

特にヒラメを共通食とする原因不明食中毒については、*Kudoa* 属粘液胞子虫の *Kudoa septempunctata* が原因物質の一つと考えられることを報告した。

その結論に至るために、昨年度、我々は食中毒 4 事例の喫食残品および関連品のヒラメから抽出した *K. septempunctata* 胞子を乳のみマウスに投与し、*K. septempunctata* 胞子が下痢原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 *K. septempunctata* 胞子の下痢原性評価法を構築した。本年度は、その評価法を使用し、pH の変化や加熱・凍結などの不活化処理に対して *K. septempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性が消失するか否かを調べた。同時に、細胞の生死判定に使用される染色液であるトリパンブルーで *K. septempunctata* 胞子を染色し、その状態を観察した。その結果、*K. septempunctata* 胞子の乳のみマウスに対する腸管内液体貯留活性とトリパンブルー色素排除能とは関連性があることが示唆されたので報告する。

また、*K. septempunctata* による食中毒が疑われる場合には、症状や発症時間などの疫学情報の収集に加え、原因物質を特定するため喫食残品から *K. septempunctata* 胞子を検出することが必要となる。平成 23 年 7 月 11 日付食安監発 0711 第 1 号において、顕微鏡による定量検査法に加え、18S rDNA を標的としたリアルタイム PCR 法による定量検査法が示された。この暫定通知法で示されたプライマーおよびプローブの塩基配

列を、現在公開されている *Kudoa* 属粘液胞子虫 36 種の 18S rDNA 配列と比較したところ、これらが *K. septempunctata* に特異的でない可能性が示された。そこで、感染魚から抽出した 7 種類の *Kudoa* 属粘液胞子虫の DNA について暫定通知法のリアルタイム PCR 法を実施したところ、*K. thyrssites* と *K. neothunni* の DNA サンプルで PCR 産物の増幅が確認された。ヒラメには *K. lateolabracis* や *K. thyrssites* など他種の *Kudoa* 属粘液胞子虫が寄生することが知られており、*K. septempunctata* の同定にはこれらの種との鑑別が重要である。そこで、本年度は *K. septempunctata* を種特異的に検出できる定量リアルタイム PCR (QPCR) 法の開発を試みたので報告する。

## B. 研究方法

### I. 乳のみマウスを用いた *K. septempunctata* 胞子の下痢原性に関する研究

#### 1. ヒラメ筋肉中の *K. septempunctata* 胞子の精製

ヒラメの筋肉を 1g 秤量し、筋肉上に 45  $\mu$ 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、*K. septempunctata* 胞子を粗抽出した。この粗抽出液を 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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、1,500×g、15分、4°Cで遠心を行った。得られた沈渣に *K. septempunctata* 胞子が含まれているため、沈渣を1mlのPBSで懸濁して *K. septempunctata* 胞子抽出液とした。パーコール処理によって *K. septempunctata* 胞子を精製する場合は、30%パーコール液の上に15%パーコール液を同量重層した遠心チューブを作製し、*K. septempunctata* 胞子抽出液を15%パーコール液の上に重層した。チューブを3,000 rpm、4°Cで遠心し、その沈渣をPBSに浮遊させた(精製胞子液)。

## 2. 精製胞子の不活化処理

*K. septempunctata* 胞子が下痢原性を担っているかどうかを調べるために、精製胞子液を使って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に精製胞子を懸濁して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。超音波処理では、処理後に15,000rpmで5分遠心した上清と沈渣も同様に調べた。

## 3. 不活化処理後の *K. septempunctata* 胞子の顕微鏡観察

不活化処理後の *K. septempunctata* 胞子液をトリパンブルー染色液と混和した後、微分干渉顕微鏡で観察した。

## 4. 乳のみマウス試験

4~5日齢の ddY マウスに *K. septempunctata* 胞子抽出液を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。1サンプルにつき5匹のマウスを使用し、Student's *t* test を用いて統計解析した。

## II. 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

### 1. 食中毒事例ヒラメに由来する *Kudoa* 属粘液胞子虫の 18S rRNA 遺伝子配列の決定

2010年に愛媛県、福井県、大分県で発生した3件の食中毒疑い事例に由来するヒラメから胞子を抽出し、DNeasy® Blood&Tissue Kit (QIAGEN)を用いてBloodプロトコールに従い、DNA抽出を行った。*Kudoa* 属 18S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーでPCRを行い、増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定した。

これらのDNA抽出液は、QPCR法の検討における陽性対照として使用した。

### 2. QPCR法の確立

#### 1) 標的配列候補の検討

GENETYX ver.10を用いて *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 (文献 1)。PrimerExpress (ABI)あるいはPrimer3ソフ

トウェアを用いて、標的配列候補を含む100~150 bpのPCR産物が得られるように、ForwardおよびReverseプライマーを設計した。

## 2) Sybr® GoldによるPCR反応および定量性の確認

各プライマーペアについて Sybr® GoldによるQPCR反応を行い、陽性コントロールで一峰性の融解曲線を示し、陰性コントロールで非特異増幅のないプライマーを選択した。反応試薬は、Sybr® Gold (×1) 1 μl、Premix EX Taq™ (Takara) 12.5 μl、各プライマー0.2 μM(北海道システムサイエンス)、×50 ROX Reference Dye (Takara) 0.5 μlを用い、滅菌蒸留水で23 μlに調整し、2 μlのDNAテンプレートを加えた。反応条件は94°C30秒→(94°C20秒→55°C20秒→72°C31秒)×40サイクル→95°C15秒→60°C20秒→95°C15秒とし、PRISM7000 (ABI)で反応を行った。良好な反応性がみられたプライマーについては、陽性コントロールを10倍段階希釈したDNA希釈溶液(×10<sup>0</sup>~10<sup>-6</sup>)を用いて、検量線を作成し定量性を確認した。反応は95°C30秒→(95°C5秒→60°C31秒)×40サイクルで実施し、傾きが-3.5から-3.0の間でR<sup>2</sup>が0.98以上を示したプライマーペアを最終候補とした。

