

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

大西 貴弘

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

研究分担者 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 菊池 裕（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究協力者 古沢 博子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

研究協力者 福田 穰（大分県農林水産研究指導センター）

研究協力者 乙竹 充（（独）水産総合研究センター）

Kudoa septempunctata はヒラメに寄生する粘液胞子中に属する寄生虫である。この寄生虫は一過性の嘔吐や下痢を主症状とした食中毒を引き起こすが、どのようなメカニズムによってこのような症状を引き起こすのかは明らかになっていない。今回は *K. septempunctata* による下痢発症メカニズムに焦点を絞り、その機序の解析を行った。そのために *K. septempunctata* の胞子をヒト培養腸管細胞である Caco-2 細胞に接種し、電子顕微鏡観察を行った。その結果、胞子を Caco-2 細胞に接種す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。この胞子原形質はアメーバ状の細胞で非常に運動性に富んでいた。感染が進むと、胞子原形質は Caco-2 細胞に侵入を開始し、感染後、約 1 時間で Caco-2 細胞の基底膜にまで到達した。また、この胞子原形質は侵入の過程で、Caco-2 細胞に非常に大きな「穴」をあけることが明らかになった。この胞子原形質による細胞傷害が下痢の原因であるかどうかを調べるために、胞子を接種した Caco-2 細胞の透過性を測定した。その結果、胞子を接種すると約 1 時間で透過性が約 5 倍に上昇するのに対して、サイトカラシン D によって胞子原形質の細胞侵入を抑制すると、Caco-2 細胞の透過性の亢進は阻害された。また、胞子からの原形質の放出にはトリプシン様のプロテアーゼの関与が示唆された。以上の結果から、*K. septempunctata* の胞子が経口的に取り込まれると、腸管のなんらかのプロテアーゼ刺激によって、胞子から胞子原形質が放出され、この胞子の細胞侵入に伴う細胞傷害が、本食中毒における下痢症状の原因になっていることが示唆された。

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おり、年間 100 件を超す事例が報告されるようになってきている。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。

我々はこの食中毒の原因食材がヒラメであり、原因微生物は *Kudoa septempunctata* であることをこれまでに報告した¹⁾。*K.*

sempunctata は粘液胞子中に属する新種の寄生虫で、ヒラメの筋肉に寄生する²⁾。*K. sempunctata* の胞子の大きさは約 10 μm で、6 つもしくは 7 つの極嚢を持ち花びら状の形態をしている²⁾。我々のこれまでの研究から、この胞子を乳のみマウスに経口的に投与すると下痢を引き起こし、unks に経口投与すると激しい嘔吐を引き起こすことが明らかになっている¹⁾。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、接種後 1 時間で、腸管細胞層の透過性が急速に上昇することを明らかにした。

しかしながら、このような *K. sempunctata* の毒性を引き起こすメカニズムはほとんど明らかになっていない。これまで *Kudoa* 属は公衆衛生学的には無害であると考えられてきたため、魚病学的あるいは水産学的な観点からの研究が行われることはあっても、ヒトに対する病原性について研究されることはほとんどなかった。下痢の原因となるいくつかの原生動物、例えば *Giardia lamblia*、*Toxoplasma gondii*、*Cryptosporidium parvum*、*Entamoeba histolytica* などはヒトの腸管に侵入し、そこで増殖することが知られている³⁻⁷⁾。しかし、*K. sempunctata* がヒトの腸管に侵入するかどうかは明らかになっておらず、また、それが *K. sempunctata* による下痢の原因になるのかも明らかになっていない。そこで本研究では、*K. sempunctata* による下痢発症メカニズムを

明らかにするために、ヒト腸管細胞上での *K. sempunctata* の挙動について観察を行った。

B. 研究方法

1. ヒラメ筋肉中からの *K. sempunctata* 胞子の精製

K. sempunctata 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 浩先生より供与いただいた。胞子の精製にはヒラメ筋肉を 1g 計量し、氷上のシャーレにとり、ヒラメ筋肉の上に 45 μm 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 μm 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 μm 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、1500 \times g、15 分、4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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% 牛胎児血清と 1% Non-EssentialAminoAcid(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。

3. 透過型電子顕微鏡観察

Caco-2 細胞 (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、上記のように分化させた。3 日後、精製した *K. septempunctata* の胞子 (6×10^6 胞子/ディッシュ) を接種、37°C、1 時間培養した。培養後、細胞は 2% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で、4°C、30 分固定した。さらに、2% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液

(pH 7.4) で一晩固定した後、0.1 M リン酸緩衝液で 3 回洗浄した。そのあと、2% 四酸化オスミウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液で 4°C、1 時間固定した。さらに 50% エタノール、70% エタノールでそれぞれ 15 分、90% エタノール、100% エタノールで 5 分脱水処理を行った。脱水処理後、樹脂に包埋し超薄切片を作成した。切片は 2% 酢酸ウラニルで室温、15 分染色した後、鉛染色液で室温 3 分染色した。カーボン真空蒸着後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200E; 日本電子株式会社) で観察した。

