

201234020A

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24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25(2013)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 21
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タタの免疫測定法に関する研究 39
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- 食中毒患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の開発
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 55
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* 属の遺伝学的解析 77
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 89
八幡裕一郎 (国立感染症研究所 感染情報センター)

- Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定に関する研究 101
佐藤 宏 (山口大学 農学部)

- シカ肉が共通食の有症苦情事例における原因病原物質としての住肉胞子虫の
同定と、捕獲ホンドジカにおける住肉胞子虫汚染調査 125
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 147
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 159

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 24 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

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苦情事例で、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。その後の研究からヒラメを原因食材とする有症事例の原因微生物は *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が明らかになった。本研究グループでは昨年度よりこれらの食中毒の発症機序を明らかにするために研究を行っている。今年度の主な研究成果は以下のとおりである。

(1) *K. septempunctata* による食中毒

- *K. septempunctata* に感染を受けた腸管細胞が何らかのメディエーターを産生し、これが Enterochromaffin 細胞に作用しセロトニン産生を引き起こし、嘔吐につながる可能性が示唆された。
- *K. septempunctata* 胞子を乳のみマウスに投与したところ、*K. septempunctata* 胞子が腸上皮に接着・侵入している像が観察された。
- *K. septempunctata* の感染時にマクロファージより IP-10、MIP-1 β 、MIP-2、TNF- α などのサイトカインが産生されることが明らかになった。また、*K. septempunctata* は Toll-like receptor2 に認識されることが明らかになった。
- 患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法を確立した。試験方法を大阪府立公衆衛生研究所ホームページで公開している。
- 全 *K. septempunctata* を用いて家兎に対して免疫を行ったが、特異的な抗体を得られなかった。そのため、免疫原性の高い抗原を得るために、*Kudoa* 胞子の外殻の精製を試みた。
- *K. septempunctata* 2 検体と *K. neothunni* 1 検体について、次世代 DNA シーケンサを用いて配列解読を行った。*Kudoa* の種内では塩基配列の 98~99% が同一であることを明らかにした。
- *K. septempunctata* はゲノムサイズが 83 MB で 3 本の染色体から成ること明らかにした。
- ヒト腸管培養細胞との接触により、*K. septempunctata* の 17 の遺伝子グループで発現変動が観察され、heat shock protein などが経時的に増加していた。

- マグロ等他種食用海産魚が関わることで推測される食中毒様事例については、その原因種の特種が今後の課題として残されている。メジマグロ(クロマグロ)ならびにキハダマグロから分離された *Kudoa* 種について形態学的、分子遺伝学的マーカーの比較検討を行い、*K. neothunni* としての特徴づけをおこなった。

(2) *Sarcocystis fayeri* による食中毒

- 昨年度に実施した結果はリード数不足であったことから、本年度は新しい生鮮馬肉からザルコシストを得て作成したライブラリより、大量のリードを取得したところ、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。
- 特異性の高い抗体を得るため、15K タンパク抗原を大腸菌を用いたリコンビナントタのンパク質として大量作成に成功し、これを抗原として免疫抗体を作成することとした。
- シカは数が過剰となり有害獣でもある。駆除と同時にシカ肉の有効利用が特定の自治体では推奨されている。しかし、シカにも住肉胞子虫は寄生している。平成 23 年に発生したシカ肉を喫食しての有症苦情事例を分析したところ、本邦初のシカ肉喫食住肉胞子虫食中毒事例であることが確認された。
- 食用に供されている計 80 頭のシカについて住肉胞子虫の寄生状況を調査したところ、すべての個体の横隔膜肉片中に住肉胞子虫のシストを確認した。シカ肉には住肉胞子虫の危害があると判断された。

研究分担者		渡辺麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所
小西 良子	国立医薬品食品衛生研究所	吉成 知也	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	山崎 朗子	国立医薬品食品衛生研究所
野崎 智義	国立感染症研究所	古沢 博子	国立医薬品食品衛生研究所
黒田 誠	国立感染症研究所	八木田健司	国立感染症研究所
八幡裕一郎	国立感染症研究所	竹内史比古	国立感染症研究所
佐藤 宏	山口大学	関塚 剛史	国立感染症研究所
久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所	小笠原由美子	国立感染症研究所
		泉山 信司	国立感染症研究所
研究協力者		乙竹 充	(独) 水産総合研究センター
菊池 裕	国立医薬品食品衛生研究所	福田 穰	大分県農林水産研究指導センタ