## 3) Prime time™.qPCRプローブ (MBL)によるPCR反応および定量性の確認

最終候補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Primer Expressによ

り設計し合成した。これらのプライマーとプローブを用いてQPCR反応を行い、陽性コントロールで良好な増幅曲線が得られ、かつ陰性コントロールで非特異増幅のない組合せを決定した。反応試薬は、Premix EX Taq™ (Takara) 12.5 μl、各プライマーおよびPrime time™ qPCR probe 0.2 μM(MBL)、×50 ROX Reference Dye (Takara) 0.5 μlを用い、滅菌蒸留水で23 μlに調整し、2 μlのDNAテンプレートを加えた。反応条件は95°C30秒→(95°C5秒→60°C31秒)×40サイクルとし、PRISM7000で反応を行った。良好な反応性がみられたプライマーについては、陽性コントロールを10倍段階希釈したDNA希釈溶液(×10<sup>0</sup>~10<sup>-6</sup>)を用いて、検量線を作成し定量性を確認した。

## 4) 組換えプラスミドによるQPCR法の定量性、繰返し精度、再現性の確認

QPCR 標的領域を含む組換えプラスミドをTOPO TA cloning Kit (Invitrogen)により作製し、検量線の確認および検出下限値の算出に用いた。また、10週間内で異なる3実験日に検量線を作成し、再現性を確認した。

## 5) 特異性の確認

*K. lateolabracis* 感染ヒラメ、*K. thyrssites* 感染ヒラメ、*K. iwataii* 感染クロダイ、*K. iwataii* 感染スズキ、*K. trachuri* 感染マアジ、*K. thunni* 感染ビンチョウマグロ、*K. neothunni* 感染クロマグロより抽出したDNAを用い、QPCR法の特異性を確認した。

### 3. ヒラメ検体

国立医薬品食品衛生研究所より入手した *K. septempunctata* の感染が疑われるヒラメ 76 検体を供試した。このうち感染が確認されたヒラメ各 10 検体を DNA 抽出法の検討および検体採取部位の定量性への影響評価に用いた。また、*K. septempunctata* 1 胞子あたりに含まれる 18S rRNA 遺伝子のコピー数の算出に 5 検体を用いた。

### 4. 顕微鏡法

胞子抽出液および精製胞子液は等量のトリパンブルー染色液と混合した後、血球計算板を用いて光学顕微鏡下で観察し、胞子数を算出した。

### 5. DNA 抽出法の検討

*K. septempunctata* 感染ヒラメ 10 検体を用いて、加熱法、アルカリ法、FastDNA SPIN Kit (Bio101)、DNeasy® Blood&Tissue Kit による DNA の抽出を行い、QPCR 法の cycle threshold (Ct) 値を用いて抽出効率を相対的に比較した。

### 6. 検体採取部位の定量性への影響評価

*K. septempunctata* 感染ヒラメ 10 検体を用いて、有眼側および無眼側の各 2 か所からヒラメ筋肉をサンプリングし(図 3)、DNeasy® Blood&Tissue Kit による DNA の抽出を行い、QPCR 法の Ct 値を用いて検体採取部位の定量性への影響を評価した。

### 7. 顕微鏡法と QPCR 法の定量性の相関評価

ヒラメ 76 検体を用いて、顕微鏡法による胞子数と QPCR 法での Ct 値の相関性を評価した。なお、ヒラメ検体からの DNA 抽出は

DNeasy® Blood&Tissue Kit で行った。重回帰分析および Pearson の積率相関係数の算出には Microsoft Excel version 2007 を用いた。

### 8. *K. septempunctata* 1 胞子に含まれる 18S rRNA 遺伝子コピー数の算出

*K. septempunctata* 感染ヒラメ 5 検体より得られたパーコール精製胞子液について、DNeasy® Blood&Tissue Kit (Blood プロトコール) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 抽出液に含まれる 18S rRNA 遺伝子コピー数を QPCR 法で測定し、1 胞子に含まれる遺伝子コピー数を算出した。

## C. 研究結果

### I. 乳のみマウスを用いた *K. septempunctata* 胞子の下痢原性に関する研究

#### 1. *K. septempunctata* の出下痢原性

1) パーコール精製後の *K. septempunctata* 胞子は、パーコール精製前の *K. septempunctata* 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(図 1B, C)。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(図 1A)。pH4、pH7、pH9 で 1 時間反応させた後の精製胞子は、反応前の精製胞子と同様に、PBS 投与群と比較して有意に FA 値を上昇させた(図 1C, D)。しかし、 $75^{\circ}\text{C}$  5 分以上の加熱処理や  $-80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間以上あるいは  $-30^{\circ}\text{C}$  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(図 1A~D)。さらに、超音波処理を行った精製胞子やその遠心上清、

遠心沈渣も FA 値を上昇させなかった (図 1B, D)。

2) 不活化処理前後の精製胞子をトリパンブルー染色後に微分干渉顕微鏡で観察した。FA 値を上昇させた精製胞子はトリパンブルーで染色されなかったが (図 2A, C)、FA 値を上昇させることができなかった加熱および凍結処理後の精製胞子は、トリパンブルーで染色された (図 2B, D)。

## II. QPCR 法によるヒラメからの *K. septempunctata* 検出法の開発

### 1. 食中毒事例ヒラメに由来する *Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定

食中毒事例ヒラメ 3 検体より抽出した胞子の 18S rRNA 遺伝子塩基配列 1, 528 bp は *K. septempunctata* 18S rRNA 遺伝子配列 (GenBank accession no. AB553293) と 100% 一致した。また、昨年度報告した豊中市、神戸市、北九州市、広島県の事例由来 *K. septempunctata* の配列とも 100% の一致であった。これらの結果より、3 事例のヒラメ検体中の *Kudoa* 属粘液胞子虫は *K. septempunctata* であると同定した。これらのすべての塩基配列については DDBJ より GenBank に登録を行った (GenBank accession no. AB647391~647397)。

