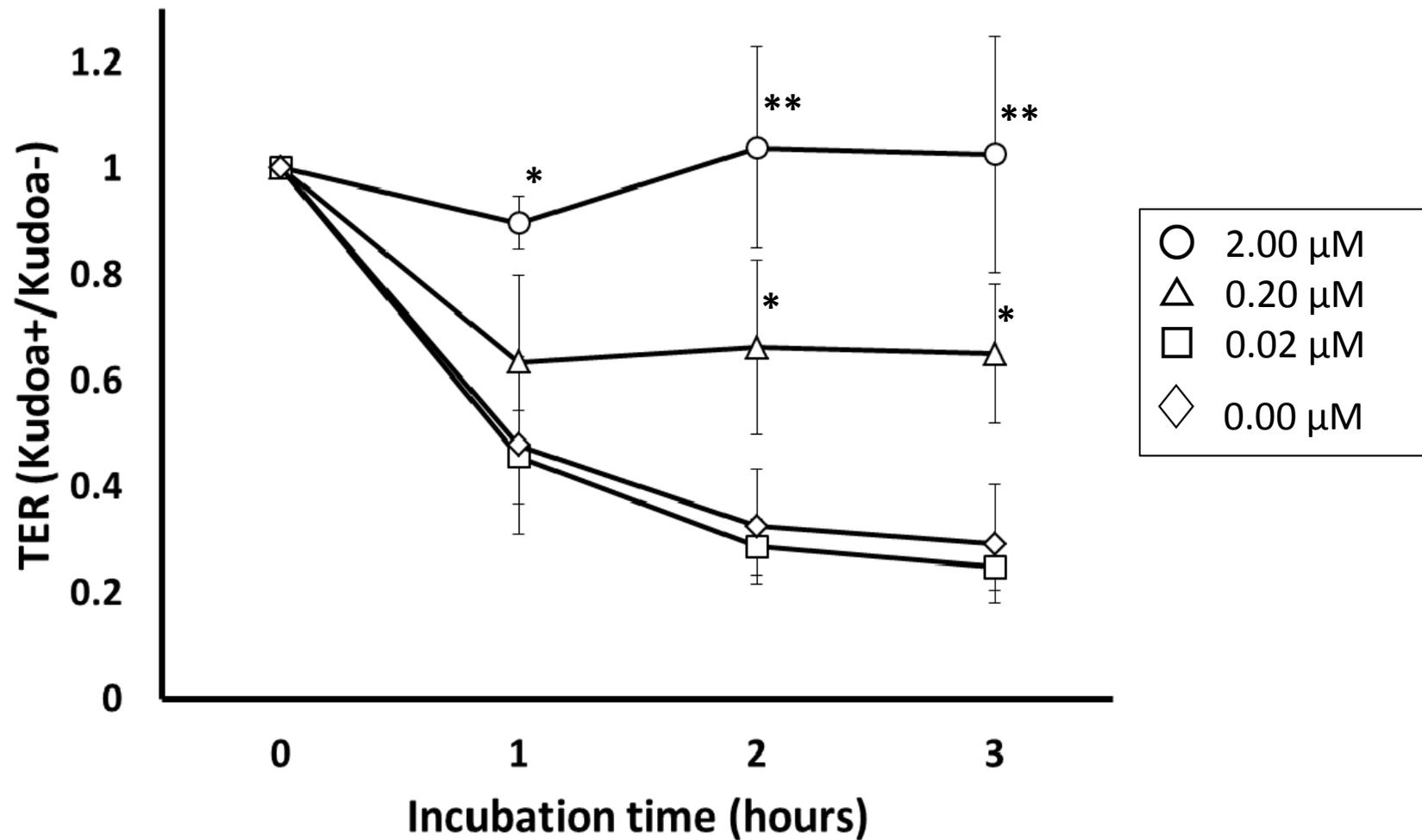
DMSO



Cytochalasin D
2 μ M

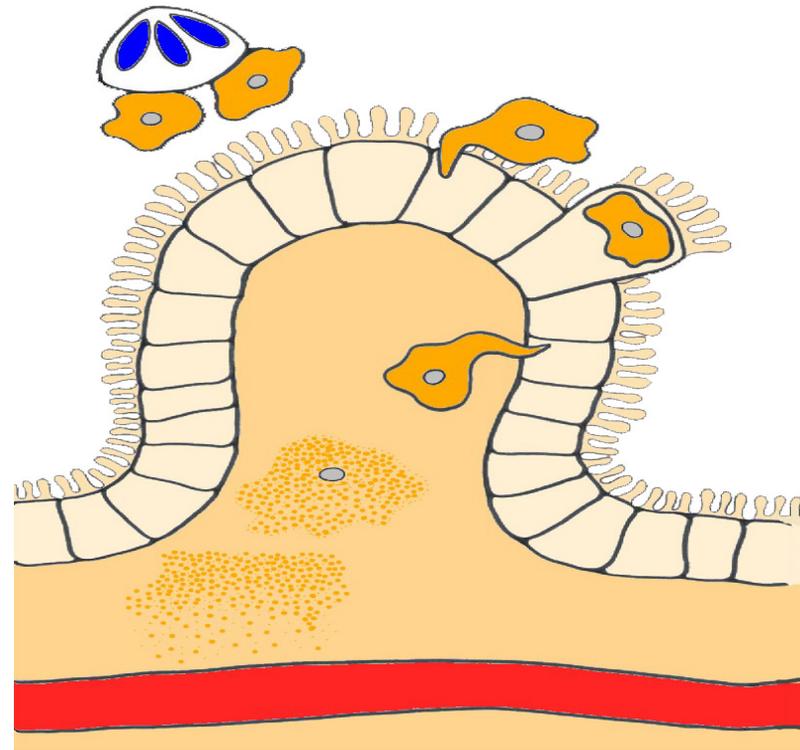


Cytochalasin D濃度とクドア毒性との関係



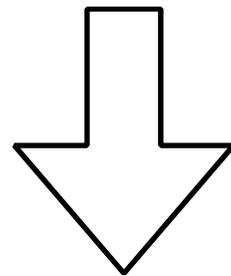
クドアによる下痢発症メカニズム

- 孢子原形質による腸管細胞侵入に伴う細胞傷害が、クドアによる下痢発症メカニズムの大きなファクターであることが示唆された



クドア食中毒の防止

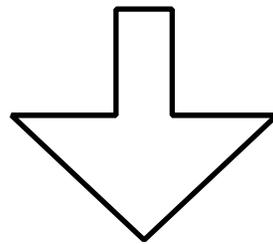
- 平成24年6月7日
- クドアが検出された生食用生鮮ヒラメについて
顕微鏡検査を行い孢子数が筋肉1gあたり
 1×10^6 個を超えた場合



食品衛生法 第6条違反として取り扱う

輸入ヒラメ対策

- 国内養殖ヒラメのクドア感染率は約0.7%
- 国内市場流通ヒラメの4分の1は韓国からの輸入ヒラメ
- 国内対策だけでなく輸入ヒラメ対策も必要



下関港・大阪港における輸入ヒラメに対する
モニタリングの開始

現在有効なクドアの失活法

予防対策	毒性
冷蔵(4°C~10°C)	日数とともに毒性減少 [約1週間で死活]
冷凍(-80°C、2時間以上)	失活
冷凍(-30°C、1日)	失活
冷凍(-20°C、4時間以上)	失活
pH	pH4-8 処理で毒性変化なし
加熱(75°C 5分)	失活

予防対策

養殖段階における対策

- 養殖現場に稚魚を導入する段階で、汚染稚魚を排除することが重要な対策となりうる。
- 養殖時の飼育環境からの汚染を防止することも対策となりうる。
- 出荷前の養殖場における汚染のモニタリングも有効な対策となりうる。