4. 走査型電子顕微鏡観察

K. septempunctata を接種した Caco-2 細胞は脱水処理までは透過型電子顕微鏡と同様の処理を行った。脱水処理後、t-ブチルアルコールで 30 分、3 回処理した後、4°C で 2 日間凍結乾燥した。オスミウムプラズマコートによる導電処理を行った後、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ジング) により観察した。

5. 胞子原形質放出試験

K. septempunctata 胞子を PBS、H₂O もしくは H₂O (pH 2) に 10^7 胞子/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% 以上の胞子が胞子原形質を放出している場合、陽性と判定した。

6. 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、上述のように分化させた。3 日後、*K. septempunctata* 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、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で、室温で 30 分固定した。固定後、ニワトリ抗 *K. septempunctata* 血清、10%普通ヒツジ血清を含む PBS と 4°C、18 時間反応させた。ニワトリ抗 *K. septempunctata* 血清は松田らの方法に従って作成した⁸⁾。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)、10%普通ヒツジ血清を含む PBS 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、上述のように分化させた Caco-2 細胞にサイトカラシン存在下で *K. septempunctata* 孢子を接種し、TER の測定を行った。

C. 研究結果

1. プロテアーゼ処理による孢子原形質の放出

Caco-2 細胞は構造的、機能的類似性から腸管の透過性を評価する *in vitro* のモデルとして利用されている。我々は以前、Caco-2 細胞に *K. septempunctata* の孢子を接種し、

透過性の変化を測定することによって *K. septempunctata* の下痢毒性を評価した。その結果、孢子を Caco-2 細胞に接種すると 1 時間以内に TER が接種前の 80%にまで急速に低下し、Caco-2 細胞層の透過性の急速な上昇が示唆された。また、毒素産生性の可能性を調べるために、*K. septempunctata* 孢子の培養上清や、孢子の超音波破砕物を Caco-2 細胞に接種したが、TER に変化は見られなかった。これらの結果から、*K. septempunctata* は毒素産生以外の機構によって、腸管細胞の透過性の亢進を引き起こしている可能性が示唆された。

そこで、*K. septempunctata* 孢子が直接的に Caco-2 細胞に毒性を示すのかどうかを確認するために、Caco-2 細胞に孢子を接種し顕微鏡観察を行った (図 1)。その結果、接種後 1 時間で孢子から 2 個の細胞が放出されるのが観察された (図 1A)。この放出された細胞は孢子同様、抗 *K. septempunctata* 血清と反応した (図 1B)。いくつかの粘液孢子虫は宿主の腸管内で孢子原形質を孢子から放出することが報告されているため、*K. septempunctata* 孢子から放出された 2 個の細胞は孢子原形質であると考えられる。この孢子原形質は孢子を腸管細胞に接種すると放出されるため、この孢子原形質が *K. septempunctata* の病原性の明らかにするカギを握っているのではないかと考え、孢子原形質についてさらに研究を行った。

まず、どのような刺激によって、孢子原

形質が孢子から放出されるのか調べた (表 1)。我々のこれまでの研究から、孢子原形質の放出は牛胎児血清を含む培地で培養されている Caco-2 細胞に接種することで生じるため、最初に孢子を 10%の牛胎児血清を含む PBS と培養した。この結果、孢子を牛胎児血清と処理することにより、孢子原形質が孢子より放出されることが明らかになった。この牛胎児血清による孢子原形質の放出はプロテアーゼインヒビターを加えることによって抑制された。このことから血清中に含まれるなんらかのプロテアーゼが孢子原形質の放出に関与していることが示唆された。そこで、腸管で分泌されるトリプシンで孢子を処理したところ、孢子原形質の放出が観察された。これに対して、胃で分泌されるペプシンで孢子を処理しても孢子原形質の放出は見られなかった。

2. 孢子原形質の細胞侵入

K. septempunctata の病原性における孢子原形質の役割を調べるために、孢子を Caco-2 細胞に接種し、電子顕微鏡による観察を行った。その結果、*K. septempunctata* 孢子を Caco-2 細胞に接種すると (図 2)、孢子から孢子原形質が放出されるのを確認できた (図 3)。感染が進むと孢子原形質は膨化し、アメーバ状の形態をとるようになった (図 4)。孢子原形質は非常に大きな核と多数のミトコンドリア様のオルガネラを持っていた (図 4)。孢子原形質には細胞骨格が発達しており、偽足様の構造が観察された (図 5)。孢子からの極糸の弾出も観察

