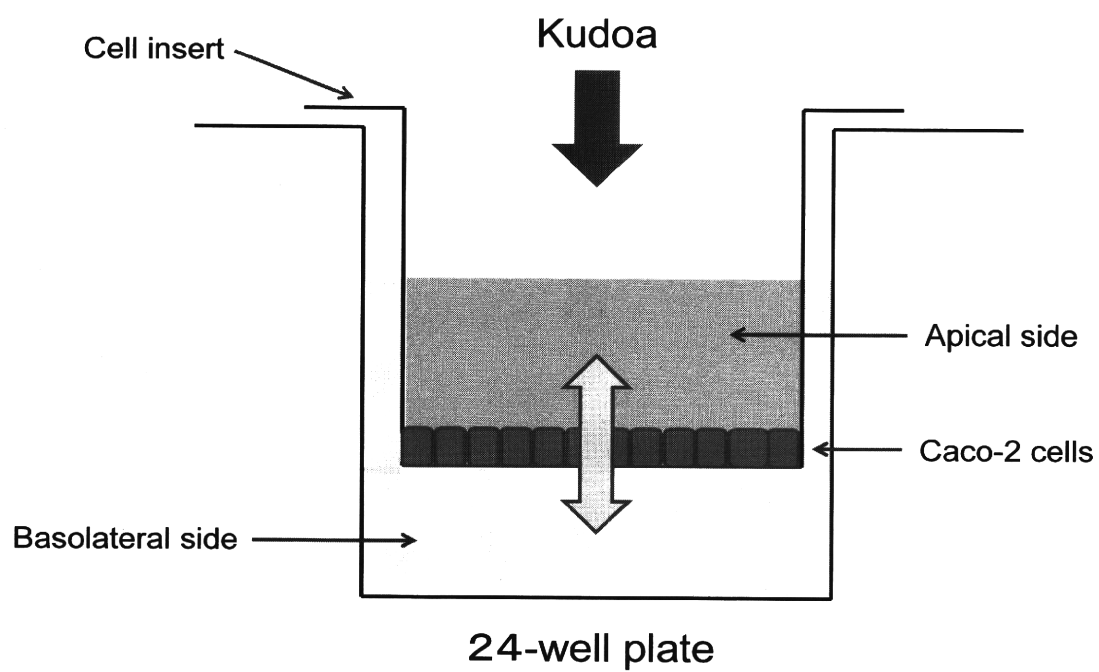


(a)



(b)

