

201131044A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大西 貴弘

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

平成24(2012)年 3月

目次

総括研究報告書

- 生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明…………… 3
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

分担研究報告書

- Kudoa* 属由来の毒性物質の作用機序に関する研究…………… 23
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- ザルコシスティスおよびクドアセプテンpunkタタの予防対策に関する研究…………… 47
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- 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
定量リアルタイム PCR(QPCR)法によるヒラメからの *K. septempunctata*
検出法の開発研究…………… 63
久米田裕子 (大阪府公衆衛生研究所 感染症部)

- 生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属のの遺伝学的解析…………… 85
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)

- ヒラメの喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討…………… 93
八幡裕一郎 (国立感染症研究所 感染情報センター)

- Kudoa* 属粘液孢子虫の種同定に関する研究…………… 109
佐藤 宏 (山口大学 農学部)

- 獣肉中の食中毒危害物質の解析…………… 159
鎌田 洋一 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- 馬肉生食による食中毒の病因物質とされるザルコシスティス
Sarcocystis fayeri のゲノム解析 …………… 173
野崎 智義 (国立感染症研究所 寄生動物部)

- 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 181

総括研究報告書

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

大西 貴弘

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

総括研究報告書

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

近年、全国で一過性の下痢や嘔吐をおもな症状とする有症事例で、既知の病因物質が検出されず原因不明として処理された事例が増加している。

その後研究を行い、我々はヒラメを原因食材とする有症事例の原因微生物が新種の粘液胞子虫 *K. septempunctata* であり、馬肉の生食による有症事例は *Sarcocystis fayeri* によって引き起こされることを明らかにした。本研究ではこれらの食中毒の予防法確立を最終目的として、発症機構を解明するために研究を行った。本年度の研究成果は以下のとおりである。

(1) *K. septempunctata* による食中毒

- ・ 腸管で *K. septempunctata* の孢子からアメーバ状の孢子原形質が放出され、この孢子原形質が腸管細胞に侵入することによって下痢が発症することを明らかにした。
- ・ 乳のみマウスを用いた毒性試験では、*K. septempunctata* は pH の変化に抵抗性があることを明らかにした。しかし、加熱処理を行うことによって失活した。サルは *K. septempunctata* に対して感受性がないことを明らかにした。
- ・ 疫学調査の結果、潜伏期の中央値は 5 時間で範囲は 1.8-15.0 時間であり、喫食量が多いと潜伏期が短くなることを明らかにした。
- ・ *K. septempunctata* 感染率の高い養殖場で孢子の保有率を 8 か月間調査したところ、検出頻度は 20-80% とばらつくことが明らかになった。また、水温上昇と *K. septempunctata* の毒性との間には相関性は見られなかった。
- ・ 市販魚における粘液胞子虫の感染状況を調べたところ、サバ、イシダイ、イシガキダイから新種の粘液胞子虫が分離された。
- ・ 食中毒事例の原因食とされるマグロから分離した *Kudoa* 種と既知で宿主に筋肉融解を引き起こす *Kudoa neothunni* との異同について検討したところ、食中毒事例の *Kudoa* 種は *Kudoa neothunni* である可能性が非常に高いことが示唆された。
- ・ これまでの検査に用いられてきた PCR 法は *K. septempunctata* 以外の *Kudoa* 属も検出するため、*K. septempunctata* 特異的 PCR 法を確立した。また、食品衛生管理に必要な迅速検査法確立のために、抗 *K. septempunctata* を作成した。

- ・ *K. septempunctata* にはミトコンドリアゲノムと核ゲノムがあり、今年度はミトコンドリアゲノムの解析を行った。その結果、ミトコンドリアゲノムには5つのタンパク遺伝子しかないことを明らかにした。また、ミトコンドリアゲノムによる系統解析を行ったところ、左右相称動物に分類されるべき系統関係であることが明らかになった。

(2) *Sarcocystis fayeri* による食中毒

- ・ 下痢症状を誘発する 15 KDa の *S. fayeri* の構成タンパクのクローニングを行い、アミノ酸 118 残基をコードする 354bp の遺伝子のクローニングに成功した。この遺伝子はトキソプラズマのアクチン重合因子に相同性が見られた。また、この遺伝子から組み換えタンパクを作成したところ、このタンパクが腸管毒性を示すことが明らかになった。
- ・ *S. fayeri* の全ゲノム解析を行っている。現在のところ GC 含量が約 50%、ゲノムサイズは 50~70 Mb と推定されている。

研究分担者

小西 良子 国立医薬品食品衛生研究所
 鎌田 洋一 国立医薬品食品衛生研究所
 野崎 智義 国立感染症研究所
 黒田 誠 国立感染症研究所
 八幡裕一郎 国立感染症研究所
 佐藤 宏 山口大学
 久米田裕子 大阪府立公衆衛生研究所

原田 哲也 大阪府公衆衛生研究所
 斉藤 守弘 埼玉県食肉衛生検査センタ
 ー
 田中 成幸 埼玉県食肉衛生検査センタ
 ー
 新井 洋子 埼玉県食肉衛生検査センタ
 ー
 峰岸 恭孝 (株) ニッポンジーン

研究協力者

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所
 入倉 大祐 国立医薬品食品衛生研究所
 古沢 博子 国立医薬品食品衛生研究所
 八木田健司 国立感染症研究所
 竹内史比古 国立感染症研究所
 関塚 剛史 国立感染症研究所