### 2. QPCR 法の確立

#### 1) 標的配列候補の検討

*K. septempunctata* 18S rRNA 遺伝子配列 (GenBank accession no. AB553293) と GenBank に登録されている 35 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫の 18S rRNA 遺伝子配列との比較

を行った。AB553293 の 160 bp 付近、450 bp 付近、670bp 付近に *K. septempunctata* に特異的な配列を見出し、このうち、プローブの特異性が最も高くなりうると考えられた 160 bp 付近を標的配列候補とした。この標的配列を含む 100~200 bp 程度の PCR 産物を得るため、PrimerExpress および Primer3 ソフトウェアでプライマー設計を行い、6 つの Forward プライマー候補および 4 つの Reverse プライマー候補を設計した (表 1)。

#### 2) Sybr® Gold による PCR 反応および定量性の確認

24 通りのプライマーペアについて Sybr® Gold による PCR 反応および定量性の確認を実施した。69F と 200R、69F と 240R、69F と 243R、100F と 258R、114F と 258R の組合せで良好な増幅および検量線が得られたため、これら 5 組を最終候補とした。

#### 3) Prime time™ qPCR プローブ (MBL) による PCR 反応および定量性の確認

最終候補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 3 つのプローブを作製した (表 1)。これらのプローブと 5 つの最終候補プライマーペアについて、15 通りの PCR 反応性と定量性の確認を行った。100F と 258R と Pr156 の組合せで最も良好な検量線が得られたため、これらを公衛研法として以下の検討に使用した。

#### 4) 組換えプラスミドによる QPCR の定量性、繰返し精度、再現性の確認

組換えプラスミドによる定量性の検討では、 $2.2 \times 10^1$  から  $2.2 \times 10^7$  コピー/反応の範囲で良好な直線性を示す検量線が得られ、各希釈段階から得られた3つのCt値の変動係数は平均 1.03%であり、良好な繰り返し精度を示した(図 4)。検量線の傾きから計算された増幅効率 $\eta$ は99.91%であり、本法の検出下限は $1.1 \times 10^1$  コピー/反応であった。再現性の確認では、第1試験日の検量線が $Y = -3.2948X + 42.256$ 、第2試験日の検量線が $Y = -3.3290X + 41.575$ 、第3試験日の検量線が $Y = -3.3323X + 41.517$  で、高い再現性が示された。

#### 5) 特異性の確認

*K. lateolabracis* 感染ヒラメ、*K. thyrsites* 感染ヒラメ、*K. iwataii* 感染クロダイ、*K. iwataii* 感染スズキ、*K. trachuri* 感染マアジ、*K. thunni* 感染ビンチョウマグロ、*K. neothunni* 感染クロマグロより抽出したDNAについてQPCR法を実施したところ、すべての検体で陰性結果を示した。

#### 3. DNA 抽出法の検討

感染ヒラメ10検体を用いて4種類の抽出法によりDNAを抽出し、QPCRを行った。得られた平均Ct値(±S.D.)を表2に示した。10検体中7検体(No. 1, 3, 6~10)でDNeasy® Blood&Tissue Kitを用いた場合のCt値が他と比べて有意に小さく、抽出効率が最も高いことが示された。検体 No. 2 ではDNeasy® Blood&Tissue Kitを用いた場合のみ陽性結果が得られ、No. 4 および No. 5 においてもDNeasy® Blood&Tissue Kitは他

の方法と同等のCt値を示した。以上の結果より、DNeasy® Blood&Tissue Kitは感染ヒラメからの*K. septempunctata* DNA抽出に最も適していると考えられた。

#### 4. 検体採取部位の定量性への影響評価

同一ヒラメの4部位から採取した筋肉サンプルよりDNAを抽出し、QPCR法を実施してCt値を比較した(表 3)。顕微鏡法で $4.7 \times 10^4 \sim 8.4 \times 10^5$  個/gの胞子が確認された6検体のうち5検体では、いずれかの採取部位間でCt値に有意差が認められ、胞子の分布に差があることがわかった。一方、顕微鏡法で $1.1 \times 10^6$  個/g以上の感染が認められた4検体では、採取部位によるCt値のばらつきは確認されず、胞子の分布に偏りがないことがわかった。

#### 5. 顕微鏡法とQPCR法の定量性の相関評価

ヒラメ76検体を用いて、顕微鏡法による胞子数とQPCR法でのCt値の相関性を評価した。顕微鏡法では76検体中49検体(64.5%)で胞子が確認された。一方、QPCR法では顕微鏡法で確認された49検体に加え、さらに8検体が陽性と判定された(計57検体、75%)。両方法で陽性が確認された49検体について胞子数とCt値の重回帰分析を行ったところ、Pearsonの積率相関係数は $-0.96475$  ( $P < 0.01$ )であった(図 5)。これらの結果から、顕微鏡法とQPCR法の定量性には高い相関性が確認された。

#### 6. *K. septempunctata* 1胞子に含まれる

18S rRNA 遺伝子コピー数の算出

*K. septempunctata* 精製胞子液5検体に

ついて、含まれる孢子数と 18S rRNA 遺伝子コピー数を測定した(表 4)。これらの結果から、1 孢子あたり  $300 \pm 21 \sim 1400 \pm 140$  コピーの 18S rRNA 遺伝子が含まれることが推測された。

#### D. 考察

##### I. 乳のみマウスを用いた *K. septempunctata* 孢子の下痢原性に関する研究

###### 1. *K. septempunctata* 孢子の下痢原性

パーコール精製した *K. septempunctata* 孢子は、精製前の孢子抽出液と同様に、乳のみマウス試験で腸管内液体貯留活性を示した。この精製孢子の液体貯留活性は投与孢子数に依存し、活性を示すには約  $10^6$  個の孢子数が必要であった。精製孢子の腸管内液体貯留活性は、pH4~pH9 の pH 域では失活しなかったが、75°C5 分以上の加熱処理や-30°C1 日、-80°C1 時間以上の凍結処理、超音波処理により失活した。活性を示した *K. septempunctata* 孢子はトリパンブルーで染色されなかったが、加熱および凍結処理により失活した *K. septempunctata* 孢子は、トリパンブルーで染色された。トリパンブルーは細胞の生死判定に使用される染色液で、トリパンブルー色素排除能を失った細胞は死細胞と判定される(文献 2)。以上のことから、クドアが腸管内液体貯留活性を示すには、トリパンブルー色素排除能を有する、いわゆる「生きた」孢子が必要であると考えられた。