されたが、極糸は腸管細胞表面に接着しており、腸管細胞表面を貫通していなかった (図 6)。

さらに感染が進むと、孢子原形質の細胞骨格が集中し、Caco-2 細胞表面に侵入を開始し (図 7)、Caco-2 細胞表面に大きな穴を形成した (図 8)。この孢子原形質の細胞侵入による細胞傷害が、*K. septempunctata* の病原性と結びついているかどうか検討を行った。孢子原形質は細胞骨格が非常に発達しているため、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D を用いることによって、孢子原形質の運動を抑制し、細胞侵入を抑制できるのではないかと考えた。そこで、2 μ M のサイトカラシン D 存在下で孢子を Caco-2 細胞に接種すると、孢子からの孢子原形質の放出が阻害された (図 9B)。これに対してサイトカラシン非添加の場合、孢子原形質は Caco-2 細胞に侵入し、1 時間後には細胞の基底膜側にまで達した (図 9A)。このことから、サイトカラシン D によって孢子原形質の細胞侵入は阻害されることが明らかになった。そこで、サイトカラシン D 存在下で孢子を Caco-2 細胞に接種し、TER を測定したところ、サイトカラシン D の濃度依存的に TER の低下が阻害されることが明らかになった (図 10)。

3. 孢子原形質の分解

K. septempunctata による食中毒においては、患者は発症後速やかに回復するのが特徴である¹⁾。そこで我々は、*K. septempunctata* 孢子接種後 18 時間までの

Caco-2 細胞の TER を測定した。その結果、*K. septempunctata* 孢子接種後 1 時間で TER の急速な低下が見られたが、18 時間後には接種前の約 50% にまで回復した。この回復の原因を調べるために、Caco-2 細胞内の孢子原形質の状態を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、孢子接種後 1 時間では孢子原形質は完全な状態で観察されたが (図 11A)、2 時間後には *K. septempunctata* の抗原が細胞質内に広がっている状態、つまり孢子原形質の分解が始まっている像が観察された (図 11B)。

D. 考察

我々はヒラメの生食による原因微生物が *K. septempunctata* であることを以前に報告した¹⁾。しかし、この寄生虫による発症メカニズムは不明のままであった。本研究では *K. septempunctata* は Caco-2 細胞層の TER を低下させることにより毒性を示し、孢子原形質の細胞侵入を抑制することによって TER の低下が阻害されることが明らかになった。*K. septempunctata* の孢子原形質は接種後、急速に Caco-2 細胞内に侵入し、1 時間後には基底膜側に到達した。この急速な細胞内侵入は孢子接種後の速やかな TER の低下や臨床症状における潜伏時間の短さと非常によく一致していると思われる。また、孢子原形質の大きさは 10 μm よりも大きいので、孢子原形質の細胞侵入は重篤な障害を腸管細胞に引き起こしていることが示唆された。また、これまでの研究結果

から、孢子の超音波破碎物や培養上清を Caco-2 細胞に接種しても TER の変化は見られなかった。以上の結果から、孢子原形質の腸管細胞への侵入による細胞傷害が *K. septempunctata* による下痢の発症の原因であることが強く示唆された。

K. septempunctata は感染後、急速に腸管細胞に侵入した。これまでに *Myxobolus cerebralis* のようなある種の粘液孢子虫は宿主の腸管上皮細胞に侵入することが報告されてきた⁹⁾。そのため直接証明されていないにもかかわらず、*Kudoa* 属も同様に宿主の腸管細胞に侵入すると考えられてきた。今回の研究は *K. septempunctata* がヒトの腸管細胞に侵入し、下痢を引き起こすことを証明したものである。我々の知る限り、本研究は粘液孢子虫がヒトの腸管細胞に侵入することを示した最初のものである。

今回の結果では孢子原形質の分解は感染後、2 時間からすでに始まり、一晩の間で低下していた TER が速やかに回復した。孢子原形質の分解が生じる理由はまだ明らかになっていないが、ヒトの身体とヒラメの浸透圧の違い、もしくはヒトの免疫作用により、ヒトの身体の中では長く生きられないのではないかと考えている。*G. lamblia*、*T. gondii*、*C. parvum*、*E. histolytica*³⁻⁷⁾ のような下痢を引き起こす原生動物は腸管に侵入し、そこで増殖する。しかし、今回の結果から、*K. septempunctata* は腸管に侵入するが、増殖はしないことが明らかになった。この点は下痢を引き起こす他の原

生動物と *K. septempunctata* の大きな違いであると考えられる。*K. septempunctata* による食中毒の特徴である予後が良好というのは、この孢子原形質の急速な分解とそれに続く TER の回復が原因ではないかと思われる。

