

が、すべて陰性の結果であったので、冷凍することにより毒性が失活する可能性があるので、平成22年度では、4℃保存で送付してもらうことにした。

本研究で用いた検体は、平成22年10月に発生した愛媛県での食中毒事例で提供された残品および大分県農林水産研究指導センター水産研究部福田 穰博士の協力を得て、大分県の養殖場からクドア感染ヒラメを入手し使用した。

クドア孢子の分離および精製は、以下の方法で行った。ヒラメ筋肉1gを秤量してシャーレにいれ、筋肉上に45 μ m ナイロンメッシュをのせ、PBS 4mlを加えて、メッシュの上から圧をかけながら筋肉をほぐし、素クドア孢子ホモジネート液とした。この液を100 μ m ナイロンメッシュでろ過し、ろ液を1500rpm、10℃、15分で遠心分離を行った。得られた沈渣を適時PBSで溶解し、クドア孢子ホモジネート液とし、実験に供した。沈渣を1mlのPBSで懸濁して血球計算版でクドア孢子数を計測した。

対照のヒラメホモジネート液は、クドア孢子を含まないヒラメを上記と同じ方法で抽出、濾過、遠心を行って作成した。

さらに精製クドア孢子は、30%パーコール3mlの上に15%パーコール3mlを重層した15mlチューブを作製し、クドア孢子ホモジナイズ液1mlを15%パーコールの上に重層した。チューブを3,500 rpm、10℃、30分遠心分離を行った。沈渣を10倍量のPBSで洗浄し、精製クドア孢子液とした^{1,2)}。

(2) マウスでの投与実験

非冷凍のクドア孢子ホモジネート液(10^7 クドア孢子匹)を胃ゾンデで直接マウス(C57/Black)の

胃内に投与した。 10^4 クドア孢子/マウス(低濃度群)と 10^7 クドア孢子/マウス(高濃度群)の2濃度、各4匹ずつ接種した。マウスの様子を観察し、投与後約一時間で心臓採血を行い、血清を回収した。血清中の42種類のサイトカインの産生をProfilermouse cytokinearray (R&D system, Inc., MN)を用いて検出した。

(3) 腸管ループ法

実験動物としてマウス、ラットおよびウサギを用いた。各動物に適当な量の麻酔薬を静脈注射または腹腔注射して、開腹した後、腸管の一部を縫合糸で結び、2-6か所のループを作った。それぞれのループに、クドア孢子ホモジネート液(2.5×10^7 孢子/1mL)、クドア孢子ホモジネート液上清、精製クドア孢子液(2.4×10^7 孢子/1mL)、対照ヒラメホモジネート液およびPBSを注入した。マウスでは1ループ当たり0.2mL、ラットでは0.1mL、ウサギでは1.0mLを注入後、腹膜および皮膚を縫合し、保温しながら、マウスおよびラットでは4時間後、ウサギでは6時間後再び開腹した。腸管を切除した後、各ループの水分貯留量を観察した。マウスは5匹、ラットは2匹、ウサギは1羽を用いた。

(4) スンクスを用いた嘔吐実験

体重70g前後のスンクス♂にあらかじめクドア孢子を含まないヒラメを用いて餌付けしておき、ヒラメを自発的に摂食するようにしておいた。これらのスンクスに、クドア孢子を含むヒラメの切り身を食べさせ、約1時間嘔吐の有無を観察した。摂食後20-30分後に3回以上嘔吐を起こした場合、嘔吐反応陽性とした。精製クドア液を経口投与した場合は、胃ゾンデで投与した。

C. 研究結果

(1) マウスでの投与実験結果

高濃度群は投与後約10分で4匹すべてが沈鬱となり、体毛が毛羽立ち、心拍数が早くなった。投与後約1時間でマウスの元気は回復した。それに対して低濃度群ではそのような変化は見られなかった。得られた血清中のサイトカインをサイトカインアレイによって42種類同時に検出した。低濃度群のサイトカイン産生量に対する相対的な高濃度群の産生量を計算したところ(図1)、クドアの投与量を増やすことによってG-CSF、KC、SDFの産生量が特に上昇した。JE、IL-16、sICAM-1、Rantesは若干上昇した。他のサイトカインの産生量に変化は見られなかった。

(2) 腸管ループ法

腸管ループ法では、マウス、ラットおよびウサギとも、水分貯留は認められなかった。

(3) スンクスを用いた嘔吐毒性

スンクスでの嘔吐反応の結果を表1に示した。

非冷凍の $4.6 \times 10^7/g$ のクドア孢子を含むヒラメ切り身をスンクスに自発的に食べさせた場合、5匹中5匹が嘔吐反応を示した。次にその1/10のクドア孢子を含むヒラメ切り身を食べさせた場合は5匹中1匹しか嘔吐反応は示さなかった。さらにその1/10の用量でも5匹中1匹しか嘔吐反応は観察されなかった。 $5 \times 10^5/g$ のクドア孢子では嘔吐反応は認められなかった。この結果から、クドア孢子含有ヒラメの嘔吐反応はクドア孢子の用量依存的反応であることが示唆された。一方 $4.6 \times 10^7/g$ のクドア孢子を含むヒラメ切り身を -20°C で1週間冷凍したものを食べさせた場合には、5匹すべてで嘔吐反応は見られなかった。

つぎに一匹あたり精製クドア 6×10^7 を経口投与した場合には2匹中2匹に嘔吐反応が見られた。この反応は -20°C で1週間冷凍したヒラメから同じ

用量の精製クドア孢子液では反応を起こさなくなった。

D. 考察

これまでに行った調査研究で、

- 1) ヒラメには寄生虫の一種である新種のクドア属がいること
- 2) 網羅的DNA解析により、食中毒事例1検体から有意にクドア属のDNAが検出されたこと
- 3) 食中毒事例の参考品を含む46検体を、RNAを用いたqRT-PCR(黒田分担研究報告書参照)と顕微鏡所見でクドアの有無を検査したところ、29検体から計測可能なクドア孢子が検出された(小西分担研究報告書参照)。
- 4) 平成22年10月に起きた食中毒では、懸賞で配布されたヒラメが原因食品であることが疫学的に証明されていること(八幡分担研究報告書参照)。
- 5) マリントキシンおよびレクチン等化学物質は食中毒残品からは検出されなかったこと。