##### II. QPCR 法によるヒラメからの *K. septempunctata* 検出法の開発

これまでの疫学調査により、多数の喫食者が含まれる *K. septempunctata* 食中毒事例では、ヒラメのオッズ比が必ずしも高い値を示さないことが報告されている(文献 3)。これは、喫食された複数のヒラメのうち、一部が *K. septempunctata* に感染していたために、その感染ヒラメの喫食者のみに発症が集中することに起因する。そのため、疫学情報単独で *K. septempunctata* を食中毒原因物質と確定することは難しく、喫食残品のヒラメが入手できた場合には、*K. septempunctata* 感染の有無を示すことが食中毒診断に重要である。また、ヒトの発症には一定数以上の孢子摂取が必要であると考えられているため、定量的な結果を示すことも食中毒診断に重要である。今回の検討により、我々が開発した QPCR 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であることがわかった。顕微鏡法による孢子数の検出限界が約  $10^4$  個/g であるのに対し、QPCR 法は 18S rRNA 遺伝子で約 10 コピー/反応であった。さらに、この方法は、現在ヒトに対して病原性を示すことが明らかになっている唯一の *Kudoa* 属粘液孢子虫である *K. septempunctata* を特異的に検出することができた。

QPCR 法の定量性に大きく影響を与えると考えられる要因の一つが、検体からの DNA 抽出法である。4 種類の抽出法を検討したところ、DNeasy® Blood&issue Kit が相対的に最も DNA 抽出効率が良く、定量試験

にはこの方法を用いるのが良いと考えられた。しかしながら、DNeasy® Blood&issue Kit は他の3種類の抽出法と比較し、抽出に時間を要するという短所もある。そのため、迅速な定性的確認に QPCR 法を用いる場合は、他の抽出法を使用することも考慮すべきである。

10<sup>6</sup> 個/g 以上の孢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<sup>6</sup> 個/g 以上の *K. septempunctata* 孢子感染が確認されている。そのため、食中毒事例で本 QPCR 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る。本研究で推測値ではあるが、1 孢子あたりの 18S rRNA 遺伝子のコピー数が決定されたのは大きな成果であった。これにより、QPCR 法の結果を孢子数に換算できるため、顕微鏡法の結果との比較が可能になり、双方の試験法を用いることでより精度の高い食中毒検査の実施が可能と考えられる。今回データは示さなかったが、*K. septempunctata* 食中毒が疑われた事例において QPCR 法を用いることにより、ヒラメのみならず、ヒラメとともに提供された別の食品や調理包丁の拭き取り検体から陽性結果が得られ、これらの事例に *K. septempunctata* が関連していたことが示唆された。このように開発した QPCR 法は感度と特異性が高く、様々な検体について検査の実施が可能であり、

喫食残品の入手が困難な場合にも食中毒事例を検証する為の一つの有効な手段になると考えられる。さらに、この QPCR 法を用いることで、未だ解明されていない代替宿主など *K. septempunctata* の生活環を調べる事が可能となり、感染予防につながる事が期待できる。

## E. 結論

1. 精製孢子の腸管内液体貯留活性は、pH4~pH9 の pH 域では失活しなかったが、75°C 5 分以上の加熱処理や -30°C 1 日、-80°C 1 時間以上の凍結処理、超音波処理により失活した。
2. *K. septempunctata* が腸管内液体貯留活性を示すには、トリパンプルー色素排除能を有する、いわゆる「生きた」孢子が必要であると考えられた。
3. *K. septempunctata* を種特異的に検出できる QPCR 法を開発した。本法は、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であった。検出限界値は、18S rRNA 遺伝子約 10 コピー/反応であった。
4. 10<sup>6</sup> 個/g 以上の孢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。
5. 市販キットを含めた 4 種類の抽出法を検討したところ、DNeasy® Blood&Tissue Kit が相対的に最も DNA 抽出効率が良く、定量試験にはこの抽出法を用いるのが良いと考えられた。



## 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. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001; May Appendix 3: Appendix 3B
3. 平成 22 年度厚生労働科学特別研究事業「生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策」総括・分担研究報告書

## G. 研究発表

- ・論文発表
1. Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., and 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.* 2012, **54**, 1046-1052.
  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

## ・学会発表

1. 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 septempunctata* 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, 東京.
2. 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 septempunctata* 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, 東京.
3. 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, 東京.
4. 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

表1 今回の検討に用いたプライマーおよびプローブ候補

配列 (5' -3')	
Forward	
67F	GCGAAGCGCTCAGTAAATC
68F	CGAAGCGCTCAGTAAATCAG
69F	GAAGCGCTCAGTAAATCAGTTATTGTC
92F	TGTCCGTTCCGGTCATATCAG
100F	CGGTCATATCAGCCATGGATAAC
114F	ATGGATAACTGTGGTAAATCTAGAGCTAATAC
Reverse	
200R	CCAGTTGGTCGAGTCTAATAAATGC
240R	TCGATATGCTCAGTTATTAGGATTCATC
243R	TGTTTCGATATGCTCAGTTATTAGGATTC
258R	CTATCGACAAATTAATGTTTCGATATGC
プローブ	
Pr141	(6-FAM <sup>TM</sup> ) - AATACATAGCAAATCTCACCATGTAAATGGTGG- (Iowa Black®FQ)
Pr148	(6-FAM <sup>TM</sup> ) - AGCAAATCTCACCATGTAAATGGTGG- (Iowa Black®FQ)
Pr156	(6-FAM <sup>TM</sup> ) - TCACCATGTAAATGGTGGGAGCATT- (Iowa Black®FQ)