 乙竹 充 (独) 水産総合研究センター
 福田 穰 大分県農林水産研究指導セ
 ンター
 河合 高生 大阪府公衆衛生研究所

A. 研究目的

平成 15 年から生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒が増加している。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2時間から20時間と非常に短い。我々はヒラメの生食による食中毒の原因微生物を *Kudoa septempunctata*、馬肉の生食による食中毒の原因微生物が *Sarcocystis fayeri* であることをこれまでに報告した。*K. septempunctata* は新種の粘液胞子中でヒラメの筋肉に寄生して

いる。この *K. septempunctata* 胞子を経口的に投与すると乳のみマウスに下痢を引き起こし、また、unksに嘔吐を引き起こすなど、ヒトの臨床症状同様の症状を実験動物に対して示すことも報告している。また、ヒトの培養腸管上皮細胞である Caco-2 細胞に接種すると、透過性が急速に上昇することを明らかにした。

一方、*S. fayeri* に関してはシストを含む馬肉のホモジネートに腸管病原性があることがこれまでに明らかになっている。また、シストおよびシストの中に含まれるブラディゾイトをウサギに投与しても、同様に腸管毒性を示すことが知られている。さらに、シストおよびブラディゾイトを構成する分子量 15 kDa のタンパクがその腸管毒性を担っていることを我々はこれまでに明らかにした。

しかし、これらの寄生虫がどのような機序によってその毒性を示すのかはほとんどわかっていない。そこで、本研究は *K. septempunctata* と *S. fayeri* の発症機構を明らかにするために、以下の点について研究を行う。

- ① *K. septempunctata* および *S. fayeri* の病原因子の同定。
- ② *K. septempunctata* および *S. fayeri* の全ゲノム解析を行い、遺伝学的な方向から発症機構の解析を行う。
- ③ 疫学的研究を行い、本食中毒の予防因子、リスク因子の推定を行う。
- ④ 検査を容易にするために免疫学的な迅速

検査法を構築する。また、検査精度の向上のため、既存の遺伝学的検査法の改良を行う。

特に今年度は、

- ① *K. septempunctata* による下痢発症機構の解明
- ② *K. septempunctata* の疫学的検討
- ③ *K. septempunctata* 特異的定量 PCR 法の確立
- ④ *K. septempunctata* のミトコンドリアゲノムの解析
- ⑤ 免疫学的迅速診断法確立のための抗体作製
- ⑥ 市販の魚における *K. septempunctata* の感染状況の調査
- ⑦ *S. fayeri* の 15 kDa タンパクのクローニングと組み換えタンパクの作成
- ⑧ *S. fayeri* の基礎的なゲノム解析を行った。

B. 研究方法

1. *K. septempunctata* による食中毒

1) *K. septempunctata* による下痢発症機構の解明

(a) *kudoa* 胞子の精製

K. septempunctata 感染ヒラメは大分県農林水産研究指導センターの福田 穰先生および独立行政法人 水産総合研究センター・増養殖研究所の乙竹 充先生、佐古 浩先生よりご供与いただいた。*K.*

sempunctata の孢子の精製はメッシュでヒラメ筋肉と孢子を分離して、*K. sempunctata* 孢子ホモジネート液を作成し、最終的に 30%パーコールで精製した。

(b) 電子顕微鏡観察

ヒト腸管由来の Caco-2 細胞を (8×10^5 細胞/ディッシュ) をコラーゲンコートした 6 cm 細胞培養用ディッシュに接種し、分化させた後、精製した *K. sempunctata* の孢子 (6×10^6 孢子/ディッシュ) を接種し、 37°C 、1 時間培養した。細胞は透過型電子顕微鏡 (JEM-1200E ; 日本電子株式会社) および走査型電子顕微鏡 (S-800 ; 株式会社日立ハイテクフィールドイニング) で観察した。

(c) 孢子原形質放出試験

K. sempunctata 孢子を PBS、 H_2O もしくは H_2O (pH 2) に 10^7 孢子/ml になるように浮遊させた。サンプルによってはこの浮遊液にプロテアーゼインヒビターカクテル (ナカライテスク株式会社) を加えた。さらに、牛胎児血清、トリプシンもしくはペプシンのいずれかを加え、室温で 1 時間培養した。明視野顕微鏡で 10 視野をランダムに観察し、30%以上の孢子が孢子原形質を放出している場合、陽性と判定した。

(d) 共焦点顕微鏡観察

コラーゲンコートしたカバーガラス上に Caco-2 細胞 (4×10^5 細胞) を接種し分化させたのち、*K. sempunctata* 孢子 (3×10^6 孢子) を接種した。サンプルによっては、この時にサイトカラシン D を培地に加

えた。 37°C 、1 時間培養後、固定し、ニワトリ抗 *K. sempunctata* 血清と 4°C 、18 時間反応させた。その後、Alexa488 ヒツジ抗ニワトリ IgG (ライフテクノロジーズ株式会社)、ローダミンファロイジン (ライフテクノロジーズ株式会社) と 4°C 、1 時間、反応させた。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000-D ; オリンパス株式会社) で観察した。

サイトカラシン D の効果を調べるために、Biocoat Cell Culture Inserts (BD Biosciences) 上で分化させた Caco-2 細胞にサイトカラシン存在下で *K. sempunctata* 孢子を接種し、TER の測定を行った。

(e) 乳のみマウス試験

4~5 日齢の ddY マウスに *K. sempunctata* 孢子抽出液を 0.1 ml 経胃投与し、1.5 時間後にと殺して腸の液体貯留 (FA) 値を測定した。また、*K. sempunctata* 孢子が下痢原性を担っているかどうかを調べるために、精製孢子液を使って pH 処理、加熱処理、凍結処理および超音波破碎処理を行った後に、乳のみマウス試験を行った。pH 処理では、pH4、pH7、pH9 にそれぞれ調整した PBS に精製孢子を懸濁して 4°C で 1 時間保存後、PBS (pH7.2) に再懸濁した。加熱処理は 75°C で 5、10、20 分間および 95°C で 5 分間行った。凍結処理は、 -80°C で 1、2 時間および -30°C で 1 日間保存することにより行った。