TER測定装置

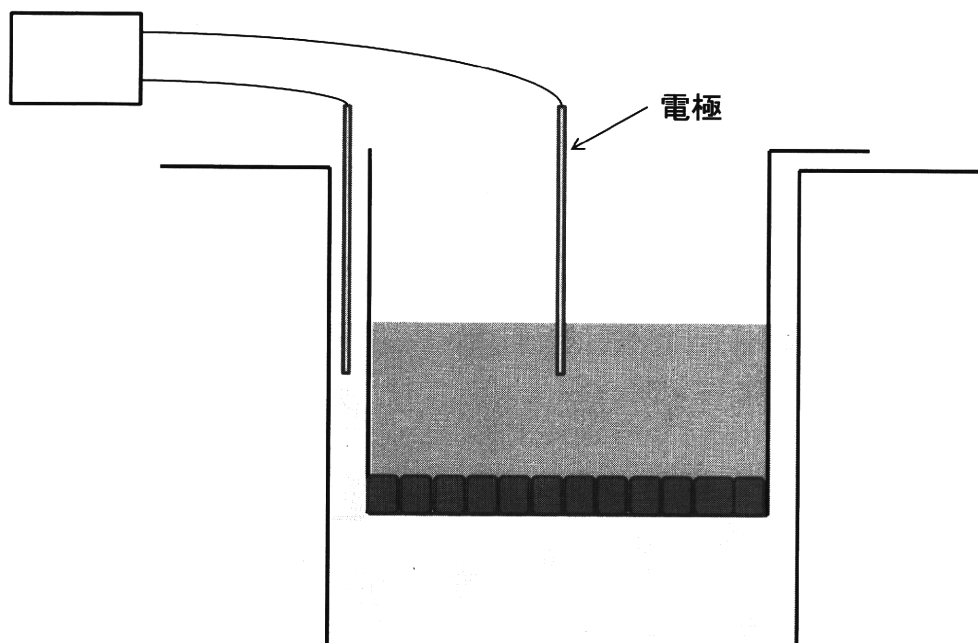


図1 Caco-2細胞を用いたクドア毒性評価法の原理

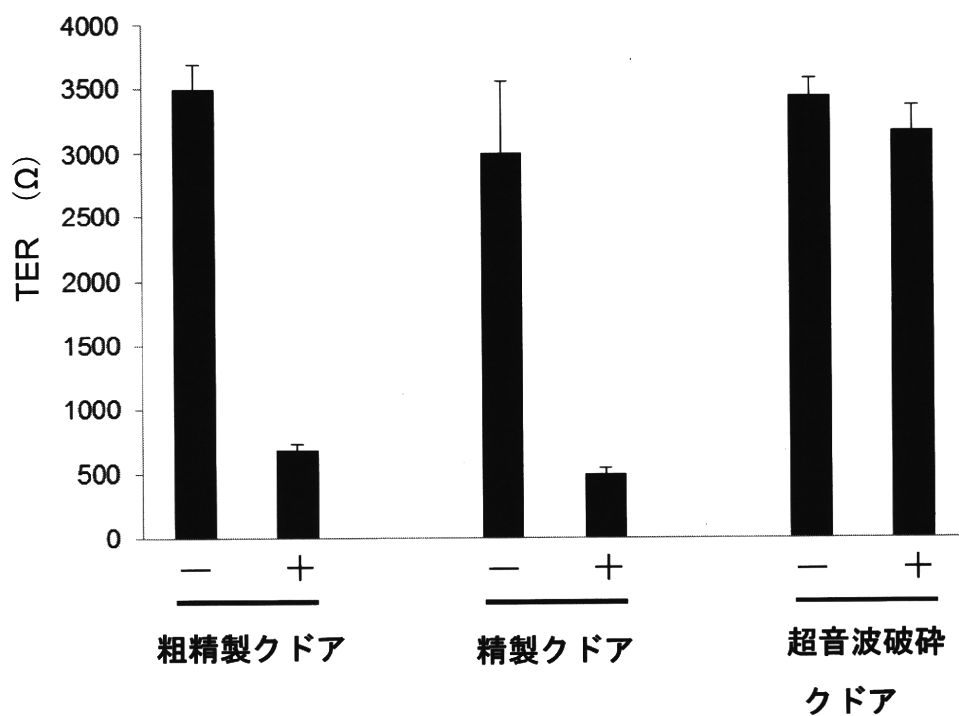


図2 クドア接種17時間後のTERの変化

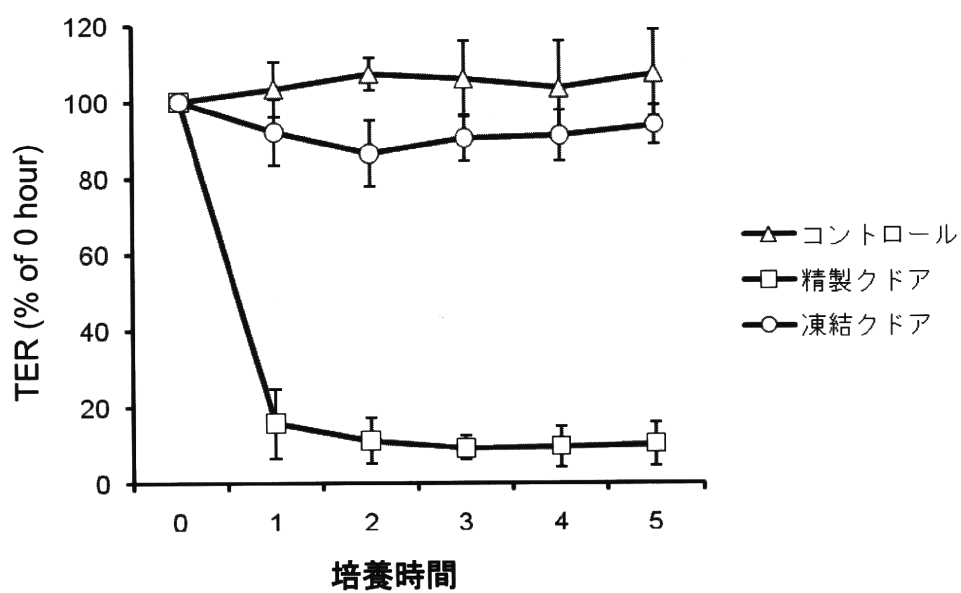


図3 クドア接種によるTERの経時的変化

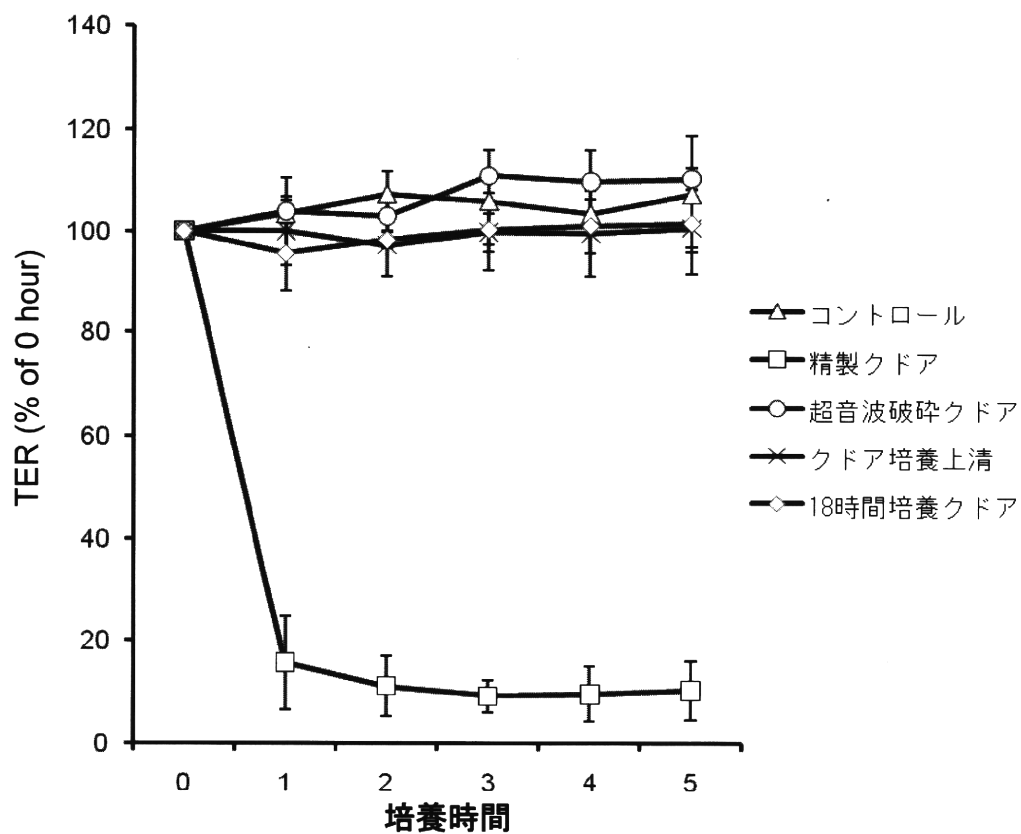


図4 クドア処理条件による TER の変化

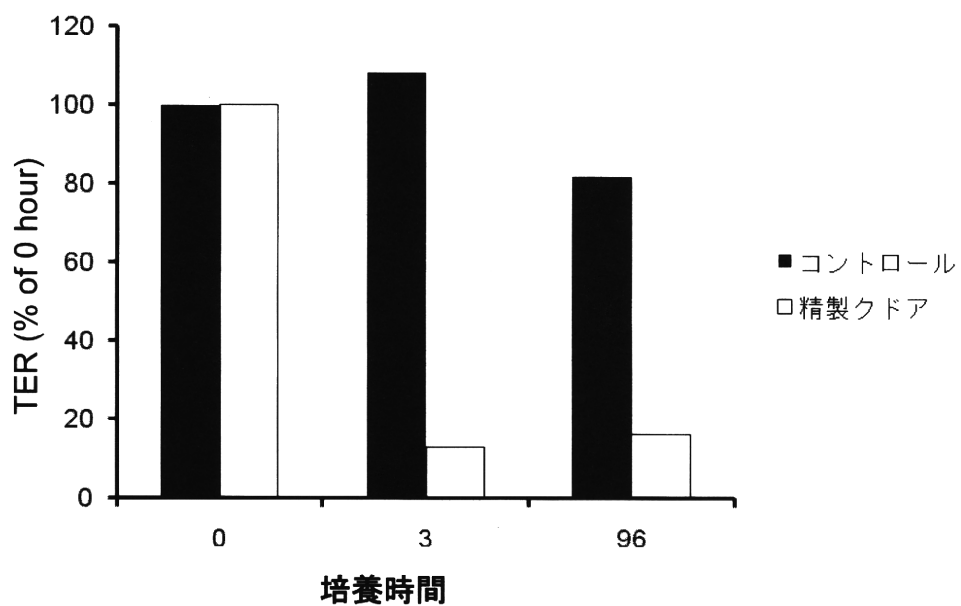


図5 クドア接種 96 時間後の TER の変化

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

ヒラメ中のクドア汚染分布と定量的検出系の構築 分担研究報告書

研究分担者 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 飯島 義雄 神戸市環境保健研究所 微生物部

研究協力者 中西 典子 神戸市環境保健研究所 微生物部

要旨

原因不明食中毒の推定原因物質として、ヒラメに汚染した粘液胞子虫の一種、*Kudoa septempunctata* (クドア) が考えられている。ヒラメの中での汚染分布の状況と定量的検出方法に関して検討を行った。

クドア胞子が汚染したヒラメを用いて、同一個体中のクドア胞子の汚染分布を明らかにした。その結果、クドア胞子の濃度にある程度のばらつきが認められたが、1 グラム当たり 100 万個以上汚染している場合は、可食部においてクドア胞子が検出されない部位が存在する可能性は極めて少ないと考えられた。そのため、クドア汚染の有無は、食中毒事例残品のどこをとっても、濃度の差はあるものの検出ができると判断された。これらの結果はサンプリングプランに重要な知見となる。