表 2 4つのDNA抽出法の定量性への影響比較

検体 No.	平均 Ct 値 (± S. D.)			
	加熱法	アルカリ法	FastDNA	Blood & Tissue
No. 1	38.9±0.544 <sup>C</sup>	28.35±0.28 <sup>B</sup>	27.68±0.47 <sup>B</sup>	25.12±1.68 <sup>A</sup>
No. 2	検出せず	検出せず	検出せず	37.81±0.73
No. 3	37.51±0.56 <sup>D</sup>	27.55±0.25 <sup>C</sup>	25.49±0.44 <sup>B</sup>	21.34±0.22 <sup>A</sup>
No. 4	検出せず	31.90±0.35 <sup>A</sup>	31.10±0.23 <sup>A</sup>	32.23±0.77 <sup>A</sup>
No. 5	検出せず	39.24±0.25 <sup>A</sup>	39.20±0.82 <sup>A</sup>	37.40±1.84 <sup>A</sup>
No. 6	38.01±0.57 <sup>D</sup>	27.13±0.41 <sup>C</sup>	25.04±0.74 <sup>B</sup>	19.84±0.89 <sup>A</sup>
No. 7	34.94±0.69 <sup>D</sup>	25.47±0.25 <sup>C</sup>	23.76±0.51 <sup>B</sup>	18.10±0.52 <sup>A</sup>
No. 8	35.99±0.62 <sup>D</sup>	26.92±0.27 <sup>C</sup>	24.87±0.22 <sup>B</sup>	18.94±0.45 <sup>A</sup>
No. 9	38.57±0.32 <sup>D</sup>	27.82±0.14 <sup>C</sup>	25.83±0.43 <sup>B</sup>	20.80±0.42 <sup>A</sup>
No. 10	検出せず	36.19±0.45 <sup>B</sup>	38.16±0.64 <sup>C</sup>	34.99±0.44 <sup>A</sup>

有意差検定は Tukey-Kramer test で行い、 $P < 0.05$  の場合を統計学的有意とした。同一検体における、異なるアルファベットはその2群間の有意差を示す。

表3 検体採取部位の定量性への影響

検体 No. <sup>a</sup>	平均 Ct 値 (± S. D.)			
	有眼側		無眼側	
	部位 1	部位 2	部位 3	部位 4
No. 13 (4.7x10 <sup>4</sup> /g)	30.66±0.12	29.88±0.40	29.83±0.13	29.17±1.32
No. 57 (5.6x10 <sup>4</sup> /g)	38.12±0.52 <sup>A, B, C</sup>	34.50±0.10 <sup>A, D, E</sup>	31.92±0.25 <sup>B, D, F</sup>	36.08±0.75 <sup>C, E, F</sup>
No. 27 (6.9x10 <sup>4</sup> /g)	35.01±0.21 <sup>A, B, C</sup>	31.92±1.79 <sup>A</sup>	32.17±0.33 <sup>B</sup>	30.83±0.38 <sup>C</sup>
No. 16 (2.2x10 <sup>5</sup> /g)	30.75±0.35 <sup>A, B</sup>	29.48±0.57 <sup>A, C, D</sup>	35.87±0.42 <sup>B, C, E</sup>	31.45±0.18 <sup>D, E</sup>
No. 26 (6.3x10 <sup>5</sup> /g)	28.93±0.41 <sup>A</sup>	26.68±0.62 <sup>A, B, C</sup>	28.20±0.24 <sup>B</sup>	28.88±0.46 <sup>C</sup>
No. 29 (8.4x10 <sup>5</sup> /g)	27.59±0.68 <sup>A</sup>	25.37±0.76 <sup>A, B, C</sup>	27.98±0.12 <sup>B</sup>	27.36±0.17 <sup>C</sup>
No. 20 (1.1x10 <sup>6</sup> /g)	25.47±0.24	26.91±0.95	25.76±1.37	27.27±0.15
No. 15 (1.7x10 <sup>6</sup> /g)	25.51±0.05	25.96±0.46	26.83±0.79	26.66±0.76
No. 12 (2.5x10 <sup>6</sup> /g)	27.52±0.39	28.08±0.72	27.02±0.20	27.39±0.81
No. 51 (1.2x10 <sup>7</sup> /g)	23.15±0.62	23.06±0.20	22.93±0.36	22.61±0.73

<sup>a</sup>括弧内の数値は、顕微鏡法による *K. septempunctata* 孢子数を示す。

<sup>b</sup>有意差検定は Tukey-Kramer test で行い、 $P < 0.05$  の場合を統計学的有意とした。同一検体における、同一のアルファベットはその2群間の有意差を示す。

表 4. *K. septempunctata* 1 胞子に含まれる 18S rRNA 遺伝子コピー数の推測

検体 No.	精製胞子数	精製胞子に含まれる 18S rRNA 遺伝子コピー数	1 胞子に含まれる 18S rRNA 遺伝子コピー数(推測値)
No. pH11	$3.7 \times 10^5$	$1.1 \times 10^8$	$3.0 \times 10^2$
No. pH14	$3.6 \times 10^6$	$1.5 \times 10^9$	$4.2 \times 10^2$
No. pL15	$8.7 \times 10^5$	$6.0 \times 10^8$	$6.7 \times 10^2$
No. pH18	$6.0 \times 10^5$	$3.4 \times 10^8$	$5.7 \times 10^2$
No. pL18	$1.8 \times 10^6$	$2.5 \times 10^9$	$1.4 \times 10^3$