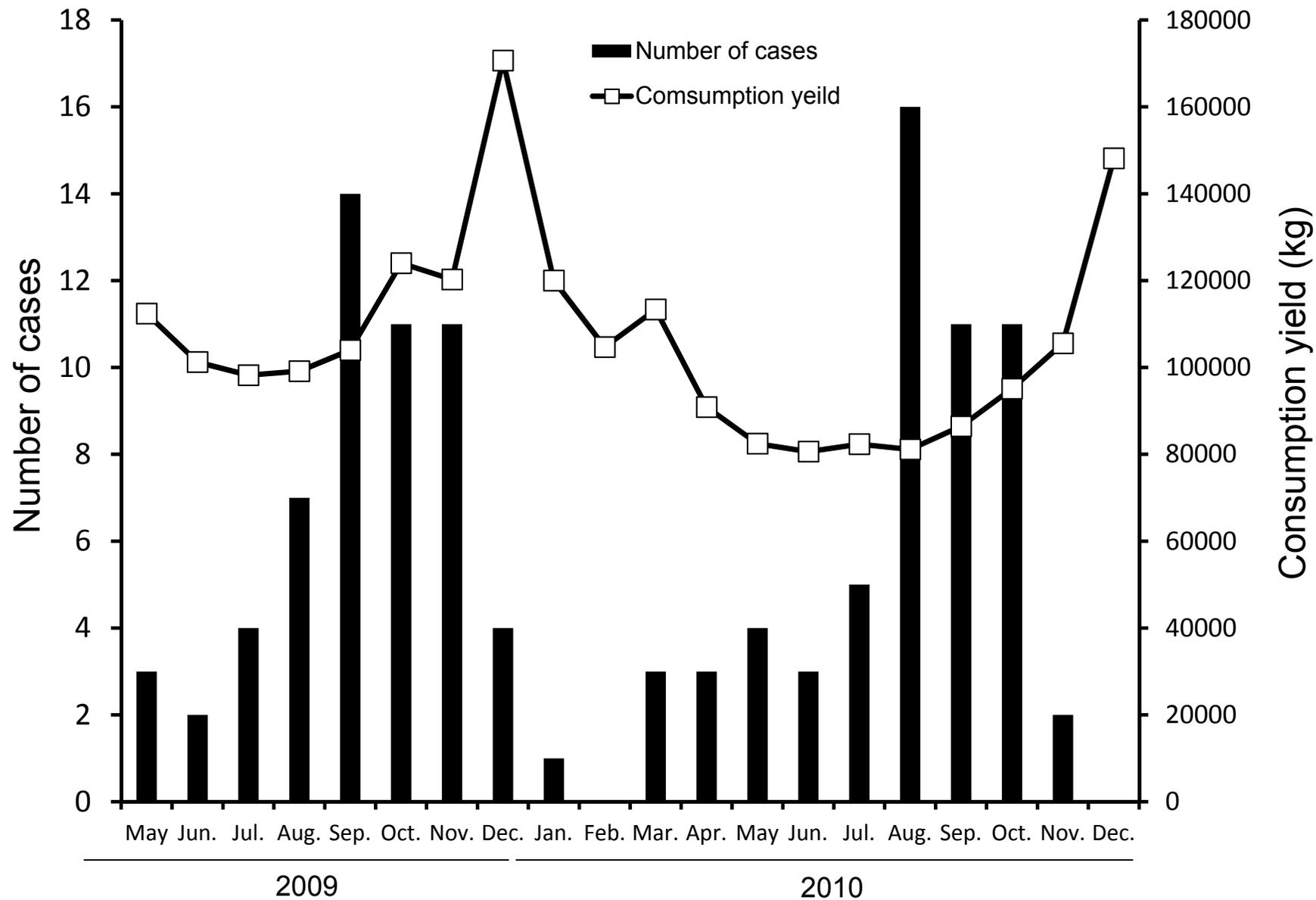
流通・加工段階における対策

- 冷蔵や冷凍の条件によって失活することが示されている。

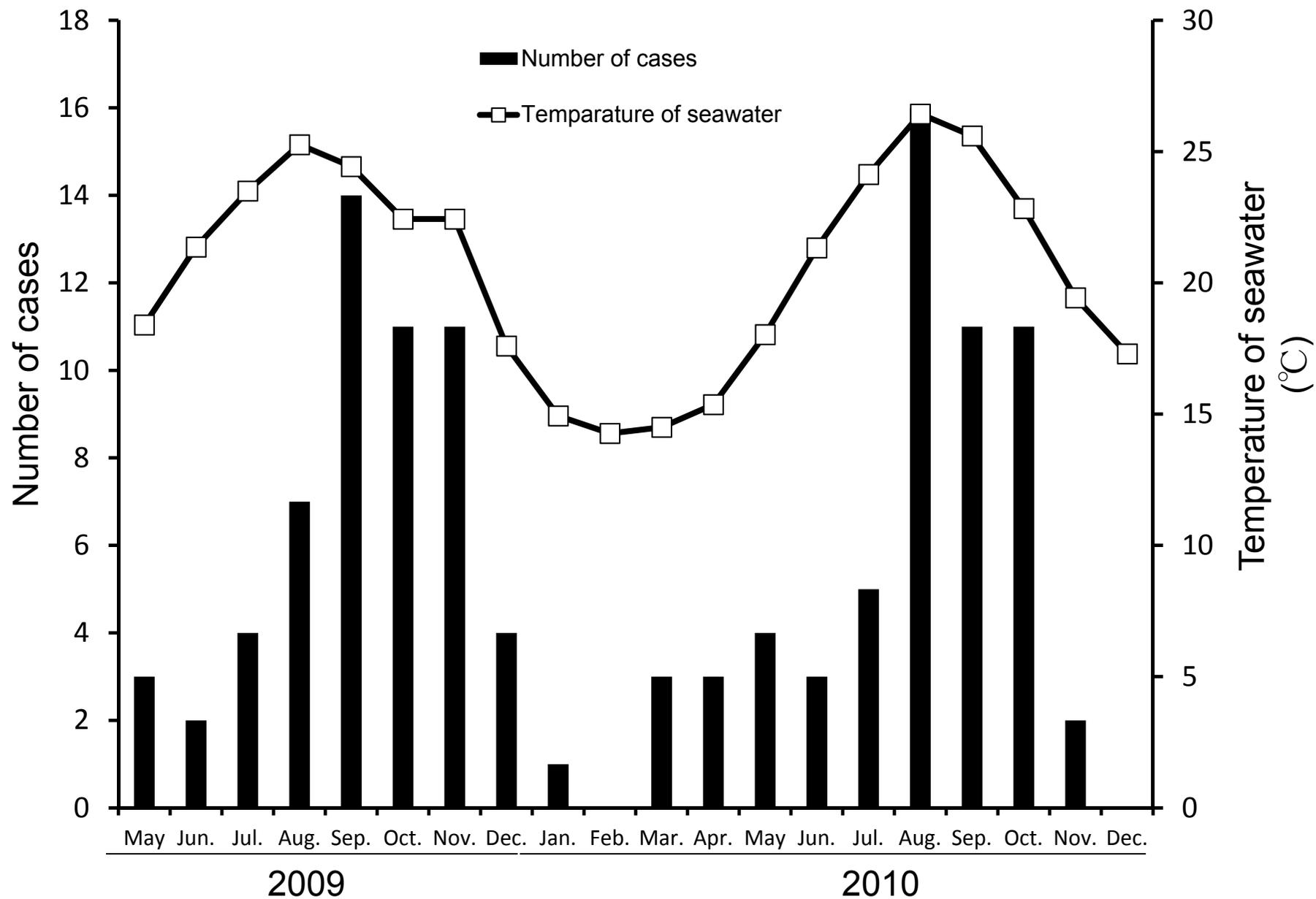
クドア食中毒発生の季節的変動要因の解析

- クドア食中毒は夏期から秋季にかけて集中して発生する
 - 夏期にクはドアの毒性が強まるのか？
 - 夏期にはクドアの数が増えるのか？
- 季節性の原因を明らかにすれば、クドア食中毒予防につなげられる可能性