また、地方自治体等が検査として用いるに適したクドアの検出法の構築をおこなった。このクドアの 18S rDNA の配列に基づき、リアルタイム PCR による定量的検出系を構築した。食中毒の原因と推察されるヒラメ全てから、クドアが検出されるなど、このクドアが嘔吐・下痢症状の原因となっている可能性が高いことが示された。このリアルタイム PCR による検出系と遺伝子組換えで作製した標準品(陽性コントロール)は、食中毒発生時の原因究明の有用なツールであるだけでなく、予防対策のツールとしても有効であると考えられる。

A. 研究目的

ヒラメの喫食により起こる原因不明食中毒の事例品から、粘液胞子虫であるクドアが高頻度で検出されることより、クドアが食中毒の原因である可能性が高まった。このクドアは、*Kudoa septempunctata* と命名され、新種であることが判明した(平成 20 年度研究結果)。このことより、原因不明食中毒事例品から、このクドアを検出する汎用性の高い検査法を確立する必要がある。

本研究は、ヒラメのクドア胞子の汚染分布状況を調査するとともに、このクドアの 18S rDNA の配

列に基づき、リアルタイム PCR を用いた定量的 PCR を構築し、この原因不明の食中毒との因果関係解明や予防対策等に資することを目的とする。

B. 研究方法

1. ヒラメのサンプリング法の検討

大分県農林水産研究指導センター水産研究部 福田穰博士より、クドア胞子が感染したヒラメの分与を受けた。1 グラム当たり 10 万個から 100 万個のクドア胞子が感染したヒラメ 4 検体を用い、

同一個体中の可食部から表側 5 か所、裏側 5 か所の筋肉を採取し、クダア胞子の汚染分布を顕微鏡所見により測定した。

2. クダア胞子の顕微鏡所見と計測

ヒラメの筋肉 1g を秤量してシャーレに入れ、筋肉上に 45 メッシュ(篩目開き約 300 μm)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、粗精製液とした。この粗精製液を 100 メッシュ(篩目開き約 150 μm)でろ過し、ろ液を 1,500 回転、10 分間、10°C で遠心分離を行った。得られた沈渣を適時 PBS で溶解し、クダア胞子懸濁液とした。沈渣を 1 ml の PBS で懸濁して血球計算版でクダア胞子数を計測した。

3. クダアの精製

上記のクダア胞子懸濁液を、30% Percoll に重層し、3,000 回転、10 分間遠心した。Percoll を通過した分画より、クダアを精製した。

4. 定量的 PCR の構築

クダアの 18S rDNA の配列 (accession no. AB553293) に基づき、リアルタイム PCR による定量的検出系を設計した。18S rDNA は、全ての真核生物が保有する遺伝子なので、他の生物を検出しないよう設計に留意した。

5. プラスミドの作製

クダアの 18S rDNA の遺伝子のクローニングを行なった。リアルタイム PCR に用いる配列を含む、1,184 塩基を PCR で増幅し、TA クローニングによりプラスミドに組み込んだ。プラスミドをインビトロジェン社の Hipure Plasmid Midiprep Kit を使用して精製後、DNA 濃度を測定し、 $1 \times 10^{11} / \mu\text{l}$ になるよう調整した。

6. rDNA のコピー数の算出

クダア 1 胞子中には、複数の rDNA 遺伝子が存在すると考えられるので、クダア 1 胞子当りのコピー数を、精製クダアを鏡検にて胞子数を求めた後、DNA を抽出し、リアルタイム PCR で

rDNA のコピー数を算出した。

7. 食中毒事例ヒラメ中のクダアの定量

キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit の「組織からのプロトコール」に準じて、原因食材と推察されるヒラメ 61 検体から DNA を抽出した。その DNA をリアルタイム PCR にかけて、Ct 値を求めた。濃度を調整したプラスミドを段階希釈し、検量線からクダアの DNA 量を求めた。1 胞子当り 18S rDNA のコピー数で除して、クダア胞子数を算出した。

また、同じ検体を 2 に記した方法でクダア胞子数を求めた。

8. 吐物からのクダアの検出

患者の吐物 5 検体から、DNA を抽出し、上記の方法に準じて、クダアの検出を試みた。

9. 稚魚からのクダアの検出

ヒラメの稚魚のクダアによる汚染状況を調べる目的で、3 種類の成長段階(全長約 40 mm, 約 53 mm, 約 58 mm)にある稚魚各 100 匹、計 300 匹から DNA を抽出し、クダアを検出した。効率を高める目的で、クダアを 2 分割し、その半身 10 個を 1 サンプルとし、リアルタイム PCR にかけた。リアルタイム PCR で陽性となった場合、残りの半身 10 個から個別に DNA を抽出し、リアルタイム PCR で検出した。

12. 飼料からのクダアの検出

汚染経路を調べる目的で、ヒラメの稚魚に与える生物餌料「L 型ワムシ」3 ロットと「アルテミア幼生」3 ロット、配合飼料である「アンブローズ」4 ロットと「おとひめ」1 ロットから、クダアの検出を試みた。

10. 倫理面への配慮

本研究では、研究対象者が特定されことなく、調査・解析を行なった。

C. 研究結果

1. ヒラメのサンプリング法

クドア孢子の感染したヒラメのうち、1 グラム当たり 100 万個以上感染している検体 3 検体と、10 万個以上感染している検体 1 検体の計 4 検体を用いて、分布を調べた。

表 1 にそれぞれの部位のクドア孢子数を示したが、検体 1-3 までは 100 万個以上感染しているヒラメの結果である。検体番号 1 では平均 638.3 万孢子が感染しており、部位による相対偏差は 27.7% であった。検体番号 2 では平均 427.1 万孢子が感染しており、部位による相対偏差 21.3% であった。検体番号 3 では平均 356.2 万孢子が感染しており、部位による相対偏差 24.4% であった。

一方、10 万孢子以上汚染しているヒラメ(検体番号 4)では平均 69.6 万孢子が感染しており、部位による相対偏差は 54.8% であった。また、採取する部位により、クドア孢子数が検出されない場合もあることがわかった。

3. リアルタイム PCR

クドアの 18S rDNA の配列を基に設計したリアルタイム PCR の検出系(表 2)は、ヒラメ、他のクドア属、腸内細菌等には反応せず、特異的にクドアを検出した。

4. rDNA のコピー数の算出

1 孢子中のクドアの 18S rDNA は約 40 個と算出された。リアルタイム PCR で得られた 18S rDNA のコピー数を、この値で除して、クドアの孢子数を求めた。

5. ヒラメ中のクドア孢子数

DNA 濃度の分かったプラスミドを用いて、検量線を作成し、検体の Ct 値より、ヒラメ中のクドア孢子数を算出した(図 1)。

食中毒の原因と推察されるヒラメの中の、クドア孢子数を、鏡検とリアルタイム PCR で比較した(図 2)。鏡検では 1 グラム当たり 10 万以下では確

認できなかった検体もあるが、リアルタイム PCR では、全ての検体からクドアから検出された。

鏡検で検出できなかった検体を除いた検体の鏡検とリアルタイム PCR の間には $y = 1.017 \times x$ の近似直線が得られ、比較的高い相関関係にあった(相関係数 $R^2 = 0.47$)。