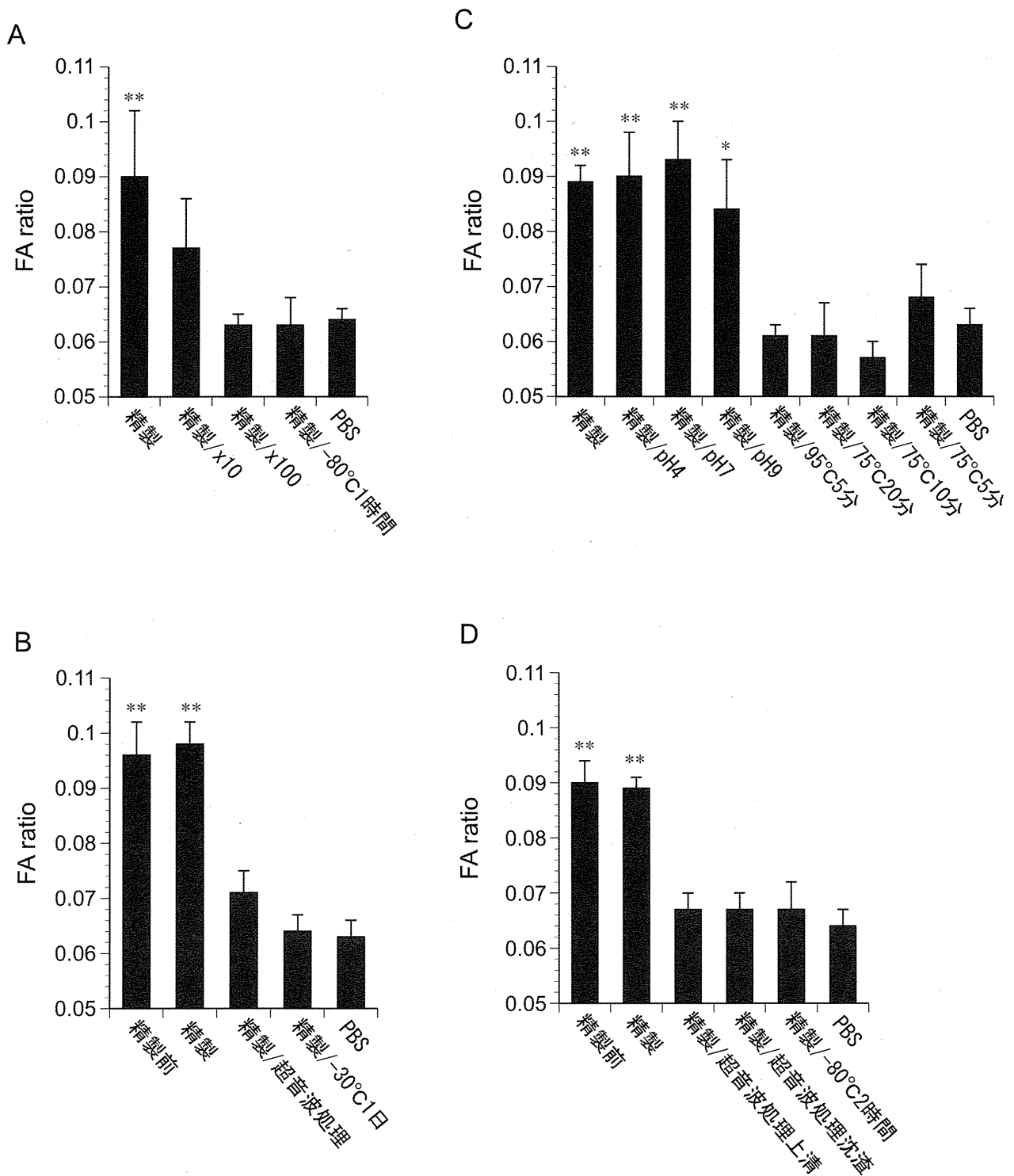


図1 *K. septempunctata* 孢子の下痢原性

\*\* , <0.001; \* , <0.005

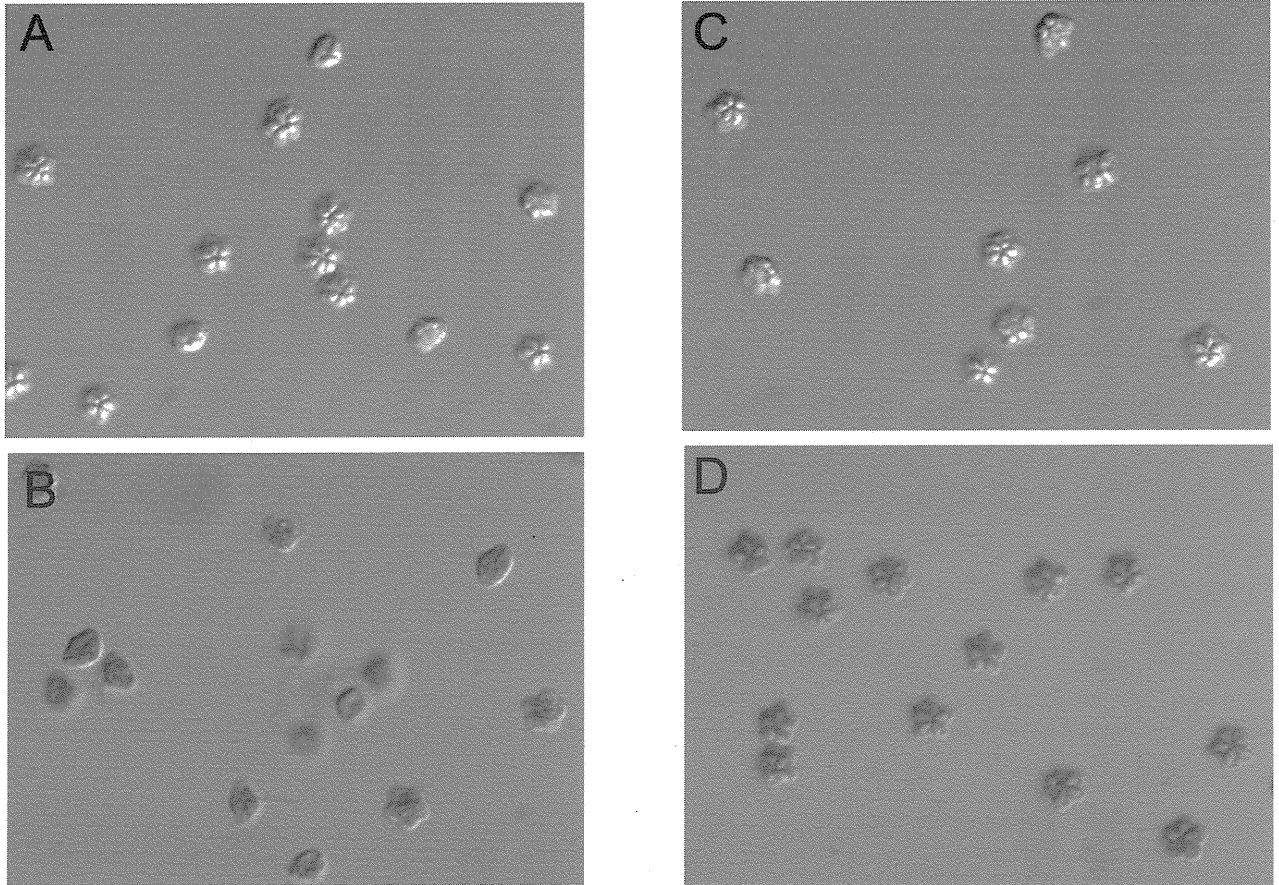
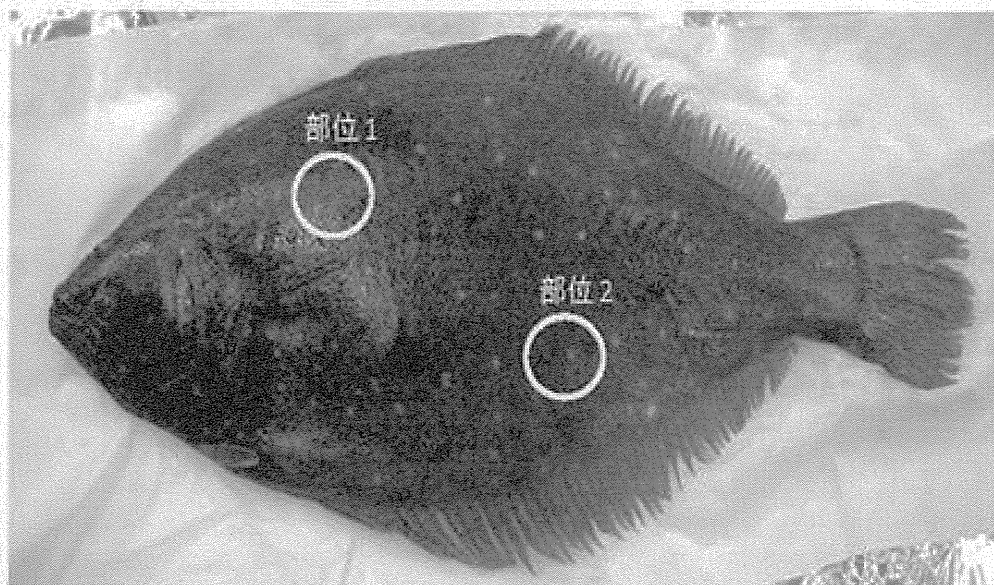