グドア食中毒発生件数とヒラメ消費量との関係



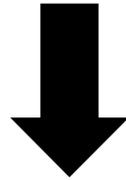
クドア食中毒発生件数と海水温との関係



クドア対策の現状

養殖場における防除・輸入検疫によるモニタリング

クドア感染ヒラメを排除することによって安全性を確保



感染ヒラメが流通経路に入ってしまった場合、対処できない

クドア不活化法の必要性

リキッドフリーザーの特徴

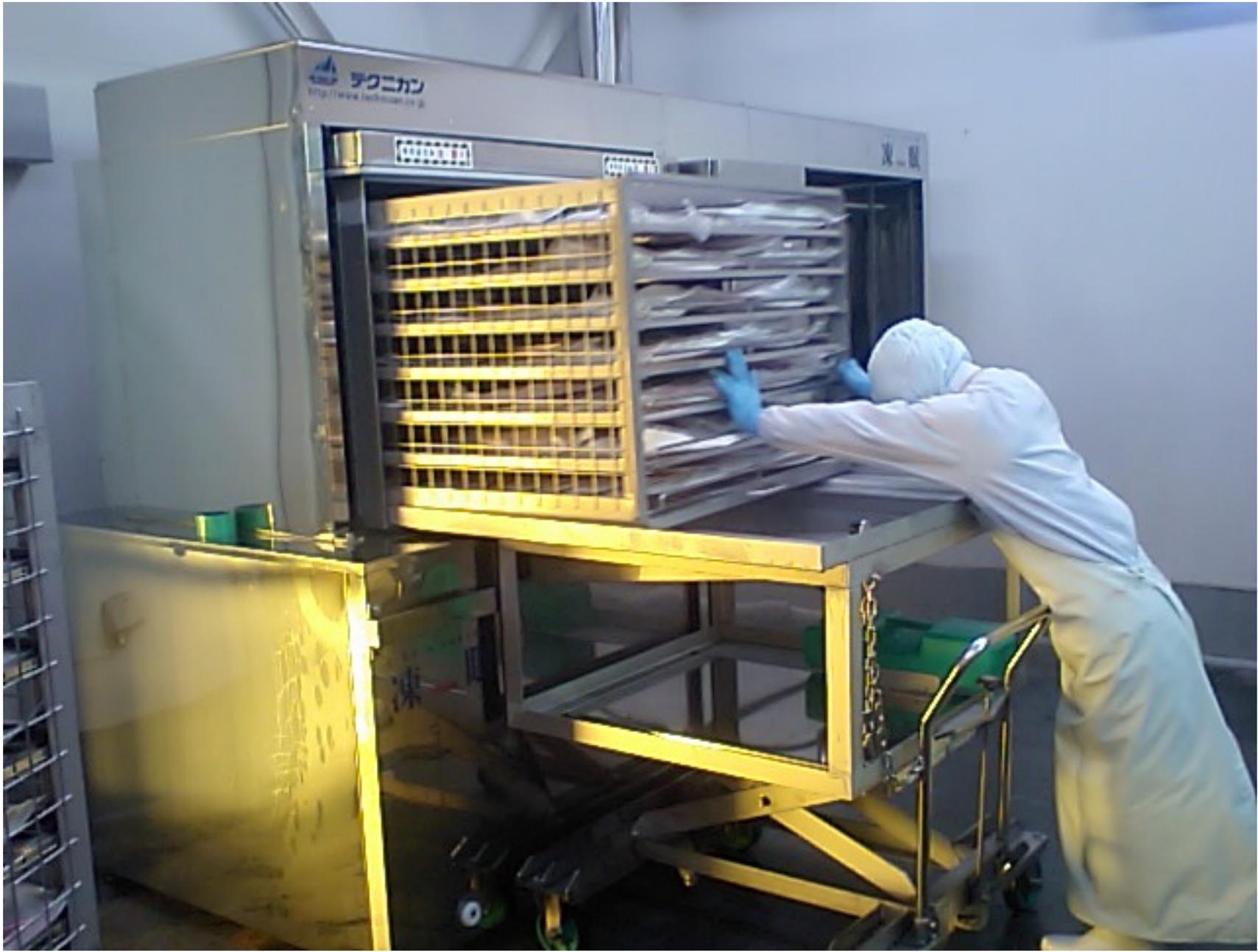
エアースラスト冷凍

- 冷気を直接吹き付ける
- 熱伝導効率が悪いいため細胞・組織内で氷結晶が成長する
- 解凍後、ドロップが生じ、品質が低下する

リキッドフリーザー

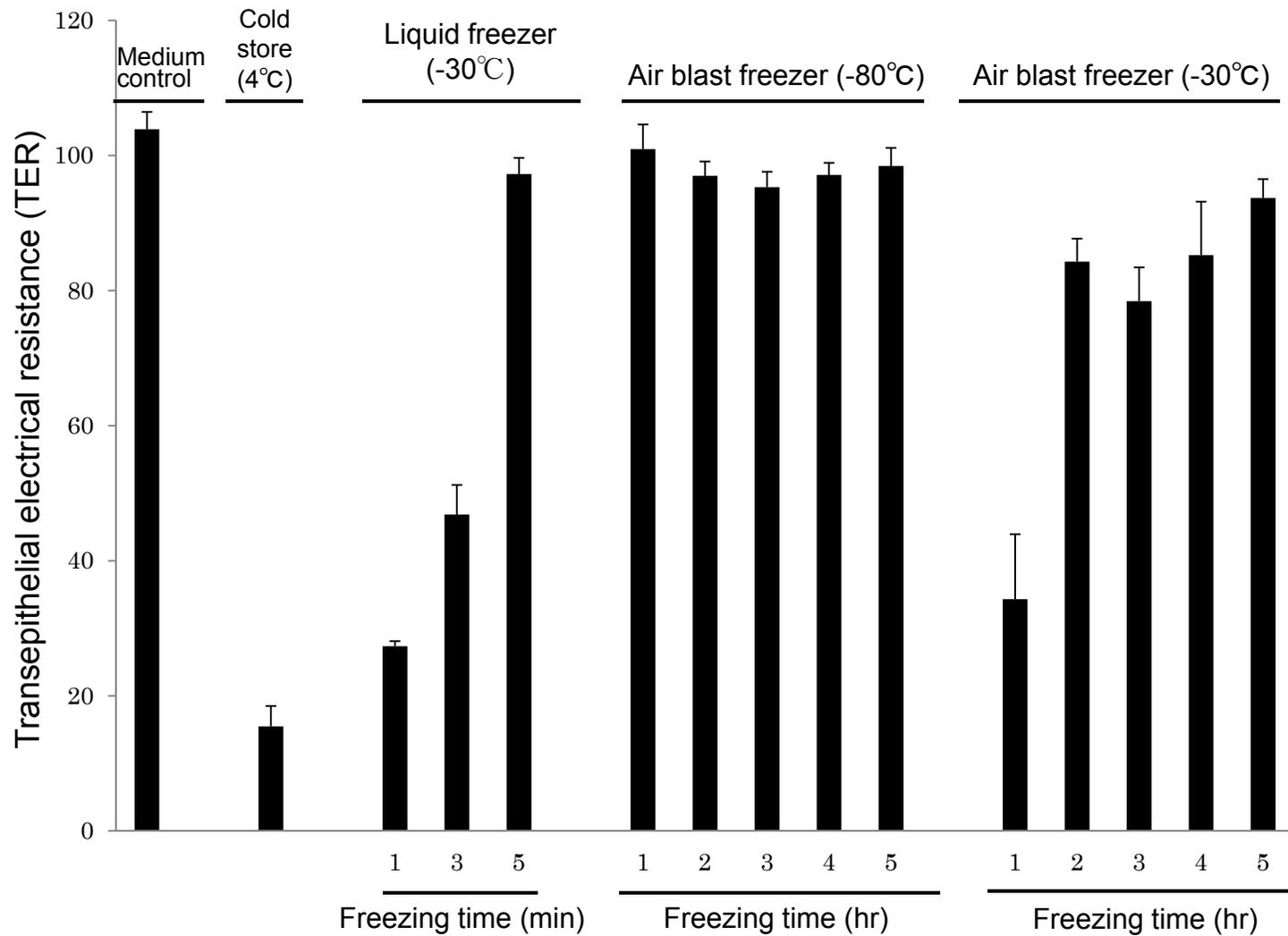
- 液体の冷媒に直接浸漬する
- 熱伝導効率が良いため氷結晶の成長を抑えることができる
- 解凍後もドロップが生じにくく、品質が保たれる