電子顕微鏡観察の結果から、孢子の内部には二つの孢子原形質が収納されるスペースがあることが明らかになった。このことは孢子の機能が孢子原形質の「容器」であることを示唆している。孢子は孢子原形質を宿主の免疫や消化酵素などから守っているものと考えられる。また、これらのことは *K. septempunctata* の病原性の本体は孢子ではなく、孢子原形質であることも示している。孢子が腸管に到達すると、孢子原形質が孢子から放出されねばならない。孢子原形質放出の刺激を検索したところ、牛胎児血清に含まれるプロテアーゼに刺激作用があることが明らかになった。今回はプロテアーゼを同定することはできなかったが、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、トリプシン様プロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターカクテルの働きによって、牛胎児血清による孢子原形質の放出が抑制された。腸管で分泌される重要なプロテアーゼとしてトリプシンが挙げられる。そこで、孢子をトリプシンで処理してみたところ、このトリプシンによって孢子原形質の放出が引き起こされることが明らかになった。これらのことは、腸管で分泌されるある種のプロテアーゼが孢

子原形質の放出を引き起こすことを示唆している。今回の Caco-2 細胞による実験は牛胎児血清を含まない培地で行っている。しかし、Caco-2 細胞の頂側膜側で GIP-膜結合型のトリプシン様プロテアーゼが活性型として発現していることが報告されている¹⁰⁾。また、その他種々のプロテアーゼが Caco-2 細胞の頂側膜側から分泌されていることが報告されている^{11) 12)}。これらのことから、我々の Caco-2 細胞の実験系では、*K. septempunctata* は Caco-2 細胞が産生するプロテアーゼを利用しているのではないかと考えられた。

今回の結果から *K. septempunctata* が腸管細胞に接種されると、孢子から極糸が弾出されることが明らかになった。極糸の役割についてはこれまでにいろいろ議論されてきたが、*K. septempunctata* の病原性における極糸の役割に関する知見はほとんどなかった。今回の電子顕微鏡観察の結果から、腸管細胞の表面に極糸が接着している像が観察されたが、極糸が細胞膜を貫通している像は観察されなかった。また、スライドガラス上で極糸を弾出させると、孢子は極糸を介してスライドガラスに接着した（データー示さず）。これらのことから、極糸は接着因子として *K. septempunctata* の病原性に関与している可能性が示唆された。

今回は *K. septempunctata* による下痢発症メカニズムに焦点を当て研究を行った。その結果、孢子原形質の細胞侵入に伴う細胞傷害が下痢の原因になっていることが明

らかになった。しかしながら、*K. septempunctata* は下痢以外にも嘔吐を引き起こす。今後は *K. septempunctata* による嘔吐発症メカニズムに焦点を移し、研究を行っていききたい。

E. 参考文献

1. Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, 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 Fish. Clin. Infect. Dis., **54**, 1046-1052, (2012).
2. Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitol. Res., **107**, 865-872, (2010).
3. Saha, T.K., Ghosh, T.K. Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterology., **72**, 402-405, (1977).
4. Brandborg, L.L., Tankersley, C.B., Gottlieb, S., Barancik, M., Sartor, V.E. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterology., **52**, 143-150, (1967).
5. Dubey, J.P., Speer, C.A., Shen, S.K., Kwok, O.C., Blixt, J.A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasitol., **83**, 870-882, (1997).
6. Chen, X.M., LaRusso, N.F. Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. Gastroenterology., **118**, 368-379, (2000).
7. Yoshida, N., Tyler, K.M., Llewellyn, M.S. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. Trends. Parasitol., **27**, 459-466, (2011).
8. Matsuda, H., Mitsuda, H., Nakamura, N., Furusawa, S., Mohri, S., Kitamoto, T. A chicken monoclonal antibody with specificity for the N-terminal of human prion protein. FEMS. Immunol. Med. Microbiol., **23**, 189-194, (1999).
9. El Matbouli, M., Hoffmann, R.W. Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*.

- Int. J. Parasitol., **28**, 195-217, (1998).
10. Friis, S., Godiksen, S., Bornholdt, J., Selzer-Plon, J., Rasmussen, H. B., Bugge, T.H., Lin, C.Y., Vogel, L.K. Transport via the transcytotic pathway makes prostasin available as a substrate for matriptase. J. Biol. Chem., **286**, 5793-5802, (2011).
11. Buzza, M.S., Netzel-Arnett, S., Shea-Donohue, T., Zhao, A., Lin, C.Y., List, K., Szabo, R., Fasano, A., Bugge, T.H., Antalis, T.M. Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **107**, 4200-4205, (2010).
12. Wang, J.K., Lee, M.S., Tseng, I.C., Chou, F.P., Chen, Y.W., Fulton, A., Lee, H.S., Chen, C.J., Johnson, M.D., Lin, C.Y. Polarized epithelial cells secrete matriptase as a consequence of zymogen activation and HAI-1-mediated inhibition. Am. J. Physiol. Cell. Physiol., **297**, C459-C470, (2009).
- F. 研究発表
- ・論文発表
1. Kawaia, T., Sekizuka, T., Yahatac, 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. 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
- ・講演・シンポジウム発表
1. 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・中央区, (2011.5)
2. 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・シーフードショー, 東京都江東区(2011.7)
3. 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)
4. 大西 貴弘 : 粘液胞子中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)
5. 大西 貴弘 : ヒラメの食中毒 (クドア・セプテンプンクタータ), 平成 23 年度専門研修「食品衛生」, 東京都特別区研修所 (2012.2)