リアルタイム PCR から算出したクドアの数量は、1 グラム当たり 100 万個が最も多く(29.5%)、次いで 1,000 万個で(24.6%)で、1 億個を超えるものはなかった(図 3)。

6. 吐物からのクドアの検出

患者吐物 5 検体中、4 検体からクドアを検出した。吐物中のクドアの孢子数は、原因と考えられるヒラメの中のクドアに比べて、約 1,000 分の 1 であった。

7. 稚魚からのクドアの検出

ヒラメの稚魚 300 匹のうち、1 匹(0.33%)からクドアを検出した。18S rDNA の塩基配列を決定し、クドアであることを確認した。

8. 飼料からのクドアの検出

ヒラメの稚魚に与える飼料からは、このクドアは検出されなかった。配合飼料である「おとひめ」から、このクドアとは異なるクドア属を検出したが、塩基配列の BLAST 検索の結果、*Kudoa* sp. MMAG-5、*Kudoa* sp. MMAG-1、または *Kudoa alliaris* と考えられた。

D. 考察

サンプリングプランの検討では、100 万孢子以上汚染しているヒラメにおいて、可食部のどの部位を採取しても、クドア孢子が陰性となる可能性は低いと考えられ、そのばらつきは、相対偏差 30% 以下であった。しかしクドア孢子が 10 万個以上 100 万個以下の汚染ヒラメの場合は、採取する場所によって陰性となる可能性が否定できないこと、ばらつきが大きいこと(>50%)などが

明らかになった。これらの結果はサンプリングプランに重要な知見となる。

つぎに検出法の構築では、今回設計したリアルタイム PCR による検出系と遺伝子組換えで作製した標準品(陽性コントロール)は、食中毒事例ヒラメ、患者吐瀉物からのクドアの検出に有効であることが分かった。また、リアルタイム PCR の Ct 値からクドア数を推定する式を構築したことで、ある程度のクドアの孢子数が推定できることが明らかになった。

本研究で構築した食中毒発生時の原因究明の有用なツールであるだけでなく、ヒラメの稚魚や流通品のスクリーニング、さらにはヒラメのクドアによる汚染経路解明等のツールとしても有効であると考えられる。

E. 結論

ヒラメを喫食することにより起こる原因不明食中毒の推定原因物質としてクドアが考えられていることから、本寄生虫を検出する検査法およびサンプ

リングプランを構築した。1グラム当たり100万個以上のクドアに汚染されたヒラメが検体となった場合には、可食部のどの部位をとってもクドアは検出されることが確かめられたが、1グラム当たり10万個以下の場合には、顕微鏡検では検出されない可能性があった。

今回設計したリアルタイム PCR によるクドアの検出系は、原因究明や予防対策に有効なツールと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表: なし
2. 学会発表: なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表1. ヒラメ体内のクドアの分布

	クドア孢子数 (10 ⁴ /g)			
採取部位	検体 1	検体 2	検体 3	検体 4
1	897	303	303	ND
2	547	290	290	42
3	569	305	305	54
4	901	270	270	75
5	552	141	141	41
6	690	242	242	10
7	416	179	179	88
8	787	120	120	100
9	352	150	150	150
10	672	197	197	66
平均	638.3	427.1	356.2	69.6
標準偏差	177.2 (27.7%)	91.9 (21.3%)	87.0 (24.4%)	38.2 (54.8%)

表 2. リアルタイム PCR に用いるプライマーとプローブ

名称	種類	塩基配列 (5'-3')
Kudoa-F	センス	CATGGGATTAGCCCGGTTTA
Kudoa-R	アンチセンス	ACTCTCCCCAAAGCCGAAA
Kudoa-P	プローブ	FAM-TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA

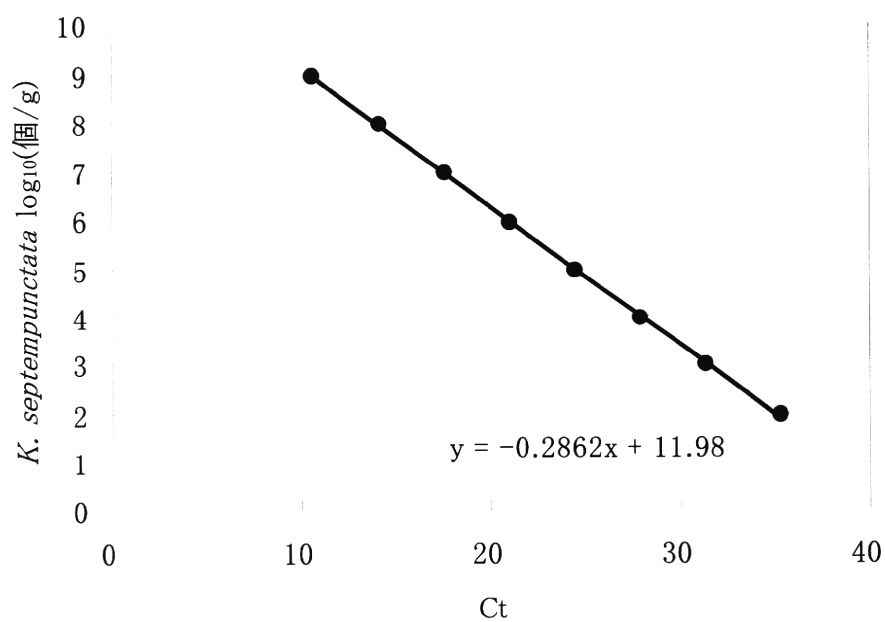


図 1. クドアの孢子数を求めるための検量線

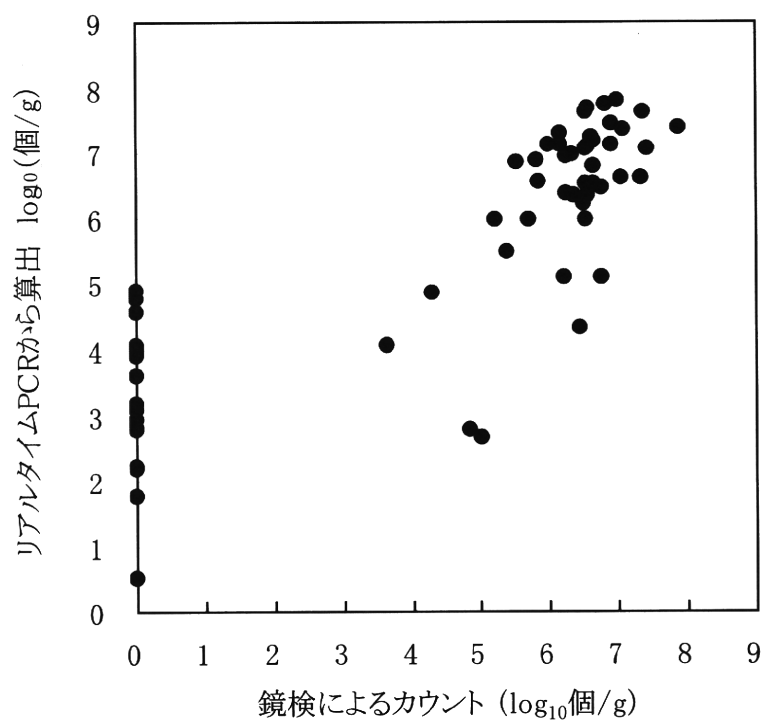


図 2. リアルタイム PCR 検査法と顕微鏡検によるクドア孢子数

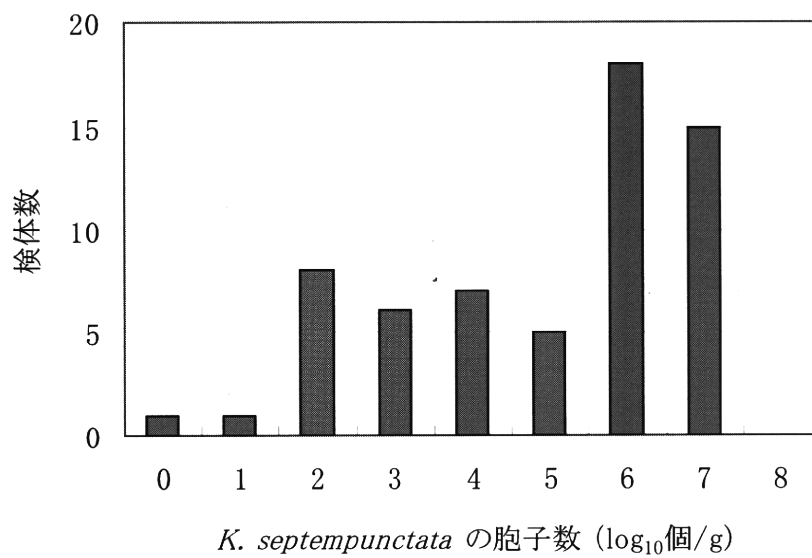


図 3. 事例ヒラメ中のリアルタイム PCR によるクドア推定量(61検体)

厚生労働科学研究費補助金

(厚生労働科学特別研究事業)

ヒラメの筋肉に寄生するクドア属粘液胞子虫 3 種の診断法

分担研究報告書

研究分担者 横山 博 東京大学 助教

要旨

食中毒の原因とされるヒラメの筋肉寄生 *Kudoaseptempunctata* を他の粘液胞子虫と区別して検出するため、28S rDNA に基づく PCR 診断法を開発した。この方法は特異性、検出感度ともに高いことが示され、実際のヒラメを用いた検査にも応用できた。また、現場で使える簡易診断法として、鰓蓋裏筋肉内の胞子の顕微鏡検査が有用であることが示された。さらに、胞子の活性評価法として極糸弾出率を測定したところ、5℃で 24 時間冷蔵保存した胞子は活性が保持されていたが、-20℃で 24 時間冷凍すると 98%以上の胞子が極糸を弾出してしまっていた。この結果は冷凍処理により胞子が失活することを示唆し、極糸弾出が毒性に関与している可能性が強く示された。

A. 研究目的

魚介類の原因不明食中毒の原因体として、ヒラメの筋肉に寄生する粘液胞子虫 *Kudoaseptempunctata* の関与が示唆されている。ヒラメに寄生する粘液胞子虫は、他にジェリーミートの原因種 *K. thyrssites* が報告されていたが、今回の研究中、*K. lateolabracis* も寄生することがわかった。*K. lateolabracis* は、タイリクスズキにジェリーミートを起こすとして報告された種類である。後者 2 種は食中毒の原因にはならないことから、これらと *K. septe mpunctata* を区別して診断する必要がある。上記 3 種は胞子の形態により、主に極糸の数の違いにより区別できるものの (*K. septe mpunctata* は 6~7 個、*K. thyrssites* と *K. lateolabracis* は 4 個)、

胞子を形成する前の段階では診断不可能である。

そこで本研究では、3 種を識別して検出できる PCR 法を開発を目的とした。今まで粘液胞子虫類の種分類は主に 18S rDNA に基づいているが、*Kudoa* 属では 18S の領域の保存性が高いため、28S rDNA の解析も必要であるといわれている。そこでヒラメに寄生する 3 種類の *Kudoa* spp.について 28S rDNA を新たにシーケンスし、それを基に PCR プライマーを設計することにした。同時に、寄生の簡易診断法および胞子の極糸弾出率を測定することによる活性の評価法についても検討した。

B. 研究方法

1. PCR 法の開発

ヒラメの筋肉組織から寄生虫を採集し、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した後、Kudoa 属粘液胞子虫の18Sおよび28S rDNA用に用いられる既報のプライマーにより各領域を増幅し、シーケンスした。得られた18Sと28S rDNAのデータを用いて、Bayes法により系統解析を行った。

PCR診断法を開発するため、得られた28S rDNAの塩基配列に基づいて、それぞれの種に特異的なプライマーを設計した (K. septempunctata: KSF1 & KSR2, 357 bp; K. thyrssites: KTOF1 & KTOR1, 260 bp; K. lateolabracis: KLF1 & KLR1, 401 bp) (表1)。

表1. 3種のKudoaのPCRプライマー

名称	塩基配列
KSF1	5'-gtgtgtgatcagacttgatatg-3'
KSR2	5'-aagccaaaactgctggccattt-3'
KTOF1	5'-gtgtgtgactggatagagttga-3'
KTOR1	5'-ccccaagttaatttggtaaatca-3'
KLF1	5'-actggatagtgagtggtgtcga-3'
KLR1	5'-ccaaatacgaataacttggtgt-3'

PCR反応溶液の組成は、Takara Ex TaqHSを0.1 μ l、10 $\times$ ExTaq Bufferを2.0 μ l、dNTP Mixtureを1.6 μ l、各プライマー (10 pmol/ μ l)を0.4 μ l、テンプレート1.0 μ l、滅菌蒸留水を14.5 μ lの合計20 μ lとした。PCR反応は、initial denaturation 95 $^{\circ}$ C 4分後、denaturation 95 $^{\circ}$ C 30秒、annealing 53 $^{\circ}$ C 30秒、extension 72 $^{\circ}$ C 30秒を35サイクル、Final extension 72 $^{\circ}$ C 5分とし、3種類とも同一条件とした。PCR産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動により目的DNA断片の有無を確認した。

次に種特異性を確認するため、近縁の粘液胞子虫5種(K. yasunagai, K. prunusi, K. iwatai, K. shiomitsui, Myxobolus murakamii)および未感染魚のDNAを用いて、交差反応が起こるかどうか調べた。

検出感度を調べるため、28S rDNAの一部をプラスミドに導入し、段階希釈してPCRすることで、検出できる最低レベルを求めた。検出限界はサケ科魚類の旋回病原因種 Myxobolus cerebralis で報告されている1胞子当たりの28S rDNA量から換算して、胞子数/gという単位でも表した。

2. 養殖ヒラメの検査

2011年2月に養殖ヒラメ10尾(平均体長: 32.6 cm、平均体重: 810 g)を氷蔵で大学に郵送し、有眼側と無眼側から各3か所(中央部、背側、腹側)の肉片を採取して胞子密度(個/g)を測定した。胞子密度は、0.5 gの肉片をスチールメッシュ (Sigma, S-0770)と100 μ mのセル・ストレイナーでメッシュろ過し、遠心分離 (1500 rpm, 15分)して濃縮してから血球算定盤で胞子数を計数することで求めた。次に、有眼側中央部の肉片を用いて、今回開発されたPCR法により3種の粘液胞子虫の寄生を調べた。