(f) サルを用いた喫食実験

4×10^8 /head 孢子含有ヒラメ筋肉濾過液

(100 μ m mesh) を 10mL PBS 溶液として調整後、カニクイザル(体重 3.45 - 5.75 kg、♂) に食餌 30 分後それぞれ胃カテーテルにて投与して 24 時間観察した。その間に採取した糞の *Kudoa* 胞子をリアルタイム PCR で測定した。

(g) 毒性と飼育温度との相関性

kudoa 感染ヒラメを飼育している大分県 T 業者から、ほぼ毎週提供されたヒラメを用いて、その頻度と胞子数を測定した。胞子数の測定は、厚労省の通知法にしたがって行った。

2) *K. septempunctata* の疫学的検討

発生状況の把握として原因不明食中毒として自治体から厚生労働省へ報告された食中毒速報の情報を収集し、発生の分布を検討した。臨床像の検討はヒラメを喫食しクドアの寄生が確認された事例について標準的な調査票を作成し、自治体で調査した情報をもとに行った。喫食量と発症の両反応関係の検討は Spearman の相関係数を算出した。クドアが寄生したヒラメの喫食と発症との関連はオッズ比を算出し、ロット別による調整オッズ比と Mantel-Haenszel カイ二乗検定を行った。

3) *K. septempunctata* 特異的定量 PCR 法の確立

K. septempunctata 18S rRNA 遺伝子配列 (GenBank accession no. AB553293) を GenBank に登録されている他の *Kudoa* 属粘

液胞子虫の 18S rRNA 遺伝子配列と比較し、*K. septempunctata* に特異的な配列を探して QPCR 法の標的配列候補とした。この配列をもとに 100~150 bp の PCR 産物が得られるようにプライマーを設計した。陰性コントロールに対して非特異増幅のないプライマーペアを選択した。さらに、これらのプライマーペア間の塩基配列中に見出した *K. septempunctata* 特異的配列を認識するプローブを作成した。最終的にこれらのプライマー、プローブの定量性、特異性を検討した。

4) *K. septempunctata* のミトコンドリアゲノムの解析

(a) 核酸配列解読

食中毒事例で残されたヒラメ刺身片から *K. septempunctata* を抽出し、DNA と RNA を精製した。次世代シーケンサ Illumina GAIIx を用いて、DNA および、RNA の相補的 DNA を配列解読した。ABYSS プログラムを用いて、ミトコンドリアゲノムの配列をアセンブルした。BWA 及び samtools プログラムを用いて、解読した RNA をミトコンドリアゲノム配列に対してマッピングした。

(b) 遺伝子解析

タンパク遺伝子の候補を網羅的に抽出し、SSEARCH プログラムにより既知遺伝子と配列比較することにより、タンパク遺伝子を決定した。リボソーム RNA 遺伝子については、解読した RNA のマッピングと配列比較により決定した。転移 RNA 遺伝子は、

tRNAscan-SE, DOGMA, Rfam, BLAST プログラムで検索した。

(c) 系統解析

ミトコンドリアゲノム上の遺伝子のそれぞれについて、他の後生動物の配列を DDBJ/EMBL/NCBI から取得し、MAFFT プログラムにより多重アライメントを行った。系統解析には PhyloBayes プログラムを用いた。

5) 免疫学的迅速診断法確立のための抗体作製

(a) 抗 *K. septempunctata* 抗体の作成

抗 *K. septempunctata* 抗体は *K. septempunctata* 孢子ソニケート全物質を抗原としてニワトリを用いて作成した。作成した IgY 抗体は *Kudoa septempunctata* のニワトリ抗血清を Hitrap IgY カラムで精製し、IgY 精製画分を取得した。

(b) 抗 *S. fayeri* 抗体の作成

S. fayeri のソニケート全物質を抗原にウサギを用いて作成した。得られたウサギ抗血清を Hitrap Protein G カラムで精製し、IgG 精製画分を取得した。この精製画分を SDS-PAGE で確認したところ IgG のバンドを確認した。

(c) 抗 *K. septempunctata* 抗体および抗 *S. fayeri* 抗体のイムノクロマト法

金コロイド、イムノクロマト部材、添加試薬類はニッポンジーン社製品を使用した。精製した抗ニワトリクドアセプテンpunkタタ IgY ポリクローナル抗体および抗ウサ

ギザルコシステイスフェアリー IgG 抗体を用いて、メンブレンへの固相化と金コロイドへの標識を行った。さらに必須となるイムノクロマト用の各部材を組み合わせて、テストストリップを作製した。

6) 市販の魚における *K. septempunctata* の感染状況の調査

小売り業が扱う市販魚について、*Kudoa* 属を中心とした粘液胞子虫の感染状況について検査し、種同定を試みた。店頭に並ぶ市販魚であるため、シスト形成種が対象となった。10 検体ならびにイシガキダイ (*Oplegnathus punctatus*) からシストを検出し、その形状確認と粘液胞子の種同定を行った。分離された粘液胞子虫について 18S~28S ribosomal RNA gene (rDNA) をシーケンスした。また、食中毒残品から分離されたクロマグロ寄生の *Kudoa* sp. (宿主の筋肉融解を示さず) と水揚げされたキハダマグロに筋肉融解を引き起こした *Kudoa* sp. が同一の形態学的特徴をもつことから、それぞれに寄生する種の異同について 18S~28S rDNA 塩基配列解析を中心に検討した。