一

河合 高生 大阪府公衆衛生研究所
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
青木 佳代 滋賀県衛生科学センター
石川 和彦 滋賀県衛生科学センター
林 賢一 滋賀県衛生科学センター
都築 秀明 愛知県食品衛生検査所
峰岸 恭孝 (株) ニッポンジーン
田中 秀平 山口大学

Lea Angsinco JIMENEZ Davao Oriental State
College of Science and Technology

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。ヒラメの生食による食中毒の原因微生物は *Kudoa septempunctata*、馬肉の生食による食中毒の原因微生物は *Sarcocystis fayeri* であることが知られている。*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、本研究班では昨年度より *K. septempunctata* と *S. fayeri* の発症機構を明らかにするために、以下のような研究を行っている。

- 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* による下痢および嘔吐発症機構の解析
- ② *K. septempunctata* 対する生体防御機構の解析
- ③ *K. septempunctata* の疫学的検討

- ④患者糞便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の確立
- ⑤ *K. septempunctata* のゲノム解析
- ⑥免疫学的迅速診断法確立のための抗体作製
- ⑦マグロに寄生している *Kudoa* の形態学的、遺伝学的解析
- ⑧ *S. fayeri* の基礎的なゲノム解析
- ⑨シカ肉喫食による有症苦情事例と住肉胞子虫との関係およびシカ肉における住肉胞子中の寄生状況に関する調査を行った。

B. 研究方法

1. *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、佐藤 純先生より分与いただいた。*K. septempunctata* の胞子の精製はメッシュでヒラメ筋肉と胞子を分離して、*K. septempunctata* 胞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。

2. *K. septempunctata* によるセロトニン産生性の測定

Enterochromaffin (EC) 細胞様 QGP-1 細胞を EC 細胞のモデル細胞として使用し、QGP-1 細胞におけるセロトニン産生を測定した。*K. septempunctata* が直接 EC 細胞に作用する場合、および *K. septempunctata* の感染を受けた腸管細胞が何らかのメディアータを産生し、その物質が EC 細胞を刺激

してセロトニン産生を引き起こす場合を想定して実験を行った。

3. *K. septempunctata* 感染時のマクロファージの反応の解析

マウスマクロファージ様 RAW264 細胞に *K. septempunctata* を感染させ、その時のサイトカインの産生を測定した。また、Toll-like receptor を 1 つだけ発現している HEK293 細胞を用いて、*K. septempunctata* を認識するマクロファージ上のレセプターを同定した。

4. マウス腸管の組織学的観察

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、経時的にと殺して腸管内液体貯留 (FA) 値を測定した。FA 値を測定した後の腸管を中性緩衝ホルマリンで固定した。定法に従い、腸管をパラフィン包埋し薄切した切片を抗 *K. septempunctata* 抗体を用いて免疫染色し、光学顕微鏡にて観察を行った。

5. 患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の確立

昨年度確立した定量的 *K. septempunctata* 遺伝子検出法を元に、便からの DNA 抽出に適した方法を検討した。さらに実際の患者便を用いて有用性の確立を行った。

6. *K. septempunctata* 抗体の作成

精製した *K. septempunctata* 胞子を家兎に免疫を行った。また、*K. septempunctata* 胞子外殻からの抗原の精製を試みた。

7. *kudoa* 属の遺伝学的解析

食中毒残品のヒラメ刺身片、又は養殖ヒ

ラメから *Kudoa* を抽出し、DNA を精製し、ライブラリを作成した。次世代シーケンサ GAIIX 及び MiSeq (Illumina) を用いて、DNA を配列解読した。また、制限酵素地図を作製した。さらにヒト腸管培養 Caco-2 細胞に *K. septempunctata* を接種し、この時の Caco-2 細胞の mRNA を採取し、Caco-2 細胞における遺伝子発現を経時的に測定した。

8. *K. septempunctata* の疫学的検討

2009 年 6 月から 2012 年 52 週までのデータを利用し、発生の報告の推移を検討した。発症に至る *K. septempunctata* の摂取量は 2011 年 6 月から 12 月までに発生した *K. septempunctata* に関連する食中毒事例をもとにクドアの孢子摂取量の算出を行った。