図2 *K. septempunctata* 胞子の微分干渉顕微鏡観察像

A, 無処理精製胞子; B, 凍結処理 (-30°C1日); C, pH4 処理; D, 加熱処理 (75°C5分)

有眼側



無眼側

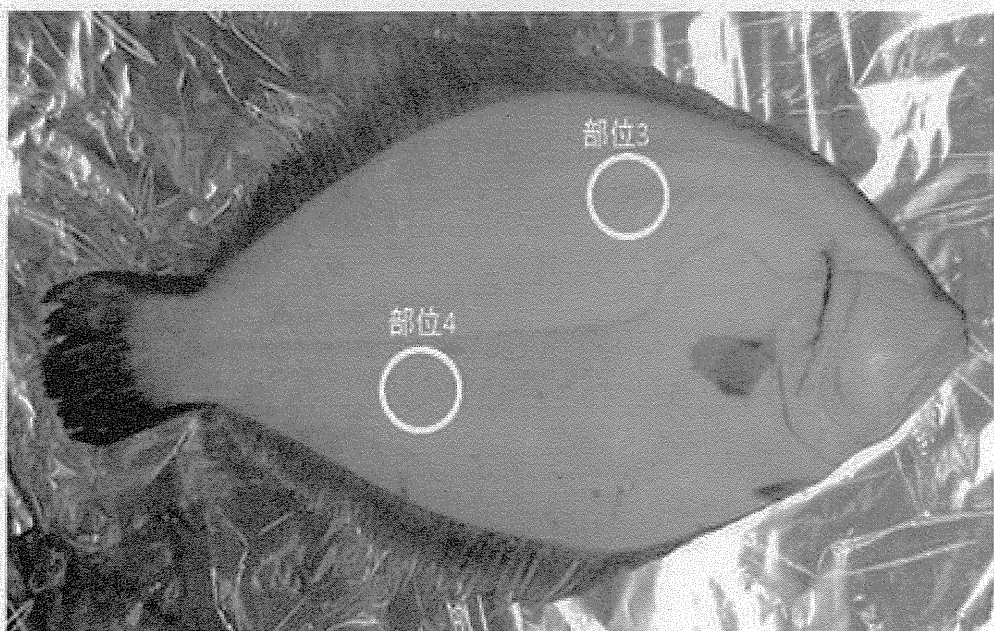
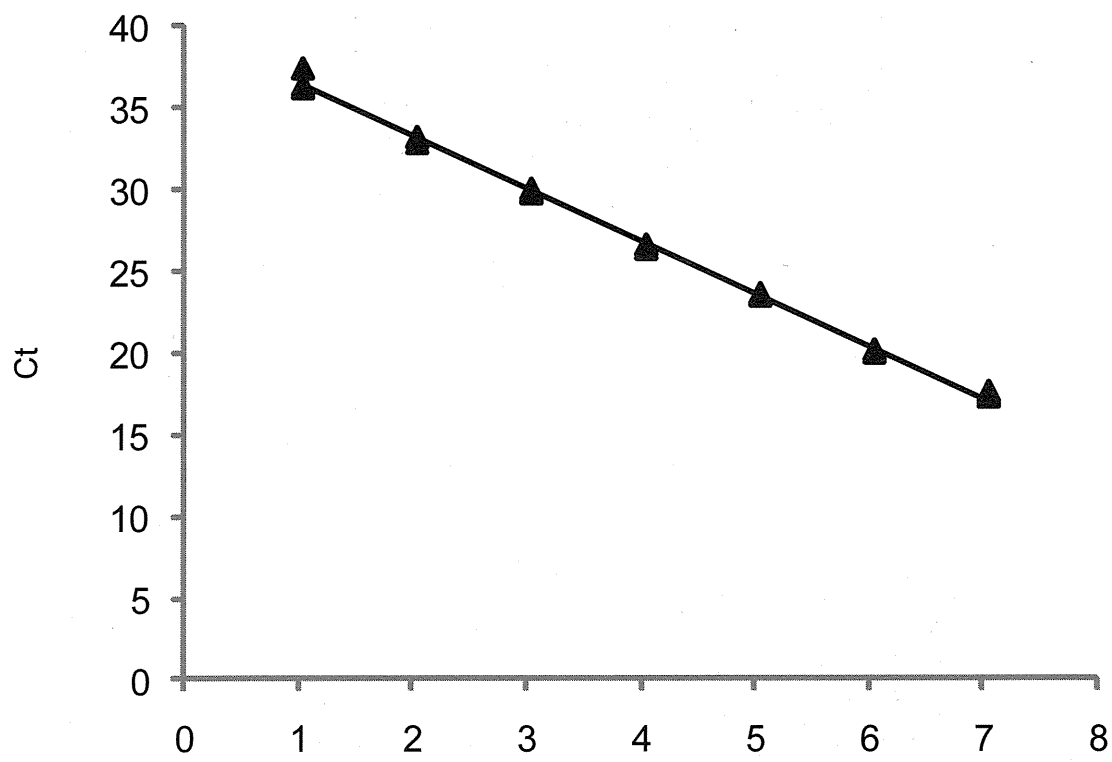