7) *S. fayeri* の 15 kDa タンパクのクローニングと組み換えタンパクの作成

(a) *S. fayeri* 15K Da タンパク質遺伝子のクローニング

市販馬肉 ((株) 千興ファーム) よりシストを約 50 収集し、クローニングの出発材料

とした。シストから Total RNA を抽出し、得られた Total RNA と RNA LA-PCR Kit Ver 1.1 (Takara) の Oligo-dT(20) を用いて cDNA を合成した。すでに明らかにしている 2 カ所の内部アミノ酸配列をもとに degenerate プライマーを設計した。テンプレートにス合成した cDNA を用い、Oligo-dT(20) をアンチセンスプライマーとして用い、センスプライマーには degenerate プライマーを用いて、遺伝子増幅を行った。さらに、テンプレートに上記の増幅物を用い、センスプライマーには上記 10 アミノ酸ペプチド部分の degenerate プライマーを用い、アンチセンスプライマーには 20 アミノ酸ペプチド部分の degenerate プライマーを用いて、遺伝子増幅を行った。常法に従って、3' および 5' RACE を実施し、増幅物をクローニングベクター pGEM-Teasy に挿入した。常法に従い、大腸菌 DH5 α を形質転換後、クローニング、プラスミドの増幅、挿入物のシーケンスを実施し、塩基配列を決定した。

(b) 組換え 15K Da タンパク質の作製

15K Da タンパク質の cDNA を、PHAT10 ベクターに挿入した。同ベクターで大腸菌 BL21 を形質転換した。LB 培地を用い、15K Da タンパク質遺伝子の挿入のあるプラスミドを持った大腸菌を 37°C で震盪培養した。IPTG 刺激し、16°C 1 晩震盪培養したのち菌体を回収した。BugBuster Master Mix (Novagen) を用いて菌体を破壊し、タンパク質を抽出した。TALON カラムを用いて、ポ

リヒスチジンエピトープ (HAT) タグ融合組換え 15K Da タンパク質を精製した。タグと組換え 15K Da タンパク質の間のアミノ酸をエンテロキナーゼで切断した。反応物をゲルろ過し、組換えタンパク質部分のみ回収した。ゲルろ過のカラムは Superdex 200 10/300 で、GE ヘルスケアの ÄCTA を用いて組換え 15K Da タンパク質を精製した。

(c) 15K Da タンパク質のウサギ腸管ループ試験

ウサギ (日本在来種、オス、約 1.5 Kg、日本 SLC) をペントバルビタール麻酔下で開腹し、空腸を体外に取り出した。6~10 cm のループとなるように腸管を結紮した。組換え 15K Da タンパク質を 1 ml、ループ内に接種した。陰性コントロールとして生理食塩水を、陽性コントロールとして、別に調製した組み換えウエルシュ菌エンテロトキシンをループ内に注入した。ウサギの腹壁を閉じ、18 時間後、ウサギを麻酔死させ、ループを摘出した。ループ内の液体貯留の有無を確認した。液体の貯留があった場合、液量を測定した。ループの長さを測定し、F/A 値 (液量 ml/ループ長 cm) を求めた。

8) *S. fayeri* のゲノム解析

食中毒事例残品馬肉 (-20°C 冷凍保管) を解凍し、ザルコシストを馬肉中より回収した。得られたシスト量からはゲノム解析用試料の収量は少ないことが予想された。そこで、少ないサンプルソースより広く情報を集めるために DNA、RNA ならびにタンパ

ク質に関して広く分子レベルでの解析を行うこととした。この目的のために Nucleo Spin TriPrep kit (TaKaRa) を用いて核酸ならびにタンパク質を同時にシストより抽出する方法を用いた。DNA 試料は収量が少なかった (0.2 ng / μ l, 50 μ l) ことから GenomiPhi v2 (GE ヘルスケア社) を用いてゲノム DNA 増幅を行った。QIAGEN キットを用いて精製し 64.7ng/ μ l の DNA 試料を 40 μ l 得た。これを Nextera DNA sample prep kit (EpiCentre 社) を用いて次世代シーケンサー用試料として調整した。RNA 試料は 14.9 ng / μ l, 60 μ l の RNA 試料が回収され、ライブラリー作製に十分量を確保できた。これを Script Seq mRNA-Seq kit (EpiCentre 社) を用いて cDNA を合成し、次世代シーケンサー用試料として調整した。タンパク質試料は定法により塩析沈殿ペレットを調整した (使用するまで未溶解)。次世代シーケンサー Illumina GAIIx を用いて短いリードのアセンブルに基づくゲノム解読を行った。

C. 研究結果

1. *K. septicum* による下痢発症機構

K. septicum 胞子をヒト腸管由来の Caco-2 細胞に接種すると、胞子から胞子原形質が放出された。胞子原形質はアメーバ状の細胞で、腸管細胞に侵入することが明らかになった。さらに、この侵入過程で胞子原形質は腸管細胞に重大な障害を引き

起こすことが明らかになった。胞子原形質の侵入をサイトカラシン D によって抑制すると、Caco-2 細胞細胞層の TER の低下が抑制された。この胞子原形質の放出はプロテアーゼ刺激によって引き起こされることが明らかになった。