9. メジマグロ、キハダマグロに寄生する *Kudoa* の形態学および遺伝学的解析

メジマグロは食中毒残品から、キハダマグロは国内市場およびフィリピンのミンダナオ島の市場から入手した。得られた検体で *Kudoa* 孢子の形態学的観察を行った。また寄生虫の DNA を抽出し、遺伝学的解析に用いた。

10. *Sarcocystis fayeri* のゲノム解析

Sarcocystis が含まれる馬肉試料として、熊本県の馬肉生産事業者より新たに生鮮馬肉を取得した。実体顕微鏡下で *Sarcocystis* を取り出し、ゲノム解析に用いた。

11. シカ肉を原因食とする有症苦情事例に関する調査

滋賀県彦根保健所および長浜保健所の協力で、事例情報が収集された。また、患者

喫食残品が採取され、*Sarcocystis* 属および各種微生物学的検査を行った。また、野生シカにおける *Sarcocystis* 属の寄生状況を調査するために、本州で捕獲されたホンダシカ 80 検体の横隔膜部分のシスト数を計数した。

12. 既成抗体によるポリバレントによるイムノクロマトグラフィー法

昨年度作成した家兎抗シストポリクローナル抗体と、家兎抗 15KDa ポリクローナル抗体 2 種 (A, B) を用いた、ポリバレントによるイムノクロマトグラフィー法の評価を行った。

C. 研究結果

1. *K. septempunctata* による下痢および嘔吐発症機構の解析

K. septempunctata による下痢発症機構を解析するために、Enterochromaffin 細胞 (EC 細胞) 様 QGP-細胞に *K. septempunctata* 孢子を接種したところ、QGP-1 細胞はセロトニンを産生することが明らかになった。また、*K. septempunctata* 孢子を接種した Caco-2 細胞の apical 側の培養上清を QGP-1 細胞に作用させると、QGP-1 細胞における強いセロトニン産生を促進した。

また昨年度に続き *K. septempunctata* による下痢発症機構を解析した。孢子を乳のみマウスに投与し FA 値を測定したところ、FA 値は投与後 0.5 時間で上昇し始め、1.5 時間で最大となり、以後徐々に低下し、投与後 5、6 時間には投与後 0 時間の FA 値ま

で低下した。また、マウスの腸上皮に *K. septempunctata* の免疫染色像が観察された。

2. *K. septempunctata* に対する生体防御機構の解析

K. septempunctata をマウスマクロファージ RAW264 細胞に接種すると、RAW264 細胞より IP-10、MIP-1 β 、MIP-2、TNF- α などの種々のサイトカインが産生されることが明らかになった。TNF- α は *K. septempunctata* 孢子濃度に依存して産生量が増加した。また、*K. septempunctata* を認識する受容体を検索したところ、Toll-like receptor2 (TLR2) が *K. septempunctata* を認識し、転写因子 NF- κ B を活性化することが明らかになった。

3. *K. septempunctata* の疫学的検討

昨年度に引き続き *K. septempunctata* 食中毒の疫学的解析を行った。その結果、季節性は 2009 年、2011 年が 9 月にピークであり、2010 年が 8 月であったため、9 月前後がピークになる可能性が考えられた。クドアの 1g あたりの孢子数を最小値 (9.4×10^5 個/g) では 76.6g 以上の摂取でこれまでに推定した閾値 (7.2×10^7 個) 以上となったが、中央値 (1.1×10^7 個/g) 以上では閾値を超えていた。

4. 患者糞便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の確立

昨年度に確立したリアルタイム PCR 法を用い、患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法を確立した。便検体からの DNA

抽出には FastDNA SPIN Kit for soil を用い、さらに、抽出手順に変更を加えることで、より簡便で効率の高い DNA 抽出が可能となった。本試験法では $\Delta Rn=0.35$ で Ct 値 41 以下を陽性とする判定基準を設定した。ヒラメの喫食から糞便検体採取までの期間とリアルタイム PCR 法陽性率の比較を行った結果、ヒラメの喫食から 3 日以内に採取された糞便検体の陽性率は 67.7% であったのに対し、それ以上の時間を経過したものは 26.9% であった。

5. *K. septempunctata* のゲノム解析

K. septempunctata 2 検体と *Kudoa neothunni* 1 検体について、次世代 DNA シーケンサを用いて配列解読を行った。ミトコンドリアゲノムは *K. septempunctata* 種内で塩基配列の 98~99% が同一であることを明らかにした。一方で、クドアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。*K. septempunctata* については、ゲノム配列解読に加えて、光学マッピングにより全ゲノム制限酵素地図を作成した。その結果、ゲノムサイズが 83 Mb で 3 本の染色体からなることが分かった。