以上からヒラメの喫食によって起こる本食中毒は、寄生虫の一種であるクドア属が原因物質である可能性が最も高いと考えられた。

そこで、本食中毒の毒性を評価出来る実験系を実験動物を用いて検討した。

本食中毒の症状として、嘔吐および下痢が主な症状として見られることから、それらの毒性を評価出来る系を確立することとした。

嘔吐毒性は、ネコや犬が嘔吐毒性の評価系に使われるが、その維持、飼育には困難が伴う。そこで小動物の実験系でそのモデルとなりうるスンクスに着目した。スンクス(*Suncus murinus*)は食虫目トガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属に属する。薬物や動揺刺激により容易に嘔吐する

ことを利用して、ヒト嘔吐毒性のモデルとして薬学分野などで多用されている。

本実験では、スunksが肉食であることを利用して、クドア孢子を含まないヒラメ筋肉を用いて餌付けをおこない、ヒラメ筋肉を自発的に食する群を選抜した。実験にはこの群を用い、クドア孢子を含むひらめ筋肉を直接食べさせるまたは、精製クドア孢子液を経口投与した。スunksへの嘔吐毒性は $4.6 \times 10^7/\text{g}$ のクドア孢子を含むヒラメ筋肉を食べさせた群では 100% の確率で嘔吐反応が観察されたが、その用量の 1/5 および 1/10 の場合は嘔吐反応は 20% に留まっており、1/100 では、消失した。すなわちある程度多量のクドア孢子がないと嘔吐毒性は発現しないことが示唆された。つぎに精製クドア孢子液を用いて、クドア孢子自体に嘔吐毒性があるかを検討したところ、 10^7 以上のクドア孢子を投与した場合には 2 匹中 2 匹が嘔吐反応を示した。

このことからヒラメの嘔吐毒性はクドア孢子の寄与の可能性が極めて高いことが示された。

さらに冷凍処理により、ヒラメ筋肉の嘔吐毒性およびクドア孢子の嘔吐毒性が消失したことから、冷凍処理は予防措置として有効であることが示された。

下痢原性を評価するため、腸管ループ法をマウス、ラット、ウサギを用いて行った。腸管ループ法は、食中毒菌毒素であるコレラ毒素、セレウス毒素などの下痢原性の評価法として一般的に使われている。しかしながら本実験では、クドア孢子は、実験に用いた 3 種の動物の腸管ループ法において下痢原性は認められなかった。一方乳のみマウスを用いた下痢原性試験においては、1 匹当たり 10^6 クドア孢子以上を経口投与した場合、下痢

原性が認められている（大西分担報告書参照）。今回実験に供した用量は、マウス、ラットでは 1 匹当たり 10^6 孢子であったことから、用量が少なかったことが陰性であった原因の一つとも考えられる。

マウスの投与実験結果から、クドアの投与によって生体の自然免疫系が作動し、各種サイトカインの産生が促進することが明らかになった。今回産生されたサイトカインのほとんどは免疫細胞の遊走、浸潤に関するもので、免疫反応の初期状態を表していると思われる。これらの細胞の遊走・浸潤が過度になると腸管上皮細胞が障害を受け、物質の透過性が亢進し、下痢症状が引き起こされると考えられている。特に KC はヒトの IL-8 に相当し、腸管で好中球を強力に浸潤させ、サルモネラ菌による下痢発症メカニズムの中で重要な位置を占めている。今回、クドアの投与により KC の産生が非常に上昇したことから、腸管における好中球の浸潤がクドアによる下痢発症メカニズムの 1 つである可能性が考えられた。

E. 結論

ヒラメを喫食して起こる原因不明食中毒の原因物質として、ヒラメに汚染する寄生虫（クドア属）が推定されることから、クドア属の嘔吐毒性および下痢原性を実験毒物を用いて評価する系を確立した。

嘔吐毒性は、ヒトの嘔吐モデルとして使われているスunksにおいて認められた。嘔吐に必要な用量は $4.6 \times 10^7/\text{匹}$ であった。この毒性は冷凍処理で失活した。

マウスに経口投与を行うと、血中サイトカインが上昇することが認められた。このサイトカイン

が腸管で好中球を強力に浸潤させ、下痢原性の発現に何らかの役割を担っていることが示唆された。

これらの結果から、本食中毒の毒性評価が可能な実験動物と手法が明らかになった。

F. 参考文献

- 1) Hamilton, A.J., et al., The production of mouse anti-Myxosome cerebralis antiserum from Percoll-purified spores and its use in immunofluorescent labelling of Historesin-embedded cartilage derived from infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Diseases*, 11, 185-190 (1988)
- 2) Chase, J.C., et al., Analysis of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) spore antigens using monoclonal antibodies. *Dis Aquat Org* 45, 121-129, (2001)

G. 研究業績

原著論文

1. Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y. and Yoshiko Sugita-Konishi, Y.; *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea, *Parasitology Research*, 107, 865-8872 (2010)
2. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y. *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. *Parasitol Res*. 108. 913-926 (2010)

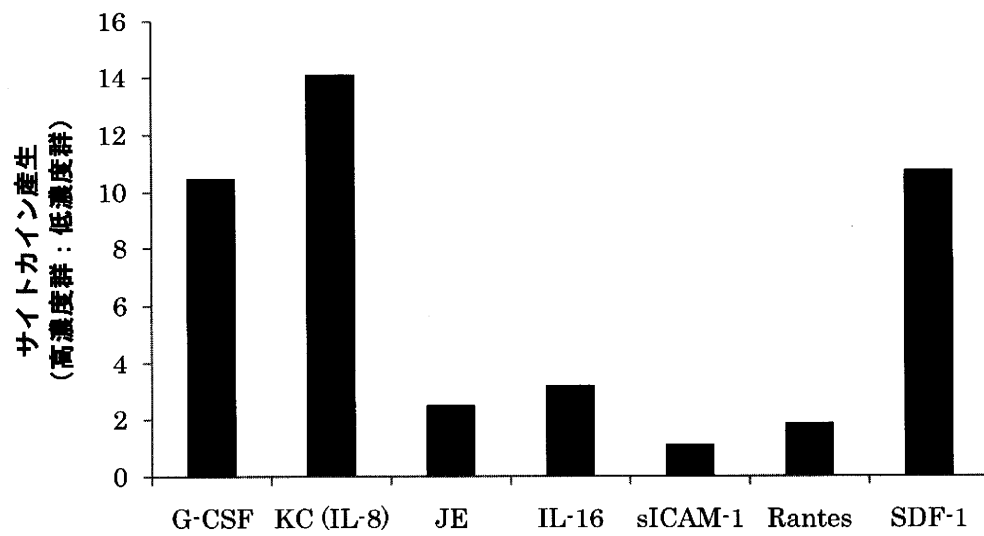


図1 クドアの経口投与によるマウス血清中のサイトカイン濃度の変化

表1. スンクスを用いた嘔吐実験

クドア数	材料	使用したスンクス数	嘔吐したスンクス数
$4.6 \times 10^7/g$	ヒラメ刺身(生)	5	5
$1.4 \times 10^7/g$	ヒラメ刺身(生)	5	1
$1.4 \times 10^6/g$	ヒラメ刺身(生)	5	1
$5 \times 10^5/g$	ヒラメ刺身(生)	5	0
$4.6 \times 10^7/g$	ヒラメ刺身(冷凍)	5	0
$6 \times 10^7/head$	精製クドア胞子(生)	2	2
$6 \times 10^7/head$	精製クドア胞子(冷凍)	2	0