このような *K. septicum* の毒性を乳のみマウスを用いた動物モデルで確認したところ、*K. septicum* 胞子は、パーコール精製前の *K. septicum* 胞子抽出液と同様に PBS 投与群と比較して有意に FA 値を上昇させた。この FA 値の上昇は、精製胞子の投与数に依存し、 10^5 個以下の投与数では認められなかった。pH4、pH7、pH9 で 1 時間反応させた後の精製胞子も FA 値を上昇させた。75°C5 分以上の加熱処理や-80°C で 1 時間以上あるいは-30°C で 1 日間の凍結処理を行った胞子は、FA 値を上昇させることができなかった。

一方、*K. septicum* 含有ヒラメをサルに摂食させたが、サルは *K. septicum* に対して感受性を示さなかった。

飼育水温度とその下痢原性について検討するために、クドア感染が確認されているロットのヒラメを 80 尾ずつ飼育水温 16 度と 24 度の 2 グループに分け、約 3 ヶ月間飼育をした。毎回ヒラメから筋肉を採取し、顕微鏡法によりクドア胞子数を測定した。その結果、飼育水温によるクドア胞子の感染率の変化は認められなかった。さらに Caco-2 細胞の TER の変化によりその下痢原

性を調べたところ、16°C飼育区においても TER 値が 20 %から 40 %と低い値を示したことから、その毒性が保たれていたことが示唆された。24°C飼育区においては、TER 値がやや高い傾向が見られたが 16°C飼育区との有意差は認められなかった。これらの結果から、水温とクドアの下痢原性の毒化には相関性は認められなかった。

2. *K. septempunctata* の疫学的検討

これまでに報告された症例を検討した結果、報告数は9月にピークがあることが明らかになった。また、発生場所は西日本を中心に発生しており、特に瀬戸内海周辺の自治体からの報告が多かった。喫食量と潜伏期の相関係数は $r=-0.531$ であった。潜伏期の中央値は5時間で範囲は1.8-15.0時間であり、喫食量が多いと潜伏期が短くなることを明らかにした。仕入れ別での相関係数は -0.866 であった。発症の調整オッズ比は 22.7 (95%信頼区間: 2.3-221.3) で、Mantel-Haenszel カイ二乗検定が $P<0.001$ で有意であった。

3. *K. septempunctata* 特異的定量 PCR 法の確立

K. septempunctata に特異的なプライマー、プローブを設計し、感度、定量性、特異性、繰り返し精度および再現性においてすべて良好な QPCR 法を開発できた。検出限界値は、18S rDNA コピー数で約 10 コピー/反応であり、 10^6 個/g 以上の孢子感染が確認された。

また、使用する DNA 抽出キットによって DNA 抽出効率が変わり、結果に影響を与えることが明らかになった。ヒラメ検体では、検体採取部位による定量性への影響は認められなかった。

4. *K. septempunctata* のミトコンドリアゲノムの解析

K. septempunctata は、19425 bp の環状ミトコンドリア DNA を持っていた。タンパク遺伝子としては、cytochrome c oxidase subunits I, II (COX1, COX2), cytochrome b (CYTB), NADH dehydrogenase subunits 1, 5 (ND1, ND5) の 5 つが存在した。大小のリボソーム RNA 遺伝子は高い RNA 転写量から明確に識別できた。転移 RNA 遺伝子は検出できなかった。ミトコンドリアの 5 つのタンパク質のアミノ酸配列について、系統解析を行ったところ、*K. septempunctata* は左右相称動物に属することが示唆された。

5. 免疫学的迅速診断法確立のための抗体作製

抗 *K. septempunctata* 抗体は、マウスでの作成が成功しなかったことから、ニワトリを用いてクドアセプテンプンクタタのソニケートを抗原として IgY ポリクローナル抗体を作成した。得られた IgY 抗体は タイなどに寄生する *kudoa iwatai* やマグロに寄生するクドア ネオチュニーに交差反応がないことが確かめられた。抗 *S. fayeri* 抗体は、ウサギに *S. fayeri* のブラディゾ

イドソニケートを抗原として免役しウサギ IgG ポリクローナル抗体を作成した。それぞれの抗体は抗原となる病因物質が生の状態では認識しにくく、ソニケートすることにより認識度が高くなる可能性が示唆された。

6. 市販の魚における *K. septempunctata* の感染状況の調査

小売り業が扱う市販魚について、*Kudoa* 属を中心とした粘液胞子虫の感染状況について検査し、種同定を試みたところ、サバ、イシダイ、イシガキダイから新種の粘液胞子虫が分離された。また、食中毒原因として分離されたクロマグロ寄生の *Kudoa* sp. (宿主の筋肉融解を示さず) と水揚げされたキハダマグロに筋肉融解を引き起こした *Kudoa* sp.、それぞれの種の異同について 18S~28S rDNA 塩基配列解析を中心に検討したところ、2分離株とも *K. neothunni* であることが可能性が示唆された。

7. *S. fayeri* の 15 kDa タンパクのクローニングと組み換えタンパクの作成

15 kDa タンパクのクローニングを行い、塩基配列を決定した結果、本遺伝子は 358 bp で、118 残基のアミノ酸をコードしていた。15K Da タンパク質の計算上の分子量は 13261 となった。358 bp の塩基配列について、BLAST による相同性検索を行った。その結果、*Eimeria tenella* および *Toxoplasma gondii* のアクチン脱重合因子遺

伝子に相同性を認めた。クローニング下遺伝子は大腸菌で発現させ、組み換えタンパクを精製した。このタンパクの毒性をウサギ腸管ループに投与したところ腸管内に液体貯留を引き起こした。