簡易診断法としては、筋肉片を薄くスライスしてガラスシャーレの間で圧平し、キャンディング法により実体顕微鏡下で偽シストの有無を観察する方法、およびK. thyrssitesですでに報告されているように、鰓蓋裏の筋肉を綿棒で採取してウェットマウントにより光学顕微鏡で胞子の有無を観察する方法を試みた。

3. 胞子の極糸弾出率の測定による活性評価

K. septempunctata の胞子を重篤感染ヒラメの筋肉組織から上述のメッシュろ過により回収した後、30%と15%の等張パーコール液に重層して遠心分離（3500 rpm, 30 分）することにより精製、濃縮した。胞子懸濁液を 5℃と -20℃で保存し、24 時間後に室温に戻して、10%KOH 処理することで極糸弾出率の測定をした（n=100）。

C. 研究結果

1. PCR 法の開発

K. septempunctata、*K. thyrstites*、および *K. lateolabracis* の 18S rDNA の塩基配列は、GenBank に登録されているデータと 100%一致した。さらに 28S rDNA のシーケンス（それぞれ 3346 bp, 3349 bp, 3460 bp）が得られ、18S rDNA と 28S rDNA のデータを用いて分子系統解析を行った結果、*K. septempunctata* は極囊の数が 5 個以上の *K. yasunagai* や *K. prunusi* などの *Kudoa* spp. とクラスターを組んだ。

ヒラメの筋肉に寄生する *Kudoa* 3 種のプライマーを用いた PCR において、対象の種類以外の 7 種の粘液胞子虫および宿主の DNA に対する交差反応は見られず、種特異性の高さが示された。検出感度の試験において、検出できる最低限界は *K. septempunctata* では 100 プラスミド/tube（240 胞子/g）、*K. thyrstites* では 1 プラスミド/tube（4 胞子/g）、*K. lateolabracis* では 100 プラスミド/tube（400 胞子/g）であった。

2. 養殖ヒラメの検査

10 尾のうち 5 尾で $2.0 \times 10^4 \sim 8.5 \times 10^6$ 胞子/g の寄生が確認された。体側筋肉 6 ヶ所の部位別には大きなばらつきがあったものの、

個体差の方が大きく、全体的に片寄りはいらなかった。PCR 検査の結果、*K. septempunctata* の検出率は 100%であった一方、他の 2 種は 0%だった。

筋肉スライスのキャンドリング法では、実体顕微鏡下で偽シストが筋状に見られたが、明瞭に確認できたのは重篤感染魚の 1 尾のみであり、軽度感染の魚では信頼性が落ちた。

鰓蓋裏の筋肉中の胞子を顕微鏡検査する方法では、10 尾中 5 尾が陽性であり、体側筋肉から胞子を精製して密度を測定する方法で陽性と判定された個体と完全に一致した。

3. 胞子の極糸弾出率の測定による活性評価

5℃で 24 時間保存した胞子の極糸弾出率は、KOH 処理前で 0%、処理後で 100%であった一方、-20℃で 24 時間保存した胞子では、KOH 処理前ですでに 97%の胞子が極糸を弾出していた(表 2)。

表 2. *K. septempunctata* 胞子の極糸弾出率（n=100）

保存条件	KOH 処理前	KOH 処理後
5℃・24 時間	0%	100%
-20℃・24 時間	97%	100%

D. 考察

本研究において開発された PCR 法により、ヒラメの筋肉に寄生するクドア属粘液胞子虫 3 種を識別して種特異的に検出することができた。現在、各衛生研究所等においては、定量 PCR が一般的に使われているが、今後、全国の水産試験場等の検査機関でもクドアの診断を実施するようになることを考えると、定量 PCR よりも通常の PCR の方が現実的である。また、現在用いられている定量 PCR 法は 18S rDNA に基づいて設計されているため特

異性に問題があり、別の種類の *Kudoa* も検出しまう、つまり偽陽性として判定してしまう危険性がある。食中毒を起こした事例検体では幅広くカバーするという考え方でよいかもしれないが、養殖期間中にランダムにサンプリングする実態調査や、出荷前に未感染であることを証明する場合は、偽陽性はあってはならない。また、今後、ヒラメ養殖場では、種苗を導入する際に *K. septempunctata* に未感染であることを確認してから購入するという判断が迫られる。以上より、今回開発された PCR 法は水産の養殖現場における一連の工程の中で有効に使用できると考えられる。

今回、調査した 10 尾の養殖ヒラメのうち、5 尾は顕微鏡的に孢子が確認されたが、PCR 法では 10 尾すべてで陽性と判定された。これは、PCR 法が顕微鏡検査より明らかに検出感度が高いことを示している。理論上、孢子密度の計数法では検出限界が 2.0×10^4 孢子/g であるのに対し、*K. septempunctata* の PCR 法では 2.4×10^2 孢子/g であることから、およそ 100 倍の差があると見積られる。

この検出感度の高さは、技術としては優れたものであると評価できるが、実際の診断業務で PCR 陽性と判定された場合、どう判断するかは慎重な検討を要する。とくに PCR 陽性で顕微鏡検査陰性の検体では、非常に軽度の感染であると考えられるため、食中毒にならない可能性が高い。そうしたケースでは、定量 PCR または孢子密度を測ることにより定量的に寄生強度を測定して「暫定基準値」を超えるかどうかで判断する必要があるかもしれない。しかし、基準値を設定するためには今後多くの事例を収集し、摂取量と発症の有無との関係や、年齢等による感受性の違いなども考慮しなければならない。

実際にヒラメを検査する際、どの部位の筋肉をどのように調べればよいかについては、材料や目的によるといえる。今回の調査で、体側筋肉中 6 ヶ所の間で孢子密度に大きな片寄りはなかったことから、もともと肉厚でサンプリングしやすい背側中央部 1 ヶ所でもよいであろう。しかし、軽度感染が予想されるサンプルの場合は寄生部位を外してしまう可能性もあるため、数か所取ったほうがよいかもしれない。また、寄生しているかいないかを判断するだけでよければ、鰓蓋裏の筋肉を調べる簡易法でも十分である。この方法は、ヒラメの商品価値を損なわないという点においても実用性がある。出荷時には多数の検体を一時に検査する必要があるため、手間のかかる方法は現実的でない。そこで、まず鰓蓋の検査をしてスクリーニングした後、陽性個体についてのみ、背側中央部筋肉を採取して、定量 PCR するか孢子密度を測ることにより定量的なデータを取る方法が推奨される。なお、今回試みた筋肉スライスを実体顕微鏡で検査する方法では、重度寄生の魚しか寄生を判別できなかったのも、あまり実用性はない。従来から言われているように、肉眼的には認識できないことから、調理段階や摂食時点で感染魚を見分けることは困難であることが再確認された。

孢子の極糸弾出率を測定する方法は、いままで孢子の活性評価法として用いられてきたが、今回の結果は冷凍処理により孢子が失活することを示唆する。これは動物実験を用いた毒性試験の結果とも合致するため、極糸弾出が人間に対する毒性に関与する可能性が示された。

E. 結論

本研究で開発された PCR 法により、ヒラメの筋肉に寄生するクドア属粘液胞子虫 3 種 (*K. septempunctata*, *K. thyr-sites*, *K. lateolabracis*) を識別して、かつ高感度で検出することが可能であった。