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

乳のみマウスを用いた *Kudoa septempunctata* 孢子の下痢原性に関する研究
分担報告書

分担研究者	小西 良子	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
研究協力者	久米田 裕子	大阪府立公衆衛生研究所	感染症部細菌課
研究協力者	河合 高生	大阪府公衆衛生研究所	感染症部細菌課
研究協力者	原田 哲也	大阪府公衆衛生研究所	感染症部細菌課

要旨

近年、生鮮魚介類を共通食とする原因物質不明の食中毒事例が増加している。患者の共通食としてヒラメが含まれる事例が多く、そのヒラメにはクドア属に属する粘液胞子虫（クドア）が有意に含まれていることが報告されている。そこで本研究では動物モデルを用いてヒラメ筋肉中に寄生するクドア孢子の下痢原性を証明することを試みた。本研究では 4-5 日齢の ddY マウスに食中毒事例の喫食残品であるヒラメから抽出したクドア孢子液を 0.1 ml 経口投与し、25℃で 1.5 時間または 4 時間保温・観察し、と殺後、腸の液体貯留値（FA 値）を測定した。その結果、4 時間以内に 50-100%のマウスが 1-4 回排便した。排便した 14 匹中、11 匹が少なくとも 1 回の水様性下痢を発症した。投与後 4 時間の FA 値は、1 検体を除き陰性対照とほぼ同じ値を示したが、投与後 1.5 時間の FA 値は有意に上昇した。大腸菌耐熱性毒素やコレラ毒素の FA 値は約 8 時間前後高レベルで持続することが報告されており、それらと比較すると、クドア孢子の腸管液体貯留活性は持続性がなく、一過性であることが特徴であった。また、クドアが腸管液体貯留活性を示すには約 10^6 個の孢子数を必要としたことから、ヒトの発症にも摂取孢子数の閾値が存在すると推測された。食中毒事例のヒラメから抽出したクドアの 18S rDNA の塩基配列を解析した結果、4 検体とも *Kudoa septempunctata* の配列と 100%一致し、本種は *K. septempunctata* と同定された。以上より、ヒラメを共通食とする原因不明食中毒の原因物質として *K. septempunctata* が有力な候補であると考えられた。また、*K. septempunctata* 孢子の腸管液体貯留活性は 95℃5 分で完全に失活したことから、本食中毒の発生は少なくともヒラメを加熱することで予防できると考えられた。

A. 研究目的

平成 15 年から生鮮魚介類を共通食とする原因不明食中毒が全国的に増加している。本食中毒の主な症状は一過性の下痢や嘔吐などで、発症までの平均時間は約 6 時間と非常に短い。これらの症例では患者の喫食残品から既知の食中毒細菌やウイルスなどは検出されず、原因物質を特定できないことが大きな特徴となっている。これまでの調査から、患者の共通食として生食用のヒラメが含まれている事例が多いことが明らかになっており、さらに解析を行ったところ患者が喫食したヒラメにはクドア属に属する粘液胞子虫（以下、クドアと略す）が有意に含まれていることが明らかになった。しかし、一般的には魚類に寄生するクドアはヒトに対して病原性がないと考えられており、クドアを食中毒原因物質と決定するためには、動物モデルで下痢活性や嘔吐活性を証明する必要があった。

平成 22 年 8 月 2 日、大阪府豊中市において、法事で松花堂弁当を喫食した 28 名中 20 人が嘔吐・下痢等の食中毒様症状を呈する事件が発生した。当所で患者便と喫食残品を検査したところ、食中毒細菌およびノロウイルスはすべて陰性であり、弁当メニューにヒラメが含まれていたことから、いわゆる生鮮魚介類を共通食とする原因不明食中毒の可能性が疑われた。喫食残品のヒラメの寄生虫検査を実施したところ、ヒラメから 1g あたり 10^7 オーダーのクドア胞子が検出された。そこで我々は、今回の事例において患者の初発症状が嘔吐より下痢が多かったことに注目し、クドア胞子の下痢活性を乳のみマウスという動物モデルを用いて証明することを試みた。

乳のみマウス試験は大腸菌耐熱性 (ST) 毒素をは

じめ、コレラ毒素や下痢性貝毒などの下痢原性毒素の検出に使用されてきた。本試験は、同様の下痢原性試験法の一つであるウサギ腸管ループ試験より少量の試料で診断可能であり、多検体処理に適している。

本研究では食中毒 4 事例の喫食残品および関連品のヒラメから抽出したクドア胞子を乳のみマウスに投与し、クドア胞子が下痢活性を有することを証明した。さらに、従来の乳のみマウス法を改良してクドア胞子の下痢活性評価法を構築するとともに、クドア胞子の下痢活性を抑制する方法を検討したので、あわせて報告する。

B. 研究方法

1. ヒラメ材料

2010 年に豊中市、神戸市、北九州市で発生した 3 事例の原因不明食中毒で得られた喫食残品のヒラメをサンプルに供した。また、2010 年に発生した広島市の食中毒事例では喫食残品が入手できなかったため、同一のいけすで飼育されていたヒラメ 10 匹を調べ、クドア胞子数の最も多いヒラメをサンプルとして使用した。

2. ヒラメ筋肉中からクドア胞子の精製

ヒラメ筋肉を 1g 秤量し、筋肉上に $45\mu\text{m}$ ナイロンメッシュをのせ、PBS 4ml を加えた。メッシュの上から圧をかけながら筋肉をほぐし、クドア胞子を粗抽出した。この粗抽出液を $100\mu\text{m}$ ナイロンメッシュでろ過し、ろ液と残渣に分けた。ろ液は氷中に保存した。残渣には 10ml の PBS を加えて氷上で 1 時間振盪した。その後、 $100\mu\text{m}$ ナイロンメッシュに通してろ液を回収した。得られたろ液を先に氷中に保存しておいたろ液と合わせ、 $1500\times\text{g}$ 、