3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
- Fish Parasites. Vina del Mar, Valparaiso, Chile (2011. 9)
3. 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 (2011.10)
4. 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punkタータの検出方法, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会 (2011.10)
5. 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)

・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

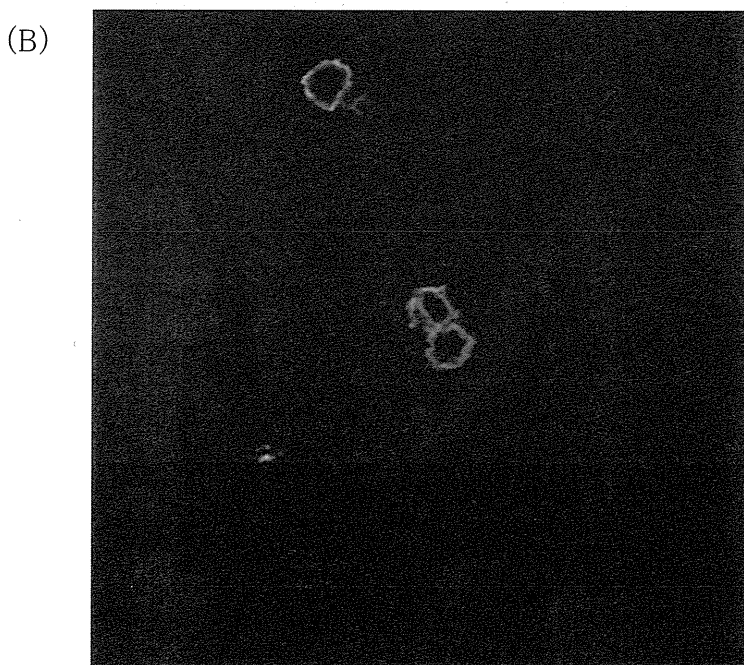
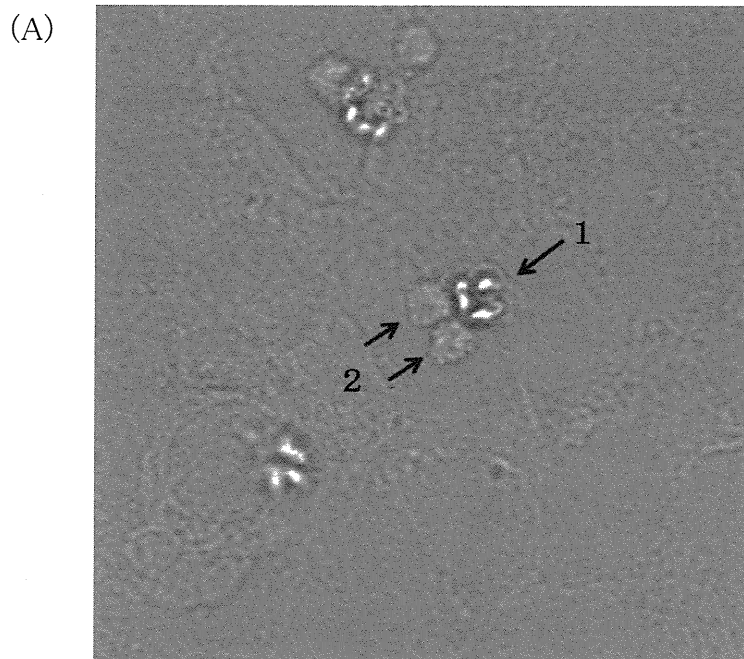


図1 孢子からの孢子原形質の放出

(A) 微分干渉顕微鏡による観察 1 : 孢子, 2 : 孢子原形質

(B) 抗 *K. septempunctata* 血清と反応する孢子および孢子原形質

表 1 胞子原形質の放出

刺激	胞子原形質の放出
10% FCS in PBS	+
10%FCS + Protease inhibitor cocktail in PBS	-
Trypsin (400 µg/ml) in PBS	+
PBS	-
Pepsin (5 µg/ml) in H ₂ O	-
Pepsin (5 µg/ml) in H ₂ O, pH 2	-
H ₂ O	-