8. *S. fayeri* のゲノム解析

ライブラリーとしての質を把握するために DNA に関する解読リード数とその割合を調べた。その結果、総リード数は 18,163,062、その中でウマ配列数は 544,489 (2.998%)、*E. coli* 配列数が 35,220 (0.194%)、vector の配列数が 731 (0.004%) となり、*S. fayeri* 配列数は残り 17,582,622 (96.804%) と算出された。解読した総塩基数は 18,163,062 リード x 2 の paired-end を行っているため、合計 36,326,124 リードとなり、リードあたり 81mer の解読量から総塩基数は 2,942,416,044 bp と算出された。現在までの解読データからはゲノム GC 含量は約 50%、ゲノムサイズは 50~70 Mb と推定された。N50 値が 57bp、最長 contig が 7639bp、contig 数は 318,497、総 contig 長が 19,245,883 であり想定ゲノムサイズよりも少ない状況であった。

D. 考察

1. *K. septempunctata* の下痢発症機構

今回の研究から、*K. septempunctata* の胞子が腸管細胞に接種されると、胞子から

胞子原形質が放出されることが明らかになった。胞子原形質は腸管細胞に侵入し傷害を与えるが、この侵入を抑制したところ、Caco-2 細胞の TER の低下が阻害された。また、プロテアーゼの刺激によって胞子原形質が放出されることが明らかになった。これらの結果から、腸管に到達した胞子が腸管プロテアーゼの働きによって胞子原形質を放出し、その放出された胞子原形質の腸管細胞への侵入が、*K. septempunctata* による下痢の原因であることが示唆された。このような *K. septempunctata* の下痢毒性は pH の変化によって影響されず *K. septempunctata* が pH の変化に対して強い耐性を持っていることが示唆された。しかし、凍結処理に対しては速やかに失活した。しかし、凍結処理はヒラメの商品価値を低下させるため、流通段階における本食中毒の予防法としては使用できない。今度、ヒラメの商品価値を低下させない *K. septempunctata* の失活方法を構築する必要があると認められた。

これまでに、*K. septempunctata* による食中毒は夏期に多いことが報告されてきた。そこで、*K. septempunctata* 感染ヒラメの飼育水温を夏期の水温に近い 24℃にして飼育を行ったが、クドアの感染率、毒性に変化は見られなかった。このような *K. septempunctata* による食中毒発生件数の季節的な変化がどのような要因によって引き起こされるのか、さらに研究を進めていく必要があると認められた。

2. *K. septempunctata* の疫学的検討

従来の食中毒調査では、何らかの症状が出た場合を発症時間と定義しており、この方法で算出した潜伏期は中央値が 5.0 時間で範囲が 1.8-15.0 時間であった。このうち、潜伏期が 15.0 時間であった症例の症状は発熱のみであった。このような症例を除くと潜伏期は正規分布が仮定できた。このことから消化器疾患を呈した時刻を発症時刻とすることが妥当であると考えられた。従って、ヒラメにクドアが寄生していた場合の症例定義は消化器症状のみに絞ることが適切であると考えられた。また、喫食量と潜伏期を検討したところ、相関係数が -0.531 で、喫食量が多いと潜伏期間が短くなっていた。クドアによる汚染度については検討出来なかったが、クドアの汚染量が多いと症状を早く呈することが考えられた。仕入れ日別に喫食と発症割合の差を比較したところ、仕入れ日が違う事で喫食者の発症に差があることが考えられた。汚染は個体による差があることが考えられ、クドアに汚染度が高いヒラメの個体を喫食した場合には有意に発症し、汚染度の低いヒラメを喫食した場合は有意な発症はないと考えられた。

3. *K. septempunctata* 特異的定量 PCR 法の確立

現在厚生労働省の通知で使用されている遺伝子検査法は *K. septempunctata* 以外の

Kudoa 属を検出する可能性がある。しかしながら現在、ヒトに対して病原性を示す *Kudoa* 属は *K. septempunctata* だけである。そこで、*K. septempunctata* に特異的な遺伝子検査法を開発する必要がある。今回作成した遺伝子検査法は感度、定量性、特異性、繰り返し精度および再現性においてすべて良好に *K. septempunctata* を検出することができた。また、 10^6 個/g 以上の胞子が感染したヒラメ検体では、検体採取部位による定量性への影響はほとんど認められなかった。これまでの例では、食中毒の原因と考えられるヒラメ検体の多くは 10^6 個/g 以上の *K. septempunctata* 胞子感染が確認されている。そのため、食中毒事例で定量的 PCR 法を実施する場合は、残品の採取部位に関係なく信頼性の高い検査が可能であると考えられた。

4. *K. septempunctata* のミトコンドリアゲノムの解析

ミトコンドリアゲノムのコピー数は、核ゲノムの約 300 倍と高コピーであるため、本研究のミトコンドリアゲノムの解読を高感度の PCR 検査系の開発に応用できることが示唆された。これにより、夾雑物の多い便検体などでも *K. septempunctata* が検出し易くなる可能性が考えられる。

また、高精度の検出系の開発にも応用できる可能性が示唆された。*Kudoa* 属には様々な種があるが、適切な検査をするためには食中毒を起こす種のみを判定が必要で

ある。今回解読した *K. septempunctata* の配列を利用することによって、*Kudoa* 属の他種の配列と比較的に容易に解読できると思われる。その配列の比較から種特異的な PCR 検査系が開発できることが考えられた。