15分、4℃で遠心を行った。得られた沈渣にクドア胞子が含まれているため、沈渣を1mlのPBSで懸濁してクドア胞子抽出液とした。パーコール処理によってクドア胞子を精製する場合は、30%パーコール3mlの上に15%パーコール3mlを重ねた15mlチューブを作製し、クドア胞子抽出液1mlを15%パーコールの上に重層した。チューブを3,500rpm、10℃、遠心分離を行った。沈渣に精製されたクドア胞子が含まれているのでPBSに浮遊させた。

3. 乳のみマウス試験

4~5日齢のddYマウスにクドア胞子抽出液を0.1ml経口投与した。25℃で1.5時間または4時間保温・観察した後にと殺し、腸の液体貯留値（FA値）を測定した。1サンプルにつき3~6匹のマウスを使用し、Student's *t* testを用いて統計解析した。

C. 研究結果

1. 乳のみマウス試験に用いたヒラメが喫食された食中毒事例

2010年の8月以降に、豊中市、神戸市、北九州市および広島市で発生したヒラメを共通食とする原因不明食中毒事例の疫学情報を表1に示した。4事例はいずれも潜伏時間が平均4.3~8.4時間と比較的短く、下痢、嘔気、嘔吐が主症状であった。豊中市の事例ではヒラメのオッズ比は19.0と高かった。

2. ヒラメ筋肉から抽出したクドア胞子の種の同定

ヒラメ4検体から抽出したクドア胞子の極囊の数は6極が主体であった（図1）。18S rDNAの塩基配列1,528bpを解析した結果、*Kudoa septempunctata*の配列と100%一致した。ヒラメ筋肉寄生性の *K.*

septempunctata、*K. thyrsites*、*K. lateolabracis*の鑑別PCR（横山ら、未発表）を行ったところ、*K. septempunctata*のみ陽性となった。以上の結果より4事例のヒラメサンプル中のクドアは *K. septempunctata* であると同定した。

3. *K. septempunctata* の下痢活性

1) 豊中市（4℃9日保存）、神戸市、北九州市および広島市事例のヒラメサンプルから抽出した $0.81 \sim 1.2 \times 10^6$ 個の *K. septempunctata* 胞子を乳のみマウスに経口投与した結果、4時間以内に50~100%のマウスが1~4回排便した。排便した14匹中、11匹が少なくとも1回の水様性下痢を発症した。特に、広島市サンプルから抽出した 9.6×10^5 個の *K. septempunctata* 胞子を投与したマウス群は、排便率が83%と最も高く、排便したマウスはいずれも2~4回の水様性下痢を発症した（表2、図2）。

2) 豊中市サンプルで4℃保存試験を行った結果、17~24日と保存日数が経過するとマウスの排便率が低下した。

3) 投与後4時間後のFA値は、広島市サンプルが0.070であり、陰性対照と比較して有意差が認められた（ $P < 0.005$ ）。しかし、他のサンプルではFA値はすべて0.057~0.065であり、有意差は認められなかった。

4) 北九州市サンプル（4℃4日間保存）から抽出した *K. septempunctata* 胞子 8.1×10^5 個を投与したマウス群では、投与後1.5時間で、FA値は0.088（ $P < 0.005$ ）となり、また、広島市サンプル（4℃6日間保存）から抽出した *K. septempunctata* 胞子 1.3×10^6 個を投与したマウス群でも、FA値は0.092（ $P < 0.001$ ）となり、どちらも有意に増加した（表3）。

5) 広島市サンプル（4℃6日保存）から抽出した *K.*

sempunctata 胞子を 10 倍階段希釈し、それぞれ 1.3×10^5 個および 1.3×10^4 個を投与したマウス群では、投与後 1.5 時間の FA 値は低く、陰性対照と有意差は認められなかった。

6) 広島市サンプルの保存試験では、保存日数の経過とともに FA 値が減少し、13 日目には陰性対照との有意差が認められなくなった。

7) 広島市サンプル (4°C 6 日保存) から抽出した *K. sempunctata* 胞子を 95°C 5 分間の加熱処理後に投与したマウス群では、FA 値は低く、陰性対照と有意差は認められなかった。

D. 考察

1. クドアの同定

乳のみマウス試験に使用した 4 サンプルのヒラメから抽出したクドア胞子は、18S rRNA 遺伝子の塩基配列解析と横山らが開発したヒラメ筋肉寄生性クドアの鑑別 PCR により、*K. sempunctata* と同定された。本種は 2010 年に Matsukane ら (文献 1) が韓国産のヒラメから分離し、新種と報告したものである。ヒラメ筋肉寄生性クドアとして知られている 2 種類の *K. thyrsites*、*K. lateolabracis* は

(文献 2) は、鑑別 PCR で陰性であることが明らかになったので、食中毒事例由来のヒラメには、*K. sempunctata* のみ寄生していたことが確認された。

2. *K. sempunctata* の下痢活性

比較的保存期間の短い新鮮なヒラメから抽出した *K. sempunctata* 胞子は、経口投与により、乳のみマウスに下痢を発症させた。下痢は投与後早くて 1 時間、遅くて 3.5 時間に認められた。しかし、4 時間後の FA 値は、広島市サンプルを除き陰性対照

と有意な差が認められなかった。そこで、腸管の液体貯留は投与後短時間で発生していると予測し、と殺時間を 4 時間から 1.5 時間に短縮した。その結果、北九州市と広島市サンプルで FA 値が 0.088–0.092 と有意に上昇した。上記と異なるヒラメサンプル由来の *K. sempunctata* 胞子を使用した実験では、パーコール精製したクドア胞子は、精製前のクドア抽出液と同様の液体貯留活性を示した (データ示さず)。一般的に、大腸菌 ST 毒素の検出では 0.083 以上の FA 値が陽性と判定されるので (文献 3)、*K. sempunctata* 胞子は腸管液体貯留活性を有することが明らかとなった。しかし、粗精製の大腸菌 ST 毒素は投与約 1 時間後から腸管の液体貯留が始まり、6–8 時間後まで高い液体貯留活性が維持されると報告されている (文献 4)。10 µg の精製コレラ毒素も活性が 4 時間持続することが確認されている (文献 5)。これら毒素と比較すると、*K. sempunctata* 胞子の腸管液体貯留活性は持続性がなく、一過性であることが特徴であった。以上の結果より、*K. sempunctata* は腸管に液体貯留を起こし、下痢を発症させることが明らかとなった。

また、*K. sempunctata* の胞子数と乳のみマウスの腸管液体貯留活性との関連を調べた実験では、活性を示すには約 10^6 個の胞子が必要であることがわかった。今回使用した食中毒事例のヒラメには約 10^7 個/g の *K. sempunctata* 胞子が寄生しており、10 g 喫食すると約 1 億個の胞子が体内に入ったことになる。今後、事例ごとにヒラメ中の *K. sempunctata* 胞子数と喫食量を調べ、ヒトの最小発症胞子数を明らかにしたい。