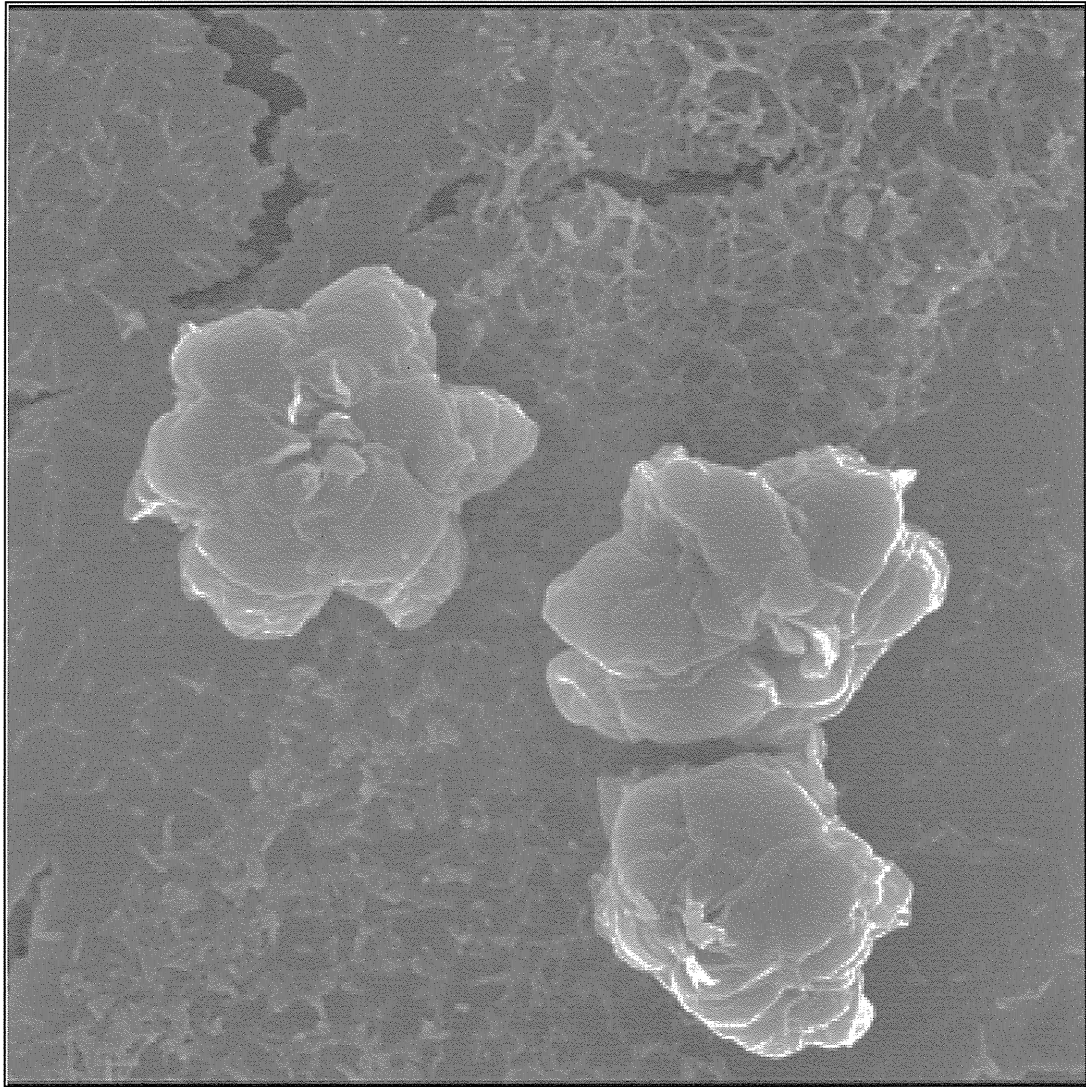


図2 Caco-2細胞に接種された孢子（走査型電子顕微鏡像）



図3 孢子からの原形質の放出 (透過型電子顕微鏡像)