また、腸内での *K. septempunctata* の振る舞いを解明するために、ヒト腸管培養細胞との接触により、*K. septempunctata* の遺伝子発現がどう変化かを解析したところ、17 の遺伝子グループで発現変動が観察され、heat shock protein などが経時的に増加していた。

6. 免疫学的迅速診断法確立のための抗体作

製

全 *K. septempunctata* を用いて家兎を用いて免疫を行ったが、特異的な抗体を得られなかった。そこで胞子外殻に特異的な抗体を得るために、胞子外殻からの抗原精製を行った。その結果、Triton X 存在下で熱処理によって効率よく抽出される 25kDa 付近のタンパク質が抗原候補として有望と考えられた。SDS による処理も試みたが、Triton X と同等の結果が得られたしかしながら、抗原抗体反応には Triton X の方が影響が少ないことから、Triton X 処理を用いて現在、大量調製を行っている。

S. fayeri に対する抗体は昨年度において家兎を用いて作成して、一定の成果が得られているが、実際の馬肉を用いた評価により、特異性が比較的低いことが明らかになった。そのため、より特異性の高い抗体を得るため、15K タンパク抗原を大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として大量作成に成功し、これを抗原として免疫抗体を作成することとした。

7. マグロに寄生している *Kudoa* の形態学的、遺伝学的解析

マグロ等他種食用海産魚に関わることが推測される食中毒様事例については、その原因種の特定が今後の課題として残されている。本研究ではマグロに寄生する *Kudoa* の形態学的、分子遺伝学的マーカーの比較検討を行った。18S-28S rDNA について解析したところ、メジマグロ寄生種は単一系統であり、キハダマグロ寄生種には 2 系統が

確認され、うち 1 系統はメジマグロ寄生系統 (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. 693042) と同一の塩基配列をもっていた。今回の寄生では散発性に筋線維内にシュードシストを形成して寄生する像が見られた。今回検査したキハダマグロの 5 個体に同様のシスト形成種を確認した。

8. *S. fayeri* のゲノム解析

Sarcocystis fayeri に関して、その毒性関連因子を中心とした遺伝子情報を網羅的に得るために、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。昨年度に実施した結果はリード数不足であったことから、本年度は新しい生鮮馬肉から *Sarcocyst* を得て作成したライブラリより、Illumina HiSeq2000 シーケンサーを用いて大量のリードを取得した。その結果、近縁の *S. neurona* の 124Mbase に対して、同等のデータ量が取得できた。カバレッジは 50 倍あり、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されており、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。

9. シカ肉喫食による有症苦情事例と住肉胞子虫の関係およびシカ肉における住肉胞子虫の寄生状況に関する調査

平成 23 年に発生したシカ肉を喫食しての有症苦情事例を分析した。食中毒細菌およびウイルス検査を実施したが、病原体は

特定できなかった。そこで、患者喫食シカ肉内の住肉孢子虫の検査を行ったところ、遺伝子検査陽性、顕微鏡検査陽性だった。組織標本を作製し、抗毒性タンパク質で免疫染色を行ったところ、同タンパク質の局在が確認された。患者喫食シカ肉は、エゾシカ肉で冷蔵流通されていた。本事例を、住肉孢子虫を含んだ冷蔵シカ肉が原因の苦情事例と診断した。当該シカ肉には9～25シスト/cm²の寄生が見られた。このシカ肉喫食住肉孢子虫食中毒事例は、本邦初の報告となる。

シカは数が過剰となり有害獣でもある。駆除と同時にシカ肉の有効利用が特定の自治体では推奨されている。本州の2地域で捕獲され、食用に供されているシカについて、住肉孢子虫の寄生状況を調査した。50頭および30頭の検査を行ったが、すべての個体の横隔膜肉片中に、住肉孢子虫のシストを確認した。シスト数を計測したところ、2～90シスト/cm²を示した。事例の馬肉や上記シカ肉中のシスト数を上回る個体があり、シカ肉には住肉孢子虫の危害があると判断された。

D. 考察

1. *K. septempunctata* による下痢および嘔吐発症機構の解析

昨年度は *K. septempunctata* の下痢発症機構について研究を行い、*K. septempunctata* の孢子原形質の腸管細胞層への侵入が下痢発症機構のひとつであること