今回、*K. sempunctata* 胞子の活性は、95°C 5

分で完全に失活することがわかった。ヒラメを共通食とする *K. septempunctata* が原因物質と推定される食中毒は、少なくとも加熱することで予防できると考えられた。

E. 結論

- 今回の研究に使用した食中毒 4 事例のヒラメから抽出したクドアはすべて *K. septempunctata* と同定された。
- *K. septempunctata* 胞子は、経口投与により、乳のみマウスの腸管に液体を貯留させ、下痢を発症させた。
- *K. septempunctata* 胞子が液体貯留活性を示すには、鮮度のよいヒラメから抽出した約 10^6 個の胞子が必要であった。
- *K. septempunctata* 胞子の液体貯留活性は、 95°C 5 分で完全に失活した。

F. 参考文献

1. Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., and Sugita-Konishi, Y. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol Res* 2010; **107**: 865-872.
2. Yokoyama, H., Whipps, C. M., Kent, M. L., Mizuno, K., and Kawakami, H. (2004): *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathol* 2004; **39**: 79-85.
3. Lovett, J. and Peeler, J. T. Detection of

Escherichia coli enterotoxins by using mouse adrenal cell and suckling mouse assays: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 1984; **67**: 946-949.

4. Giannella, R. A. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect Immun.* 1976; **14**: 95-99.

5. Nishibuchi, M., Seidler, R. J., Rollins, D. M., and Joseph, S. W. *Vibrio* factors cause rapid fluid accumulation in suckling mice. *Infect Immun.* 1983; **40**: 1083-1091.

G. 研究発表：なし

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：なし

表1 乳のみマウス試験に用いたヒラメが喫食された原因不明食中毒事例

発生日	都市	推定原因食事	患者数 / 喫食者数 (%)	患者		平均潜伏時間 (hr) ^a	症状 (%) ^b	食品のオッズ比の範囲	ヒラメのオッズ比	
				男/女	平均年齢 ^a				OR	95% CL
H22.8.2	豊中	松花堂弁当	20/28 (71.4)	6/14	48.1 [15-75]	5.8 [0.5-16]	D (85.0), M (75.0), N (70.0), E (70.0), A (55.0), H (45.0), F (40.0), C (25.0)	1.50-19.00	19.00	1.97-183.44
H22.8.13	神戸	寿司	3/4 (75.0)	1/3	NA ^c	4.3 [4-4.5]	D (100), E (100), other unknown	NA ^c	NA ^c	NA ^c
H22.9.27	北九州	宴会料理 (寿司、刺身を含む)	8/31 (25.8)	0/8	45.9 [41-55]	7.4 [3-18]	D (100), N (87.5), E (62.5), M (62.5), C (62.5), A (50.0), H (12.5), F (12.5)	0.67-2.31 ^d	1.31 ^e	0.21-8.18 ^e
H22.10.10	広島	宴会料理 (刺身、天ぷらなど)	9/21 (42.9)	4/5	31.2 [1-72]	8.4 [4.5-16]	N (88.9), F (66.7), D (33.3), A (22.2), E (22.2), H (22.2)	NA ^c	NA ^c	NA ^c

^a []は範囲

^b 略語: A, 腹痛; C, 悪寒; D, 下痢; E, 嘔吐; F, 発熱; H, 頭痛; M, 倦怠感; N, 嘔気

^c NA: 不明

^d 15食品中8食品が計算不能

^e ヒラメは刺身と寿司に使用 刺身のオッズ比は計算不能

表2 乳のみマウス試験における *K. septempunctata* 孢子の下痢原性 (投与後4時間)

サンプル ^a	ヒラメ筋肉中の spore数 (/g) ^b	マウスへの接種 spore数	排便したマウス数 / 接種した全マウス数	水様便の回数 / 総排便回数 ^c	FA比	ヒラメの4°C 保存期間 ^d
豊中	1.6 ± 0.4 × 10 ⁷ (n=8)	8.9 × 10 ⁵	3/3 (100%)	2/3, 1/2, 0/2	0.065 ± 0.004	9日
		1.0 × 10 ⁶	2/5 (40%)	0/1, 0/1	0.061 ± 0.005	17日
		1.5 × 10 ⁶	0/4		0.057 ± 0.003	18日
		1.0 × 10 ⁶	0/6		0.058 ± 0.005	24日
神戸	1.3 ± 0.4 × 10 ⁷ (n=5)	1.2 × 10 ⁶	4/4 (100%)	4/4, 2/3, 1/3, 0/3	0.064 ± 0.009	7日
北九州	9.3 ± 1.5 × 10 ⁶ (n=3)	8.1 × 10 ⁵	2/4 (50%)	1/1, 0/1	0.062 ± 0.002	4日
広島	1.0 ± 0.3 × 10 ⁷ (n=6)	9.6 × 10 ⁵	5/6 (83%)	4/4, 3/3, 3/3, 3/3, 2/3	0.070 ± 0.007 ^e	5日
陰性対照		0	0/6		0.056 ± 0.003	4日
PBS		0	0/5		0.056 ± 0.002	

^a サンプル名は食中毒の発生した都市名を示す。

広島サンプルは食中毒患者が喫食したヒラメと同一のロット品である。

^b nは測定回数

^c 排便したマウスごとの結果を示す。

^d 乳のみマウス試験までの保存期間を示す。

^e 陰性対照と比較して有意差あり (<0.005)

表3 乳のみマウス試験における *K. septempunctata* 胞子の下痢原性 (投与後 1.5 時間)

サンプル ^a	マウスへの接種 spore数	排便したマウス数/ 接種した全マウス数	FA比	ヒラメの4℃ 保存期間 ^b
北九州	8.1×10 ⁵	0/4	0.088 ± 0.011 ^c	4日
	1.5×10 ⁶	0/6	0.083 ± 0.005 ^d	8日
	1.2×10 ⁶	0/6	0.080 ± 0.004 ^d	9日
広島	1.3×10 ⁶	1/6	0.092 ± 0.011 ^d	6日
	1.0×10 ⁶	0/5	0.076 ± 0.006 ^c	8日
	1.5×10 ⁶	0/4	0.069 ± 0.006	13日
広島, 10倍希釈	1.3×10 ⁵	0/6	0.070 ± 0.005	6日
広島, 100倍希釈	1.3×10 ⁴	0/6	0.066 ± 0.007	6日
広島, 95℃10分	1.3×10 ⁶	0/6	0.060 ± 0.006	6日
陰性対照	0	0/6	0.065 ± 0.003	5日
PBS	0	0/6	0.062 ± 0.003	