1 : 孢子, 2 : 孢子原形質, 3 : 放出された孢子原形質が収まっていた空間 Bar= 5 μ m

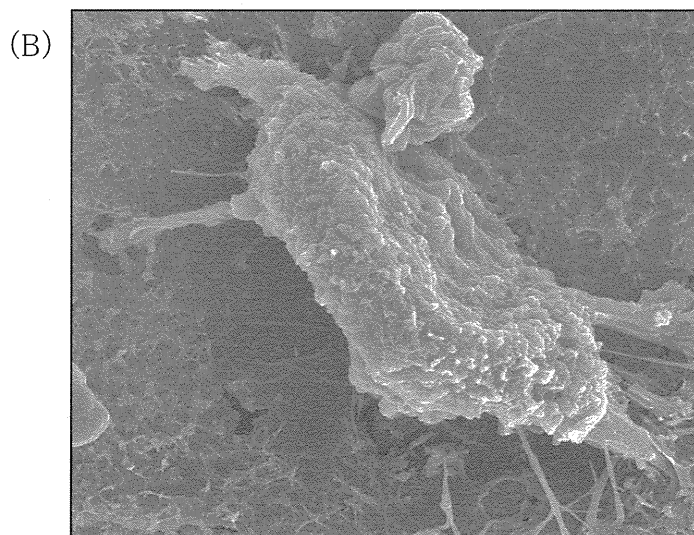
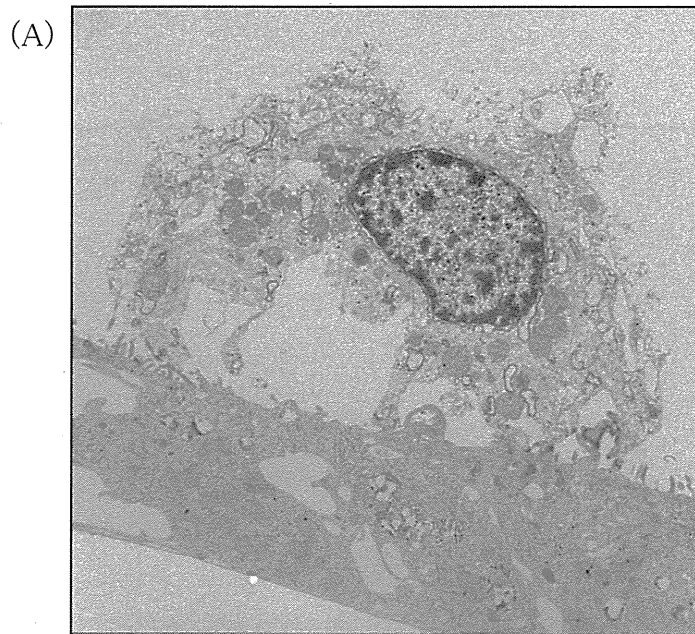


図4 アメーバ状の形態をとる孢子原形質

(A) 透過型電子顕微鏡像 (B) 走査型電子顕微鏡像

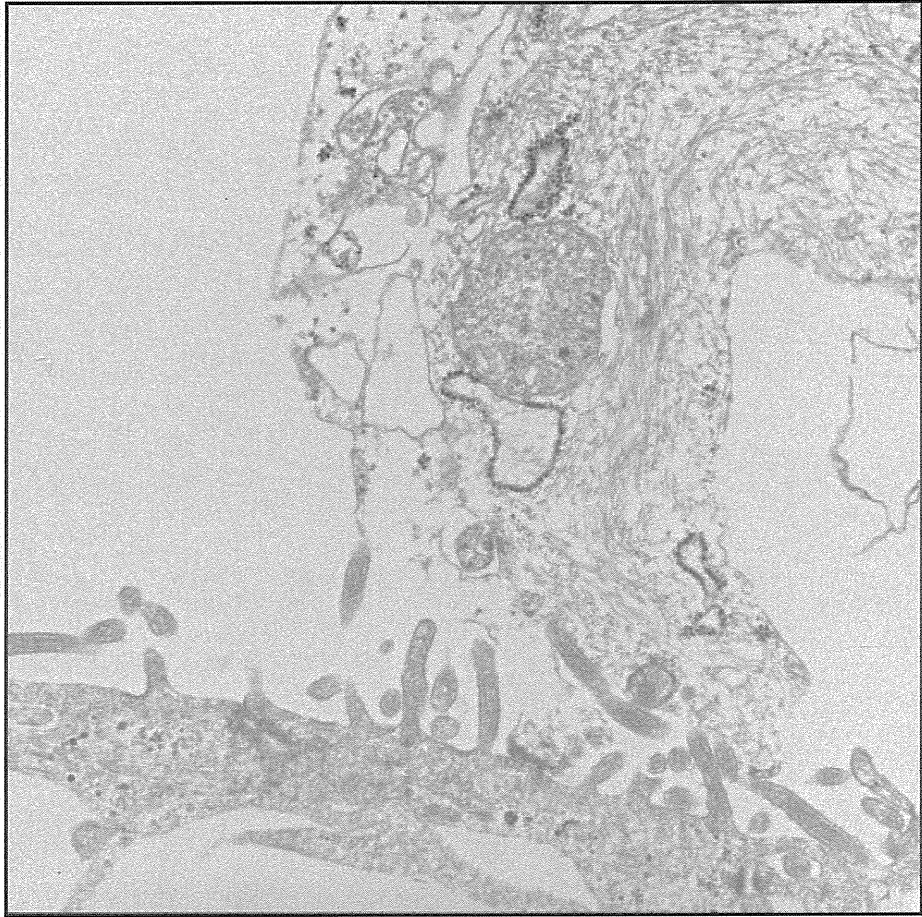


図5 孢子原形質の偽足 (透過型電子顕微鏡像)



図6 極糸の弾出 (走査型電子顕微鏡像)