冷凍方法によるグドアの毒性変化



冷凍方法によるヒラメの色調変化



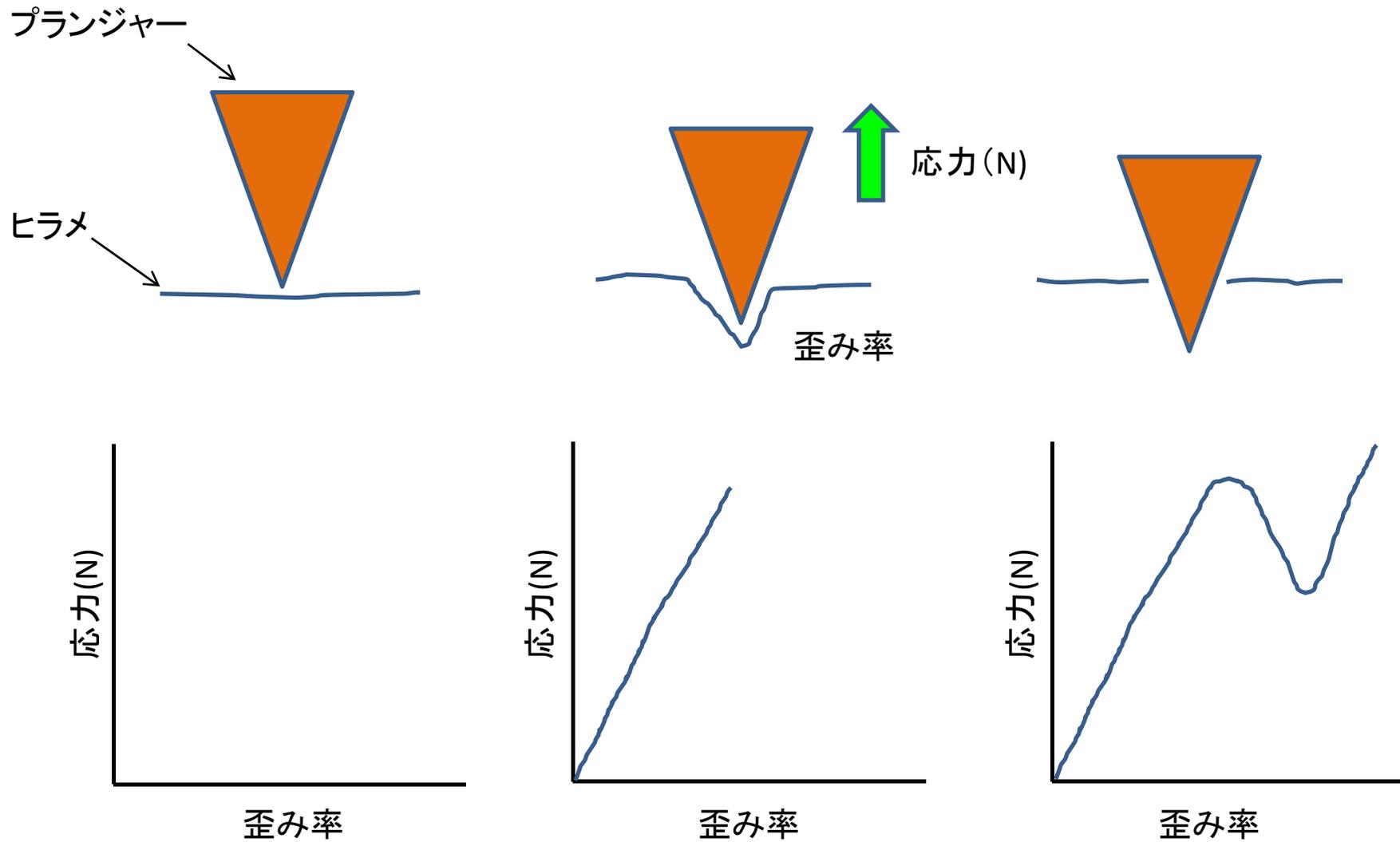
Cold store (4°C)
5 hr

Liquid freezer (-30°C)
5 min

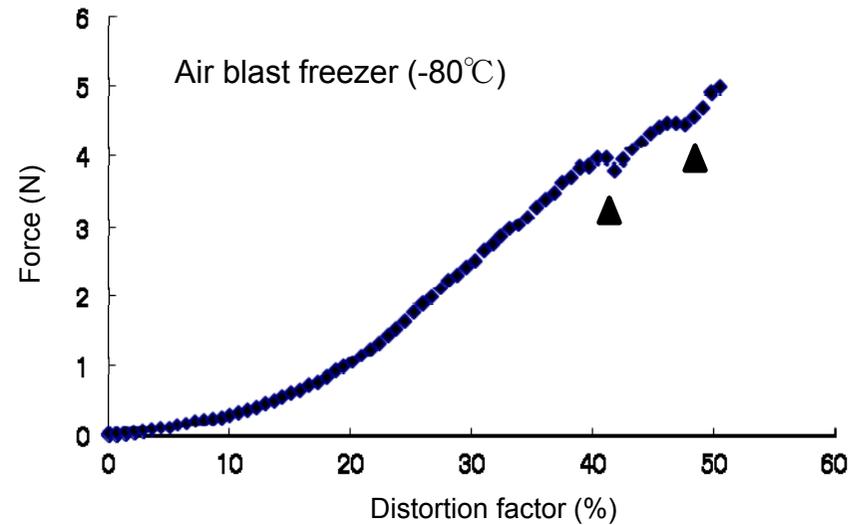
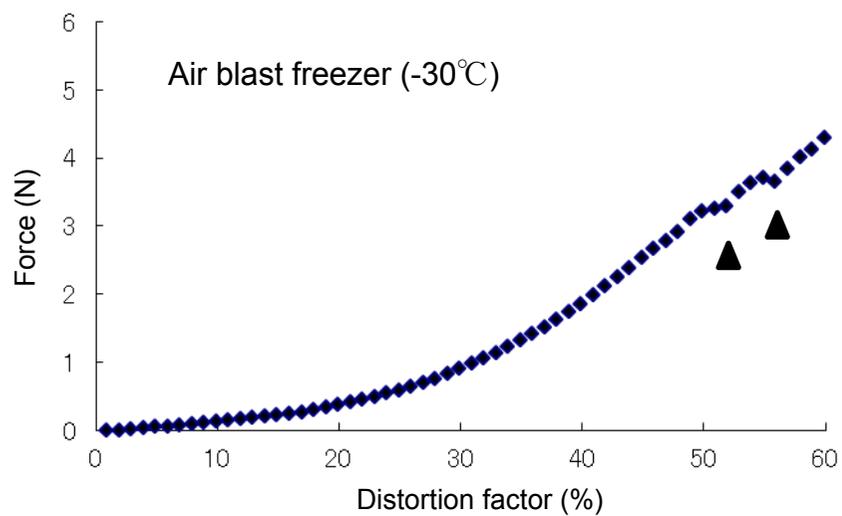
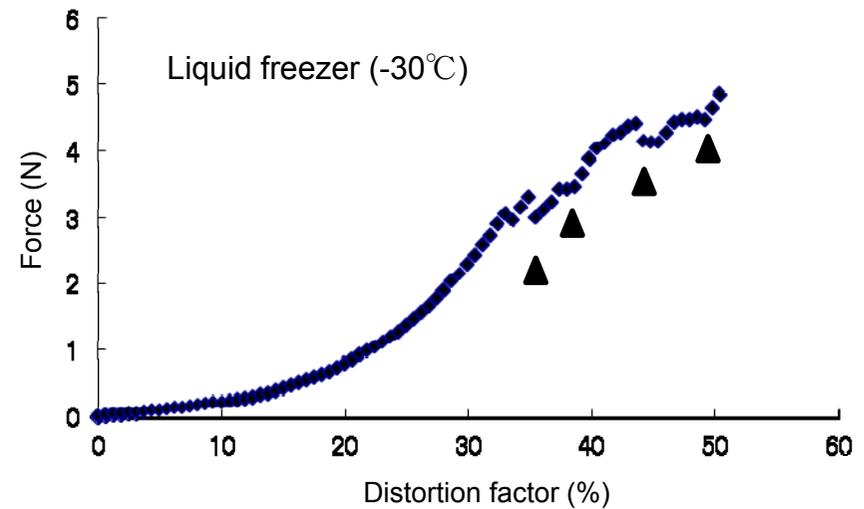