^a サンプル名は食中毒の発生した都市名を示す。広島サンプルは食中毒患者が喫食したヒラメと同一のロット品である。

^b 乳のみマウス試験までの保存期間を示す。

^{c,d} 排便したマウスごとの結果を示す陰性対照と比較して有意差あり(<0.001^c, <0.005^d)。

^d 乳のみマウス試験までの保存期間を示す。

^e 陰性対照と比較して有意差あり(<0.005^c, <0.001^d)

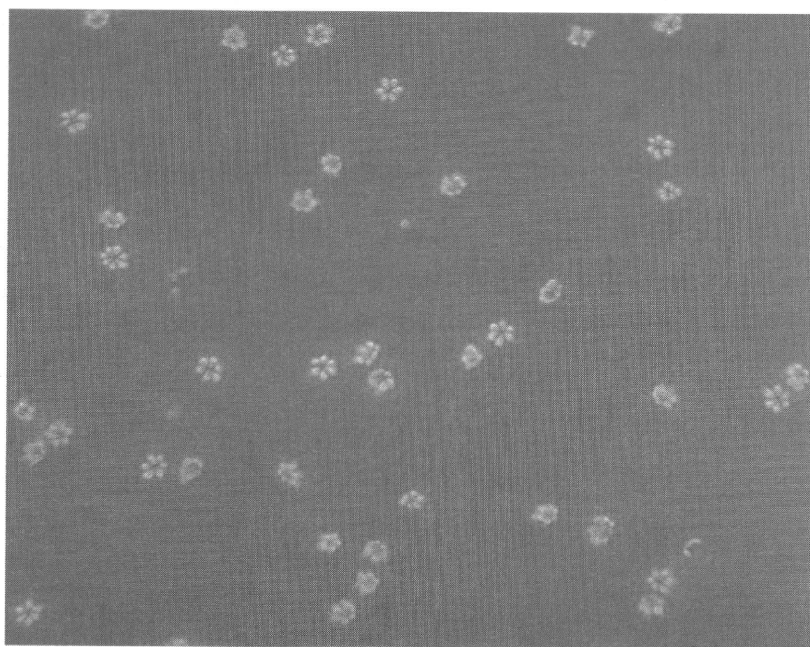


図1 ヒラメ筋肉から抽出した *K. septempunctata* 胞子

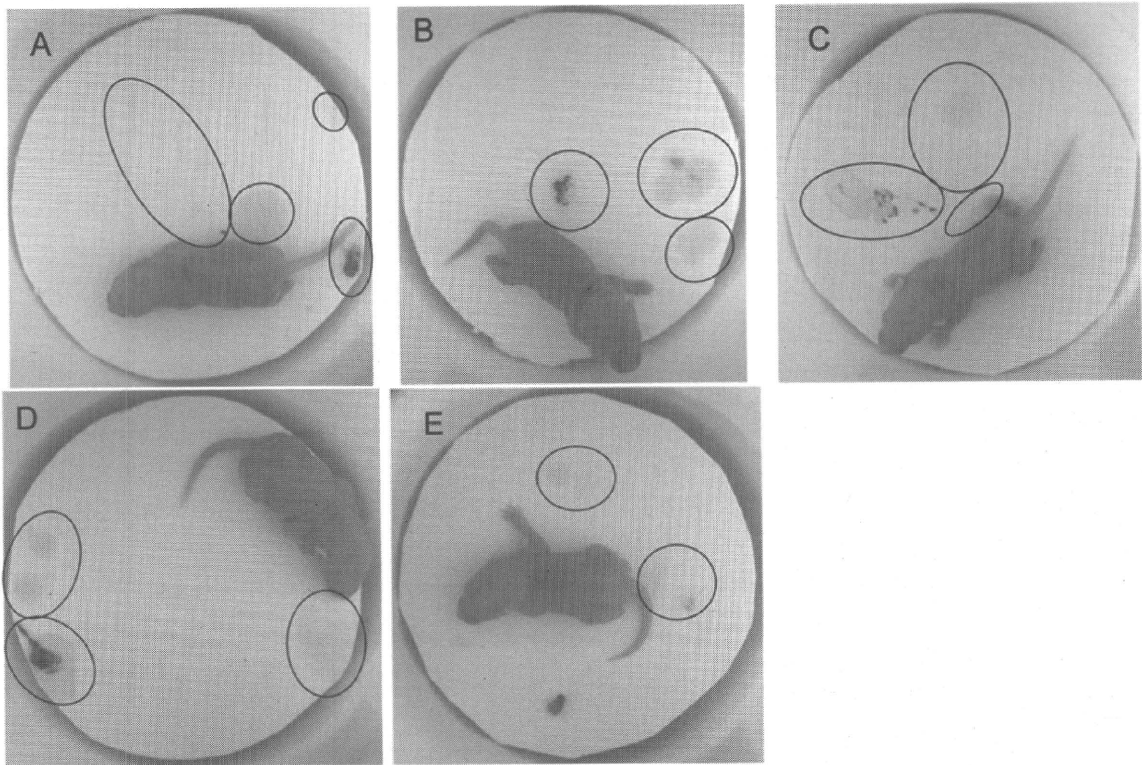


図2 *K. septempunctata* 胞子を投与した乳のみマウス

(広島サンプル、 9.6×10^5 個/マウス、投与後4時間、水様便の記録を円で示す)

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

生鮮魚介類中の危害分子に対する培養細胞を用いた毒性評価法の構築 分担研究報告書

分担研究者 大西 貴弘 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究協力者 久米田 裕子 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課
研究協力者 河合 高生 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課

要旨

近年、生鮮魚介類を共通食とする原因物質不明の食中毒事例が増加している。患者の共通食としてヒラメが含まれている事例が多く、そのヒラメにはクドア属に属する粘液胞子虫（クドア）が有意に含まれていることが報告されている。そこで本研究では培養細胞を用いたクドアの毒性評価法の構築を試みた。本研究ではヒトの結腸癌由来の Caco-2 細胞を用い、Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗（TER）を指標にクドアの腸管毒性の評価を行った。Caco-2 細胞にクドア胞子を接種した結果、接種後 1 時間で TER が接種前の 5 分の 1 以下に低下した。しかし、凍結処理や 37℃ で一晚培養したクドアを接種しても TER の低下は認められなかった。また、超音波破碎したクドアやクドアの培養上清を接種しても TER の低下は認められなかった。クドアは Caco-2 細胞に接種後 18 時間以内に不活化されるが、その後 3 日間培養を継続しても一度低下した TER は回復しなかった。以上の結果から、本法は 1 時間という短時間でクドアの腸管毒性を評価できることが明らかになった。本法は細胞培養以外に特別な技術を必要とせず、多検体処理に向いているため、今後、出荷前のヒラメのスクリーニングやクドアを失活させる条件検討などに有用であると思われる。また今回の結果から、クドアは腸管細胞に接着後、修復不可能な障害を細胞に与えることによって腸管細胞層の物質透過性を亢進させ、下痢症状を引き起こすことが示唆された。クドアが毒素を産生し毒性を示すのか、何らかの物理的な障害を与えるのかは現時点では不明である。今後、本毒性評価法を用いて本食中毒の発症メカニズムの解析を進めていきたい。