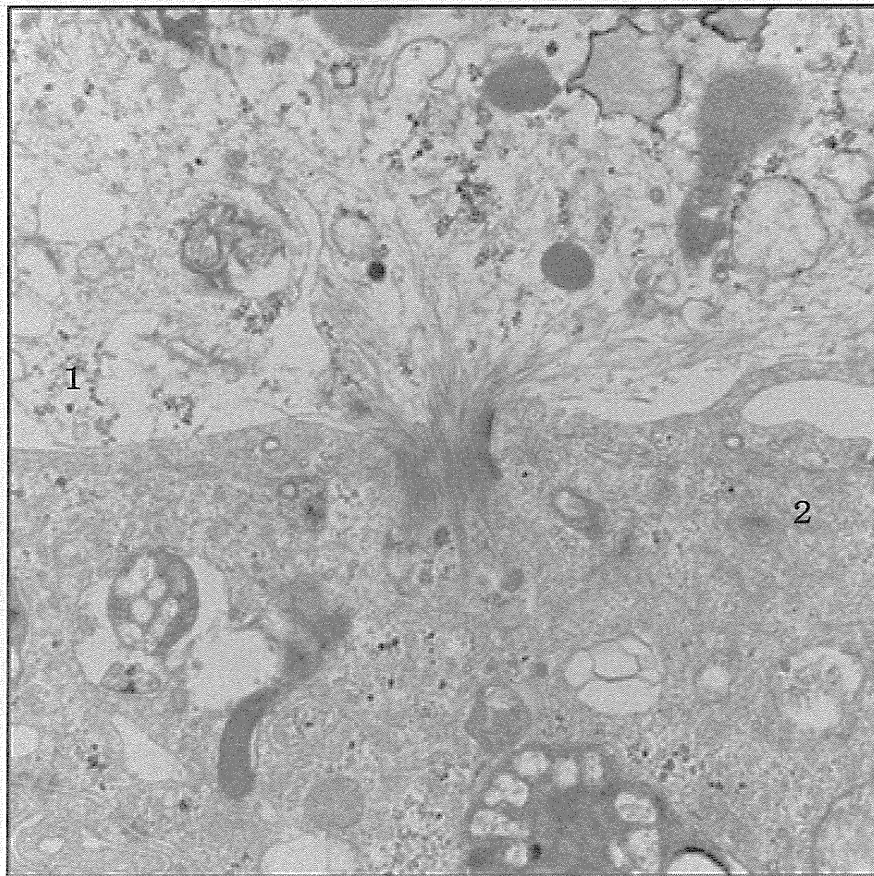


図7 孢子原形質の侵入 (透過型電子顕微鏡像)

1 : 孢子原形質 2 : Caco-2 細胞

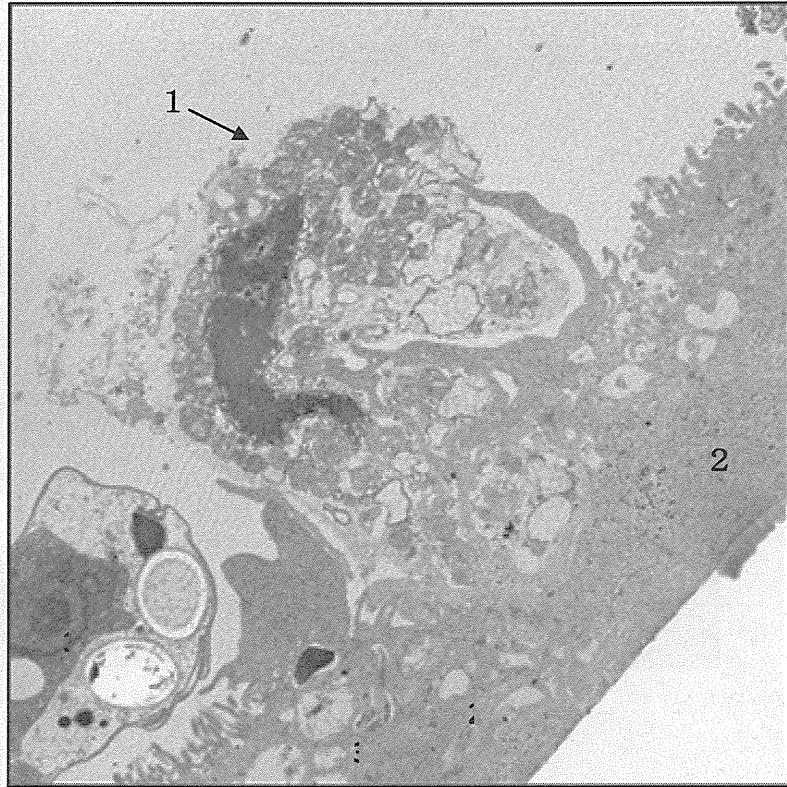


図8 孢子原形質による細胞傷害 (透過型電子顕微鏡像)

1 : 孢子原形質 2 : Caco-2 細胞