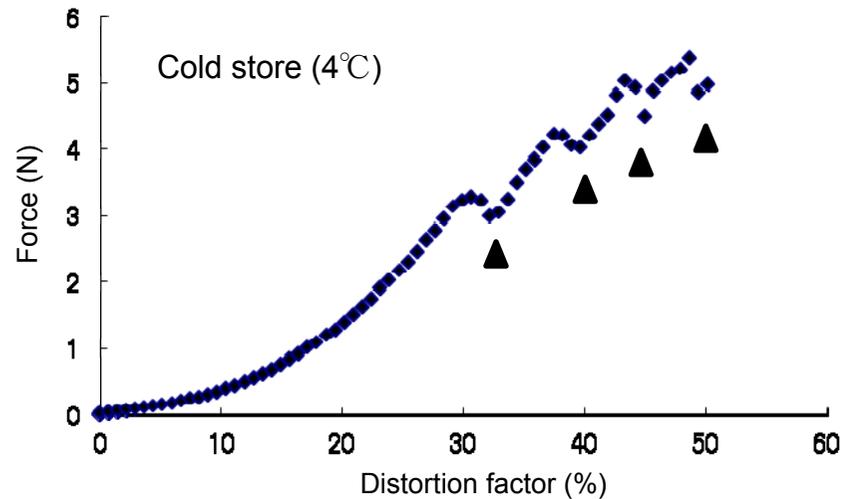
Air blast freezer (-30°C)
5 hr

Air blast freezer (-80°C)
1 hr

冷凍方法によるヒラメの肉質変化



冷凍方法によるヒラメの肉質変化



リキッドフリーザーまとめ

- ヒラメの肉質を比較的变化させずにクドアを死滅させることができる
- 素人が食べる分には4°C保存の物と区別が付きにくい
- 条件をさらに検討すればクドア食中毒予防の有効手段となりうる可能性がある