A. 研究目的

平成 15 年から生鮮魚介類を共通食とする原因不明食中毒が全国的に増加しており、年間 100 件を超す事例が報告されるように

なっている。本食中毒の主な症状は一過性の下痢や嘔吐などで、発症までの平均時間は約 6 時間と非常に短い。これらの症例では患者の喫食残品から既知の食中毒細

菌やウイルス、化学物質などは検出されな
いか、検出されても臨床症状と一致せず
原因物質を特定できないことが大きな特徴
となっている。これまでの調査から、患者
の共通食として生食用のヒラメが含まれて
いる事例が多いことが明らかになっており、
さらに解析を行ったところ患者が喫食した
ヒラメにはクドア属に属する粘液胞子虫
(以下、クドアと略す)が有意に含まれて
いることが明らかになった。このことから
クドアが本食中毒における原因微生物であ
る可能性が示唆された。その後、乳のみマ
ウスやunksを用いた動物実験によりク
ドアの腸管毒性、嘔吐毒性が確認された(分
担・協力研究者：小西、久米田の本年度の
報告書を参照)。しかしこれまでのところ、
クドアの毒性を評価する培養細胞レベルで
の実験系が確立されていないため、クドア
に関する研究を進めるうえで大きな障害と
なっている。

動物モデルを用いた実験は生体レベルで
の反応を見ることができると、動物実験
から得られたデータをヒトの臨床症状と
比較することが容易である。そのため、あ
る病原物質を最初に評価する場合、非常
に有用である。しかし、動物実験はその性質
から多検体の処理には向かず、実験を行う
にも特別な施設や手技が必要となるため、
どこの研究機関でも行えるというわけでは

なく、スクリーニング検査といった目的に
は使用しづらい。さらに、生体全体の反応
を見てしまうため、病原物質の直接反応を
解析するのには向いていない。一方、培養
細胞を用いた実験系では、動物実験よりも
考慮すべき要素を絞り込めるうえ、タンパ
クレベル、遺伝子レベルでの解析を行える
ため、病原物質の直接反応を解析するの
に適している。また、多検体処理に適して
おり、スクリーニング検査のような目的に
適していると考えられる。こういった利点の
反面、培養細胞を用いた実験系から得られ
た結果をヒトの臨床症状に当てはめる場合
には、結果の解釈には注意を払う必要があ
る。

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞は分化さ
せると腸管上皮細胞特有の刷子縁やタイト
ジャンクションを形成する。特にタイトジ
ャンクション形成により細胞同士が密着す
るため細胞の apical 側と basolateral 側で
物質の自由な透過が妨げられる。このため、
以前より腸管上皮の薬物の吸収モデルや細
菌毒素による下痢発症モデルとして利用さ
れている。本研究では多検体処理に向き、
クドア属の病原性メカニズムを解析する上
で必須の培養細胞を用いたクドアの毒性評
価法を Caco-2 細胞を用いて構築した。

B. 研究方法

1. ヒラメ筋肉中からクドア胞子の精製

ヒラメ筋肉を 1g 計量し、氷上のシャーレにとった。ヒラメ筋肉の上に 45 μ m ナイロンメッシュをのせ PBS 4ml を加えながら、メッシュの上からこすり、筋肉をほぐした。100 μ m ナイロンメッシュでろ過し、ろ液と残渣に分けた。ろ液は氷中に保存した。残渣には 10ml の PBS を加え、室温で 1 時間振盪した。その後、もう一度 100 μ m ナイロンメッシュに通し、ろ液を回収した。得られたろ液を先に氷中に保存しておいたろ液と合わせ、1500rpm、15 分、4°C で遠心を行った。得られた沈渣にクドアの胞子が含まれているため、クドア胞子は 1 ml の PBS に浮遊させた（粗精製クドア）。パーコール処理によってクドアを精製する場合は、30% パーコール 3ml の上に 15% パーコール 3ml を重層した 15 ml チューブを作成し、PBS に浮遊させたクドア胞子 1 ml を 15% パーコールの上に重層した。チューブを 3,500 rpm、10°C、遠心分離を行った。沈渣に精製されたクドア胞子が含まれているので PBS に浮遊させた（精製クドア）。

2. Caco-2 細胞

Caco-2 は 10% FCS 添加と 1% NonEssentialAminoAcid(GIBCO) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium で継代維持した。経上皮電気抵抗 (TER) を測定する場合、Caco-2 細胞を Biocoat Cell

Culture Inserts (BD Biosciences) 内に 2×10^5 cells/ml を加え、37°C、24 時間培養した。培養後、培地を 0.08% MITO+Serum Extender (BD Biosciences) を添加した Enterocyte Differentiation Medium (BD Biosciences) に交換し 24 時間培養する。翌日も同様に培地を交換し、さらに 24 時間培養し Caco-2 細胞の分化を誘導する。分化誘導が完了した Caco-2 細胞の TER を Millicel-ERS (Millipore) によって測定した後、披験物質を Biocoat Cell Culture Inserts に加え、任意の時間培養したのち、再び TER を測定した。

C. 研究結果

3. Caco-2 細胞を用いたクドア毒性評価法の原理

今回作成した毒性評価法の原理を図 1 に示す。24 ウェル細胞培養プレートのウェルに Biocoat Cell Culture Inserts をセットし、Insert 内で Caco-2 細胞の分化を誘導する。分化した Caco-2 細胞はタイトジャンクションを形成するため細胞の apical 側と basolateral 側で物質の自由な透過が妨げられている。この状態が正常な腸管の状態を表していると考えられている。一方、何らかの原因で物質の自由な透過性が亢進した状態は下痢状態の腸管を表していると考えられている。つまり、Insert 内に披験