5. 免疫学的迅速診断法確立のための抗体作製

K. septempunctata と *S. fayeri* を認識する抗体を用いて免疫迅速試験法を開発した。その結果、両抗体とも高い力価および特性を示し、ELISA 法やイムノクロマト法などの迅速測定法に使用できる可能が示唆された。

6. 市販の魚における *K. septempunctata* の感染状況の調査

キハダマグロ筋肉融解巣ならびに食中毒由来のクロマグロ筋組織から分離した *K. neothunni* を比較した。これらは形態学的に同一の胞子をもち、18S rDNA の違いは 1,720 塩基長で 2 箇所の塩基置換のみであった。このことから、マグロの筋肉融解を起こす *Kudoa* 種と食中毒由来の *Kudoa* 種は同一種である可能性が示唆された。しかし、同様の低頻度での塩基置換率ながら、アルゼンチン沖の海域で取れる海産魚の死後に筋肉融解を引き起こす *K. rosenbuschi* と筋肉融解を引き起こさない *K. alliaria* は別種とされる。このことは、筋肉融解の有無のみが種鑑別の指標になっていることを意味している。同様の考えに従えば、今回の

K. neothunni の分離株 2 つは別種と考えることになる。しかしながら、死後の筋肉融解は酵素反応であり、様々な要因に左右されることを考慮する必要性がある。集団を扱う際の指標としては有用性がある特徴であっても、個別の感染例に適用して種診断の指標として使うには困難を伴ともなうと考えられる。

7. *S. fayeri* の 15 kDa タンパクのクローニングと組み換えタンパクの作成

今回クローニングした遺伝子は塩基配列の相同性から、*Sarcocystis* 属と同門の類縁寄生虫であるアイメリアならびにトキソプラズマのアクチン脱重合因子に相同性がみられた。この遺伝子から組み換えタンパクを作成したところ、このタンパクはウサギ腸管ループ試験で陽性を示した。この結果から、馬肉を喫食して発生する食中毒の原因物質は *S. fayeri* の 15 kDa タンパクであることが示唆された。

8. *S. fayeri* のゲノム解析

ザルコシスティスに関する新規の、あるいは潜在的な病原性を含めた寄生虫学的特性を明らかにすることは保健衛生上、重要な課題である。ザルコシスティス属には 100 種類以上あると考えられており、家畜あるいは野生動物の生食において筋肉中のシストは危害因子となり得る。そのリスク評価は今後重要な問題となることが予想され、ゲノミクスはその基盤的研究として高

い重要性を有している。また今回の結果は、原虫の進化、病原性あるいは薬剤耐性など寄生虫学的な課題の解決にも有用な情報基盤になると考えられる。

今回の研究で行われたライブラリー解析からリードの 96% が *S. fayeri* 由来の配列と想定されたことから、このライブラリーで de novo assemble を進めることは適当と考えられた。しかしながら de novo assemble の現状において N50 値、最長 contig 値は contig が進まないことを示しており、総 contig 長が想定ゲノムサイズよりも少ない結果となっている。リード数の不足が原因と考えられ、今後リード数を増した解析が必要である。解析の効率化も重要であり、GAIIx ではリードの長さがやや短いことから、次年度ではより長いリードが読める Mi Seq を導入し、de novo assemble に対応することを考えている。

E. 結論

今回の研究から、*K. septempunctata* による下痢発症機構およびその毒性の詳細が明らかになった。また、*S. fayeri* に関してもその毒性のもととなる原因物質のクローニングに成功した。今後発症機構の解析をさらに進め、これの寄生虫による食中毒の防止法につなげていきたい。

また、これら両寄生虫のゲノム解析がスタートし、今年度はその基礎的なデータを得ることができた。今後さらに詳細な遺伝情報を得ることによって、遺伝学的な方向

から病原因子の同定、推測を行うことができるようになると思われる。

K. septempunctata に関しては特異的な遺伝子検査法を確立することができた。また、*K. septempunctata* および *S. fayeri* に対する抗体を作成し、免疫学的迅速検査法の開発にも着手した。これらの方法が実用化されれば、現場における検査の省力化、また検査精度の向上に大きく寄与するものと考えられる。

K. septempunctata に関する疫学的研究も今年度より開始した。これまでに *K. septempunctata* に関する疫学的な調査はほとんどなされていない。平成 23 年度より、*K. septempunctata* は食中毒の原因として扱われるようになった。これによりさらに詳細な疫学情報を自治体から入手できるものと思われる。こういった情報の解析をさらに進めていくことにより、発症に必要な摂食量など、今後の食中毒発生の防止につながるような知見を得られるものと考えている。

近年、ヒラメの生食による食中毒だけでなく、メジマグロの生食による食中毒も増加している。現在のところメジマグロによる食中毒の原因物質は不明であるが、メジマグロには *Kudoa* 属の粘液胞子虫が寄生していることが以前から知られていた。今回、食中毒事例の喫食残品中の *Kudoa* 属の同定を試みたところ、*K. neothunni* であることが明らかになった。今後、*K. neothunni* が食中毒の原因物質である可能性についても

研究を進めていく必要があると思われる。

F. 研究発表

論文発表

1. Kawaia, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishie, Y., Ohnishi, T. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw. *Clinical Infectious Diseases*. 54, 1046-1052 (2012)
2. Harada, T., Kawai, T., Sato, H., Yokoyama, H., and Kumeda, Y. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int. J. Food Microbiol.* (in press), DOI information;10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.018
3. 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 (2011)
4. Li, Y-C., Sato, H., Kamata, Y., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Three novel

- myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. *Parasitology Research* (in press), DOI10.1007/s00436-012-2904-z
5. 大西貴弘, *Kudoa Septempunctata* を病因微生物とする食中毒, *食品衛生研究*, 61(11), 13-20 (2011)
 6. 佐藤 宏, 食中毒の新たな寄生虫性病原体として注目される粘液胞子虫の生物学, *山口獣医誌*, 38, 1-26 (2011).
- 学会発表
1. Ohnishi, T., Kawai, T., Sekizaki, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Kamata, Y., Irikura, D., Sugita-Konishi, Y. New parasitic food borne diseases in Japan, IUMS 2011 sapporo (2011.9)
 2. Yokoyama, H., Grabner, D., Shirakashi, S., Kinami, R., Ohnishi, T. *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) from the trunk muscle of cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) causing food poisoning of human, 8th International Symposium of Fish Parasites. Vina del Mar, Val-paraiso, Chile (2011.9)
 3. Irikura, D., Saito, M., Sugita-Konishi, Y., and Kamata, Y., Studies on the relationship between the toxicity of *Sarcocystis fayeri* and molecular biological properties of sarcocystin, 2011 年度日本分子生物学会 (2011)
 4. 新井陽子, 田中成幸, 伊藤誠一, 鎌田洋一, 小西良子, 斉藤守弘: 馬肉を原因食品とする食中毒病因物質の解明とその予防法, 平成 23 年度日本獣医公衆衛生学会 (2011)
 5. 古川真斗, 徳岡英亮, 原田誠也, 松本一俊, 八尋俊輔, 宮坂次郎, 斉藤守弘, 鎌田洋一, 入倉大祐, 松本 博: 生食用馬肉を共通食とする原因物質不明有症事例の原因究明と予防対策の検討, 平成 23 年度九州地区食品衛生監視員協議会 (2011)
 6. 八木田健司, 野崎智義, 鎌田洋一, 小西良子, 原因不明食中毒に関連した生食用馬肉中の住肉胞子虫 *Sarcocystis* 遺伝子検査, 平成 23 年度日本原生動物学会 (2011)
 7. 大西貴弘: 粘液胞子虫とその毒性, 及び検査法, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会 (2011)
 8. 飯島義雄, 中西典子, 大西貴弘, 小西良子: ヒラメからのクドア・セプテンプンクタータの検出方法, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会 (2011)
 9. 菊池 裕, 大西貴弘, 古沢博子, 福田 穰, 小西良子: ニワトリ抗体を用いたヒラメ筋肉寄生 *Kudoa septempunctata* の検出法, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会 (2011)
 10. 河合高生, 原田哲也, 横山博, 大西貴弘,

- 鎌田洋一, 小西良子, 久米田裕子. 乳のみマウスを使用した *Kudoa setempunctata* の下痢原性に関する研究 (1), 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, (2011)
11. 河合高生, 原田哲也, 横山博, 大西貴弘, 鎌田洋一, 小西良子, 久米田裕子. 乳のみマウスを使用した *Kudoa setempunctata* の下痢原性に関する研究 (2), 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, (2011)
12. 原田哲也, 河合高生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子. QPCR 法によるヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検出法の検討, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, (2011)
13. 河合高生. クドアの下痢原性の解析, 第 81 回日本寄生虫学会大会, 2012, 兵庫
- 講演・シンポジウム
1. Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., Ohnishi, T.: Molecular characterization of *Kudoa* spp. found in commercially available marine fish: a possible cause of gastrointestinal symptoms of Japanese people taking raw fish slices, BIT's 1st Annual World Congress of Microbes-2011 (2011.8)
2. Ohnishi, T.: Novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus*, United State-Japan cooperative program on development & utilization of natural resources (2012.3)
3. 佐藤 宏: お刺身文化の危機か? クドア粘液胞子虫症. 第 33 回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会, 札幌市, (2011.11).
4. 佐藤 宏: 身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～, 平成 23 年度獣医公衆衛生講習会 (山口県獣医師会), 山口市, (2011.11).
5. 大西貴弘: 新たに判明した寄生虫による食中毒の詳細とその検査法-生鮮魚肉を共通食とする食中毒-, NPO 法人 食の安全を確保するための微生物検査協議会 第 1 回総会・講演会 東京都・中央区, (2011.5)
6. 大西 貴弘: ヒラメ毒-新たに判明した寄生虫による食中毒-, 第 13 回ジャパン・インターナショナル・シーフードショウ, 東京都・江東区 (2011.7)
7. 大西貴弘: クドアを原因微生物とする食中毒について, 平成 23 年度第 4 回食品衛生監視員研修会, 三重県・津市 (2011.11)
8. 大西貴弘: 粘液胞子虫による新しい食中毒, 埼玉県衛生研究所セミナー, 埼玉県衛生研究所 (2012.1)
9. 大西貴弘: ヒラメの食中毒 (クドア・セプテンpunkタータ), 平成 23 年度専門研修「食品衛生」, 東京都特別区研修所 (2012.2)
10. 大西貴弘: クドア・セプテンpunkター

タの毒性と試験法, 第 24 回地研全国協議
会関東信静支部細菌研究部会 (2012. 2)

11. 佐藤 宏: 身近な寄生虫の世界～食品
と寄生虫～, 第 41 回全国市場食品衛生
検査所協議会全国大会講演, 山口市
(2012. 1. 20).
12. 大西貴弘: 生鮮食品 (魚類・馬肉) の寄
生虫による有症事例について, 平成 23
年度食品衛生監視員研修会 (長野県・長
野市) (2012. 3)
13. 大西貴弘: 生鮮食品を共通食とする新し
い寄生虫性食中毒, 平成 23 年度横浜市衛
生研究所衛生技術研修会, (神奈川県・横
浜市) (2012. 3)
14. 黒田 誠: 新下痢原性寄生虫クドアの発
見, 第 81 回日本寄生虫学会大会シンポジ
ウム, (兵庫県) (2012. 3)