図3 検体採取部位





プラスミド DNA コピー数(log 表示)

図4 QPCR 法による検量線

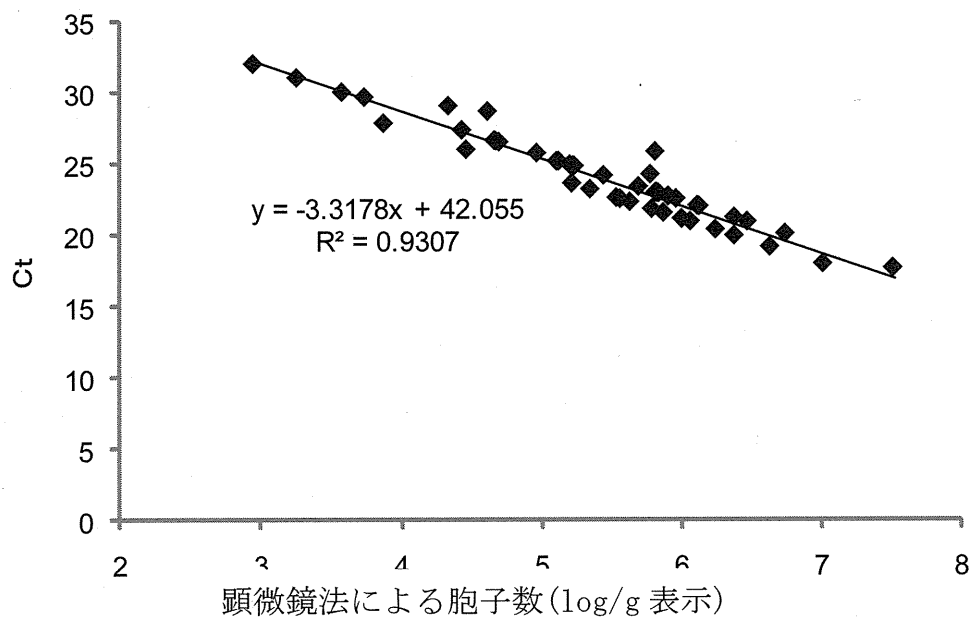


図5 顕微鏡法と QPCR 法の定量性の相関

分 担 研 究 報 告 書

生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

黒田 誠

平成 23 年度 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  
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）

#### 分担研究報告書

##### 生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属のの遺伝学的解析

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 竹内史比古（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）

ヒラメ生食による食中毒が近年増加しており、その多くでヒラメに寄生する粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が検出されている。*K. septempunctata* と食中毒の関連は疫学的には立証されているが、食中毒発症の生物学的機序は未解明である。ゲノム解読による生物の全遺伝子の一覧を作ることにより、食中毒の作用機序と関連因子の探索するうえの基盤情報となる。

*K. septempunctata* にはミトコンドリアゲノムと核ゲノムがあり、本年度はミトコンドリアゲノムを解読した。食中毒の作用機序を理解することと同時に、検査システムの充実には核ゲノムおよびミトコンドリア・ゲノム情報は欠かせない。*K. septempunctata* の全ミトコンドリア・ゲノム配列を解読した結果、最も近縁の真核生物と比べてゲノム退化していることが示唆され、5つのタンパク遺伝子と2つのリボソーム RNA 遺伝子しかなかった。*Kudoa* 属は形態的にはクラゲなどの刺胞動物に類すると想定されていたが、ミトコンドリア遺伝子配列による系統解析を行ったところ、*K. septempunctata* はより高等な生物である左右相称動物に分類されるべき系統関係であることが分かった。

本年度の成果の応用として、解読したミトコンドリア遺伝子を標的にした *K. septempunctata* の高感度かつ高精度の検出系開発のための基盤情報を得ることができた。ミトコンドリアゲノムは細胞中に大量に存在するため、18S-rRNA などの核ゲノムを対象とした検査系よりも高感度な PCR 検出が可能である。また、ミトコンドリア・ゲノムの変異導入率が高いことから、18S-rRNA よりも明確な *Kudoa* 属の分類法を確立することが可能だと思われる。他種のミトコンドリア遺伝子を同定して比較することにより、食中毒に起因する種のための検出系も開発できると考えている。