物質を加えることにより、物質の透過が亢進した場合、その被験物質が下痢原性を持つ可能性が示唆される（図 1 (a)）。今回は Caco-2 細胞層の物質透過性を示す指標として TER を採用した。タイトジャンクションが形成され物質の透過性が妨げられている場合、細胞の apical 側と basolateral 側の間に電気抵抗が発生する。これが TER である。一方、物質の透過性が亢進した場合、apical 側と basolateral 側の間の電気抵抗は低下すると考えられる。今回は TER を測定することによりクドアの腸管毒性を測定した（図 1 (b)）。

4. クドアの TER 低下作用

分化誘導完了後の Caco-2 細胞に粗精製クドアを接種し、17 時間培養したところ、コントロールの Caco-2 細胞の TER は約 3,500 Ω を示したが、粗精製クドアを加えると TER は約 750 Ω まで低下した（図 2）。精製クドアを接種した場合も同様に TER の低下が認められた（図 2）。しかし、超音波破碎した精製クドアを接種しても TER の低下は認められなかった（図 2）。

本食中毒の特徴として最短で 2 時間程度、平均で 5 から 6 時間という非常に短い潜伏期間があげられる。そこで、クドアを接種した時に見られる TER の低下がどの程度の時間経過で現れるか、時間経過を追いながら TER の測定を行った（図 3）。その結果、

精製クドア接種後 1 時間で TER が接種前の 5 分の 1 にまで低下した。また、一度凍結したヒラメから精製したクドアは乳のみマウスに対する下痢原性やunks に対する嘔吐毒性を示さないことが知られている（分担・協力研究者：小西、久米田の本年度の報告書を参照）。そこで、 -80°C 、1 週間、凍結を行ったヒラメからクドアを精製し、Caco-2 細胞に接種したが TER の低下は認められなかった。また、クドアが培地中に毒素を産生しているかどうかを調べるために、精製クドアを Enterocyte Differentiation Medium 中に $1 \times 10^6/\text{ml}$ 加え、 37°C で 18 時間培養した。この培養上清で Caco-2 細胞を培養したが TER の低下は見られなかった（図 4）。超音波破碎した精製クドアを接種しても同様に TER の低下は認められなかった（図 4）。さらに、Enterocyte Differentiation Medium 中で 18 時間培養したクドアを接種しても TER の低下は認められなかった。また、精製クドア接種 4 日後まで TER の測定を続けたが、一度低下した TER は回復しなかった（図 5）。

D. 考察

5. Caco-2 細胞を用いたクドア毒性評価

今回の結果から、活性を保持しているクドアは Caco-2 細胞層の TER を低下させることが明らかになった。しかも、クドア接種

後1時間という非常に短い時間でTERの低下が見られた。この結果はヒトの臨床症状や動物実験の結果と一致する。また、これまでに凍結したヒラメから精製したクドアは動物毒性を示さないことが知られているが、本毒性評価法でも同様の結果が得られた。一般的にCaco-2細胞層の物質透過性の亢進は下痢状態の腸管を表していると考えられている(文献)。以上のことから、Caco-2細胞のTERを測定することによって、クドアの腸管毒性を評価できることが明らかになった。

本毒性評価法は細胞培養技術以外に特別な手技を必要としない。TERの測定自体も市販の専用のTER測定装置を細胞培養プレートに差し、ボタンを押すだけで結果が判り、だれが行っても失敗がない。また、動物実験と異なり多検体処理に非常に向いており、さらにクドア接種後1時間程度で結果を得ることができる。以上の結果から、本毒性評価法はクドアの腸管毒性を評価する場合に非常に簡便かつ有用な方法であると考えられる。

クドアの検査方法として動物実験以外にリアルタイムPCRによるクドア遺伝子の検出方法がすでに普及し始めている。リアルタイムPCR法は非常に感度がよく、食中毒事例の喫食残品からクドアの検出を行うような場合には、非常に有効な方法であると

考えられる。しかし、リアルタイムPCR法は遺伝子の存在を検出するだけなので、出荷前のヒラメにクドアが存在するかどうかをスクリーニングする場合のように、食中毒を起こすことのできる活性のあるクドアが今、食品中に含まれているかどうかを判定する目的には使用しづらい。また、実験動物を用いた方法では多検体処理には向かない。よって本毒性評価法はヒラメ出荷時のクドアのスクリーニングやクドアを失活させるための条件検討のような活性のあるクドアを検出する必要があり、かつ多検体処理が必要な場面で有効な方法であると考えられる。

6. クドアの腸管毒性機序の解析

今回の結果から、一度低下したTERは4日後まで培養を続けても回復しないことが明らかになった(図5)。しかし、クドアは培地中で37℃、18時間培養すると失活し、このクドアをCaco-2細胞に接種してもTERの低下を引き起こすことができない(図4)。つまり、活性のあるクドアをCaco-2細胞に接種しても、最初の1日目でクドアは失活してしまっていると考えられる。それにもかかわらず、その後培養を続けてもTERが回復しないことから、接種後すぐにクドアはCaco-2細胞に対して不可逆的な障害を与え、これがTERの低下につながっていることが示唆された。

細胞に対してこのような障害を与える作用機序として、毒素性のものと、物理的なものが考えられる。現時点ではクドアがどちらの機序によって毒性を示しているのかは明らかでない。クドアが毒素を産生して分泌している可能性があるため、クドアを培地中で 18 時間培養したその培養上清を Caco-2 細胞の Cell Culture Inserts 内の培地と置き換え培養したが TER の低下は見られなかった (図 4)。また、細菌の LPS のように虫体成分自体が毒性を示したり、虫体内に毒性成分が貯留している可能性を考慮して、超音波破碎したクドアを Caco-2 細胞に接種し培養したが、TER の低下は見られなかった。また、クドアの破碎液を Cell Culture Inserts 内の培地と置き換え培養を行ったが TER の低下は認められなかった (データ示さず)。これらのことから、クドアによる毒性は毒素性のものではない可能性が示唆された。毒素を産生していた場合でも、毒素が Caco-2 細胞表面の受容体に結合し、作用が現れるといった単純な系ではなく、たとえばクドアが毒素を細胞内に直接注入するといったような、活性のあるクドアが介在する必要がある機構が存在している可能性が考えられた。今後、本毒性評価法を用いてクドアによる腸管毒性発現機構の解析を進めていきたい。

E. 結論

- Caco-2 細胞を用いた本毒性評価法を用いることによってヒトの臨床症状や動物実験の結果に準じたクドアの毒性を検出することができた。
- クドアは何らかの機構により腸管上皮細胞に不可逆的な障害を与え、その結果、腸管上皮細胞の物質透過性を亢進させ、下痢症状を引き起こすことが示唆された。

B. 参考文献

C. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表