養殖場における検査法として、ヒラメの種苗導入時にこの PCR 法を用いて未感染のロットを導入すること、その後の養殖期間中には定期的にサンプリングして PCR 法と体側筋肉中の胞子密度を顕微鏡的に検査することでモニタリングすること、そして出荷時には鰓蓋裏の筋肉を検査する簡易診断法によりスクリーニングした後、胞子密度の測定と PCR 法により確定診断することが推奨される。

胞子の極糸弾出が毒性に関与していることが示唆されたが、メカニズムの解明は今後さらに研究が必要である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

Grabner D. & Yokoyama H. Development of a diagnostic PCR for three *Kudoa* species (Myxozoa: Multivalvulida) infecting olive flounder *Paralichthys olivaceus*. 平成 23 年度日本魚病学会春季大会、平成 23 年 3 月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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因子の検出法開発 分担研究報告書

研究分担者 黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者 関塚剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

要旨

平成 15 年から生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒（有症苦情を含む）が全国的に増加しており、このうち提供メニューに生食用生鮮魚介類が含まれていた事例のうち、養殖ヒラメが原因食材顕著に見受けられた。従来の検査法では全て陰性になり、ウイルス・細菌性食中毒等の結論が出ないままになっていた。そこで、偏見なく病原体の存在を明らかにするために、次世代シーケンサー(illumine GAIIX)による網羅配列解読を行った。ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*) のゲノム配列が公開されていないため、本研究では、コントロールサンプルとの比較解析により病原体を探索した。嘔吐ヒラメ・解読リードの 80%はヒラメ配列と推定され、細菌・ウイルス配列よりも真核生物 (Eukaryote) に分類される配列が 3.3%もあり際立っていた。詳細に分類すると、ミクソゾア門に分類される粘液胞子虫 (Kudoidae) の配列が全体の 2.56%に相当し、大量の粘液胞子虫の存在を示唆するデータを得た。鏡検像からも、6 つの極嚢を有する粘液胞子虫が検出された。粘液胞子虫 *Kuoda* spp. の 18S-rRNA の PCR 増幅と配列確定により、新規 *Kuoda* sp. であることが判明した(後に、*Kuoda septempunctata* として登録される)。定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)により、嘔吐サンプル 5 検体から *Kuoda* spp. が潤沢に検出されたものの、コントロール食材からは検出されなかった。粘液胞子虫は魚類における病気（筋融解症、ジェリーミート）に関与し、ヒトへの病原性については否定的である。しかしながら、嘔吐食材に共通して検出され、その内在量から見ても何かしらの関連性を検討すべきだと考えている。網羅解読法は単純な核酸配列解読であるが、その大量な解読数をもって深く深く解析し、見落とししている実像をありのままに表現することができる。本食中毒に限らず、他不明症例全般に有用な検査法であり、今後、ヒラメに限らず他魚介類による不明食中毒症例も散見されることから、粘液胞子虫を含む総合的な原因究明を行うべきであろう。

A. 研究目的

不明食中毒症例の疫学解析から原因食材と推測

される養殖ヒラメから候補病原体を網羅配列解読法にて検討する。

B. 研究方法

養殖ヒラメ(0904)の冷凍切り身から DNA および RNA を Ambion Total Nucleic acid purification kit にて精製した。RNA は Invitrogen SuperScript choice system にて 2 本鎖 cDNA にした。DNA と 2 本鎖 cDNA を混合し、イルミナ解読用の DNA ライブラリー (平均 100 bp インサート長) を作製し、illumina GAIIX で解読した (図 1)。コントロール・ヒラメ (築地市場) と嘔吐ヒラメから得られた網羅解読リードを比較解析し、嘔吐ヒラメにのみ見られる特徴的な配列を抽出した (図 2A)。嘔吐ヒラメに特徴的な配列を MEGABLAST 法 (核酸 vs 核酸データベース nt) にて相同性検索を行い、得られた結果を MEGAN により taxonomy 分類した (図 2B)。

粘液胞子虫 *Kudoa* spp. の 18S-rRNA の PCR 増幅は、既報論文のプライマー配列を用いた (Dis Aquat Org 64:135-139, 2005) (図 3)。粘液胞子虫 *Kudoa* spp. の 18S-rRNA 全般を PCR 増幅するための共通プライマーをアライメント解析にて選別した (図 4)。精製 RNA を鋳型にした定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) は、Invitrogen SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit with ROX を用いて行った (図 5)。

C. 研究結果

網羅配列解読の場合、食材そのもののヒラメ DNA/RNA も含んだ状態で解読することになり、混在するコントロール配列の中から候補病原体の混入を検討することになる。ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) のゲノム配列が公開されていないため、本研究では、コントロールサンプルとの比較解析により病原体を探索した。嘔吐ヒラメ・解読リードの 80% はヒラメ配列と推定されたが、細菌・ウ

イルス配列よりも真核生物 (Eukaryote) に分類される配列が 3.3% もあり際立っていた。それらを詳細に分類すると、ミクソゾア門に分類される粘液胞子虫 (*Kudoidae*) の配列が全体の 2.56% に相当し、大量の粘液胞子虫の存在を示唆するデータを得た (図 2)。実際、図 1 の鏡検像からも、6 つの極嚢を有する粘液胞子虫が検出された。

粘液胞子虫 *Kudoa* spp. の 18S-rRNA の PCR 増幅では、SSU1-SSU3 の組み合わせは、コントロール・ヒラメ (HIRAME-control) には特異増幅が見られず、嘔吐ヒラメ (HIRAME-0904) に想定された 1.1 kb の特異増幅を認めた。ゲルから特徴的なバンドを回収後、キャピラリー法により配列確定し、新規 *Kudoa* sp. の 18S-rRNA であることが判明した (後に、*Kudoa septempunctata* として登録される)。U1-U2 の組み合わせでは、コントロール・ヒラメ (HIRAME-control) の 1.7 kb はヒラメ 18S-rRNA 配列であり、嘔吐ヒラメ (HIRAME-0904) の 1.7 kb は新規 *Kudoa* sp. の 18S-rRNA であることが判明した。

精製 RNA を鋳型にした定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) を行った。*Kudoa* spp. 18S-rRNA の各領域を増幅するプライマーペア *Kudoa*-1~7 の内、*Kudoa*-5 のペアが非特異的増幅もなく良好な検出感度を得られると推測された (図 5)。他、嘔吐サンプル 5 検体から *Kudoa* spp. が潤沢に検出されたものの、コントロール食材からは検出されなかった (図 6)。

D. 考察

不明食中毒症例として養殖ヒラメが一つの原因食材と推定され、ウイルス・細菌性の食中毒とは明らかに異なる発症様式を示したことから、従来の検査法では特定に至らなかったと思われる。このような不明症例については、偏見無く検査できるシステムが適切であり、原因に近づくための基

盤情報を提供してくれる。本研究においても嘔吐食材から粘液胞子虫の存在を明らかにした。

粘液胞子虫は魚類における病気（筋融解症、ジェリーミート）に関与し、ヒトへの病原性については否定的である。しかしながら、嘔吐食材に共通して検出され、その内在量から見ても何かしらの関連性を検討すべきだと考えている。

網羅解読法は単純な核酸配列解読であるが、その大量な解読数をもって深く深く解析し、見落としている実像をありのままに表現することができる。本食中毒に限らず、他不明症例全般に有用な検査法であり、不明のまま見過ごされている症例についても積極的に解明することが重要であり、それが可能になったと言える。

これまで、従来法による検査で全て陰性となっており、地方衛生研究所・保健所でのご苦労・負担（時間・人力の浪費）が大きかったことと推察している。本研究で粘液胞子虫 *Kudoa* の存在を明らかにしたことから、一つの検査項目を提案し、少しは貢献できたと考えている。

粘液胞子虫 *Kudoa* は環形動物等への共生関係を示す生活環を有し、その依存関係から遺伝子退行

（gene decay）によりゲノム情報量が極端に減少していることが推察されている。粘液胞子虫の中でも *Kudoa septempunctata* に特異的なヒト病原性因子を保有している可能性もあり、現在、*Kudoa septempunctata* 全ゲノム解読を遂行中である（全ゲノム配列が 10 Mb 程度と推測された）。

今後、ヒラメに限らず他魚類による不明食中毒症例も散見されることから、粘液胞子虫を含む総合的な原因究明を行うべきであろう。

E. 結論

次世代シーケンサーによる偏見の無い網羅配列解読法を用いて、不明食中毒の原因食材と推測された養殖ヒラメから粘液胞子虫 *Kudoa* sp. を同定し、qRT-PCR にて嘔吐ヒラメ食材に顕著に検出されることを明らかにした。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

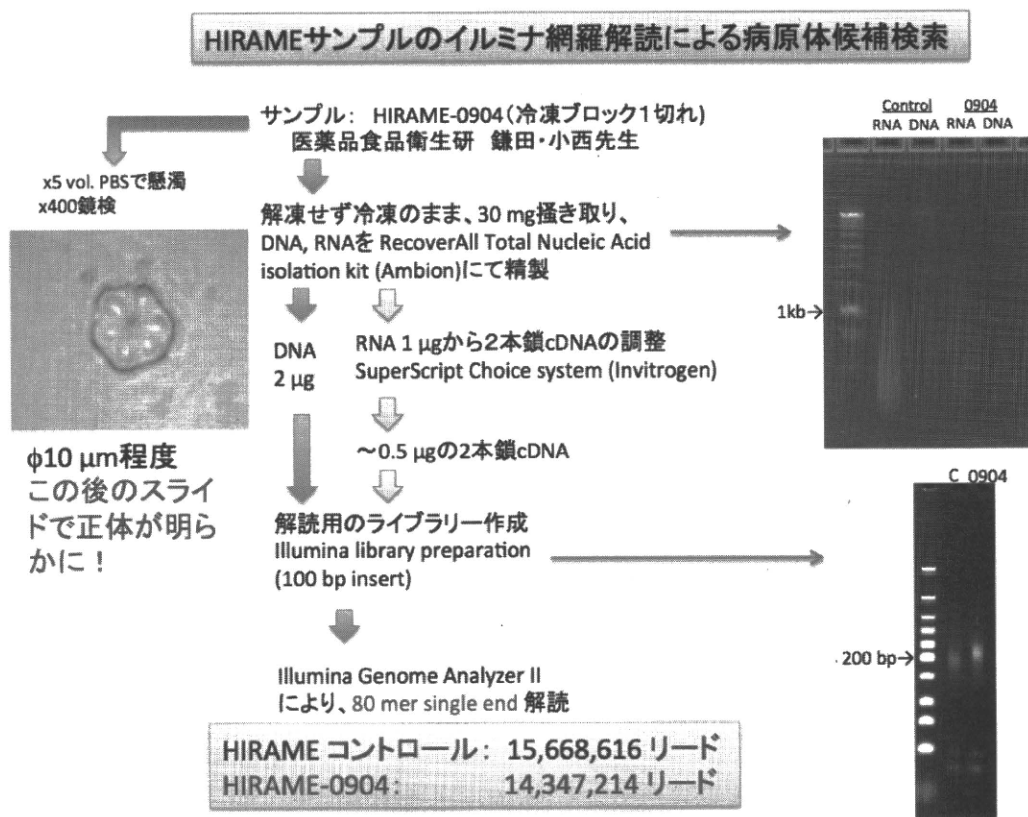


図1 養殖ヒラメ(0904)凍結切り身サンプルからのイルミナ網羅解読法による候補病原体の検索。

医薬品食品衛生研究所・小西先生から供試いただいた冷凍ブロックから DNA および RNA を精製し、RNA については二本鎖 cDNA にしてから網羅解読ライブラリーを作成した。

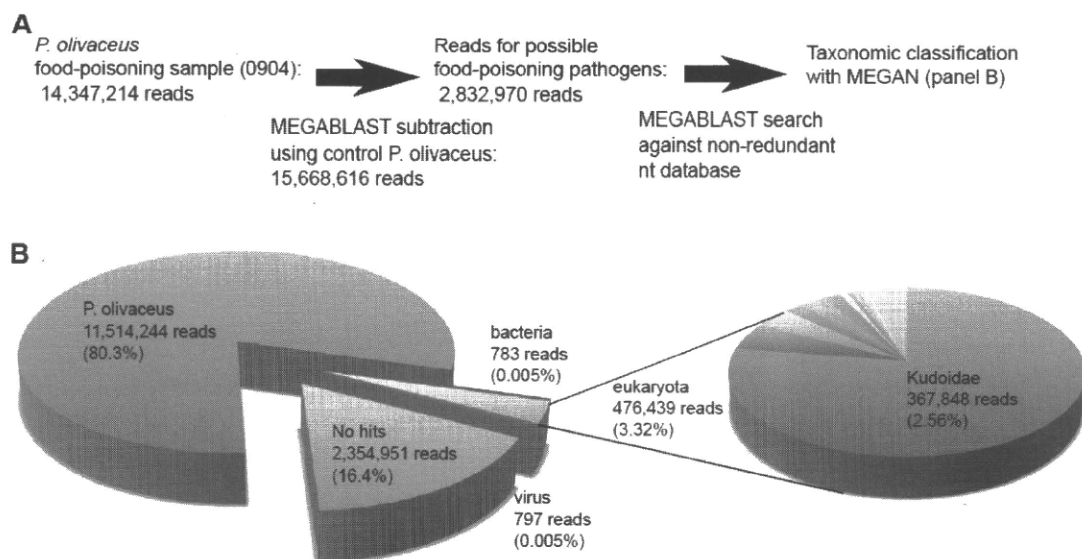


図2 A) コントロール・ヒラメ（築地市場）と嘔吐ヒラメから得られた網羅解読リードを比較解析し、嘔吐ヒラメにのみ見られる特徴的な配列を抽出した。嘔吐ヒラメに特徴的な配列を MEGABLAST 法（核酸 vs 核酸データベース nt）にて相同性検索を行い、得られた結果を MEGAN により taxonomy 分類した。

B) 嘔吐ヒラメ・リードの 80%はヒラメ配列と推定されたが、細菌・ウイルス配列よりも真核生物（Eukaryote）に分類される配列が 3.3%もあり際立っていた。それらを詳細に分類すると、ミクソゾア門に分類される粘液胞子虫（Kudoidae）の配列が全体の 2.56%に相当し、大量の粘液胞子虫の存在を示唆するデータを得た。実際、図1の鏡検像からも、6つの極嚢を有する粘液胞子虫が検出された。