を明らかにした。今年度は *K. septempunctata* の嘔吐発症機構について研究を行った。嘔吐発症にはいくつかの機構が知られているが、最も一般的なものは腸における EC 細胞が刺激を受けてセロトニンを産生し、そのセロトニンによって脳の嘔吐中枢が活性化されるというものである。今回の結果から *K. septempunctata* の嘔吐発症機構を考察すると、*K. septempunctata* 孢子が腸管に達すると、腸管に存在する EC 細胞に虫体成分が認識され、セロトニンが産生される直接的な機構と、*K. septempunctata* 孢子もしくは孢子原形質の感染を受けた腸管上皮細胞が何らかのメディエータを産生し、このメディエータによって EC 細胞が活性化されセロトニンの産生が引き起こされる間接的な機構とが存在することが示唆された。

また昨年度に引き続き下痢発症機構の解析を行っているが、今回の結果から生きた *K. septempunctata* 孢子が腸上皮に接着・侵入すると考えられた。また、腸管組織には顕著な炎症像は観察されず、この孢子の腸上皮への接着・侵入が FA 活性を惹起する可能性が考えられた。

2. *K. septempunctata* 対する生体防御機構の解析

K. septempunctata 感染時の生体の免疫応答についてはほとんど明らかになっていない。今年度はマクロファージにおけるサイトカイン産生について検討を行った。今回の結果から、*K. septempunctata* の刺激

を受けた RAW264 細胞は IP-10、MIP-1 β 、MIP-2、TNF- α を産生することが明らかになった。IP-10 は単球、T 細胞、NK 細胞、樹状細胞の遊走に関与している⁵⁾。MIP-1 β は顆粒球を活性化し、炎症性サイトカインの放出を誘導する。MIP-2 は多核白血球の遊走を引き起こす。*K. septempunctata* 刺激によって産生されるこれらのサイトカインはいずれも初期免疫応答において非常に重要なものである。よってこれらのサイトカインは *K. septempunctata* 感染に対する生体防御に関与している可能性が示唆された。

マクロファージは種々の TLRs を発現している。TLRs は微生物間で保存されているモチーフを認識し、微生物の侵入を感知する役目を果たしている。今回の結果から *K. septempunctata* は TLR2 に認識され、転写因子 NF- κ B が活性化されることが明らかになった。TLR2 を介してのマクロファージの活性化は NF- κ B の働きによって TNF- α の産生につながることを知られている。今回の我々の結果でも *K. septempunctata* 刺激によって、TNF- α が産生されることが明らかになった。これらの結果はマクロファージ上の TLR2 によって *K. septempunctata* が認識され、TLR2 の情報伝達系によって NF- κ B が活性化され、TNF- α の産生が引き起こされていることを示唆している。今後、TLR2 が *K. septempunctata* のどの成分を認識しているかを明らかにするとともに、TNF- α 産生を含む自然免疫と *K. septempunctata* の生体からの排除についての

関係を明らかにしていきたい。

3. *K. septempunctata* の疫学的検討

クドアが寄生したヒラメの流通は 2009 年 6 月から 2012 年 12 月までのクドアが寄生したヒラメに関連する食中毒発生報告件数は 2009 年及び 2011 年が 9 月にピークであり、2010 年が 8 月にピークであった。クドアに汚染されたヒラメは 9 月を中心にピークとなり流通している可能性が考えられた。従って、季節性がある可能性が示唆された。一方で、2012 年は 6 月に発出された通知により、報告されたクドアが寄生したヒラメに関連する食中毒の発生報告方法が通知の発出以前と通知の発出以降で異なっている可能性があると考えられ、2012 年の食中毒発生報告件数が 6 月にピークとなった原因の可能性が考えられた。

食中毒事例ごとのヒラメの摂取量とクドアの孢子数にもとづいて相関係数を算出したが、有意な相関はなかった。また、閾値を超えるクドアの摂取量はヒラメがクドアに汚染された最小値では 76.6g 以上の喫食であったため、ヒラメに寄生するクドアの孢子数に依存することが示唆された。

4. 患者糞便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の確立

K. septempunctata 感染の有無を示すことが食中毒診断に重要となる。しかし、ヒラメは生食用として提供されるために食中毒検査の段階ですべて消費されていることが多く、喫食残品のヒラメを入手できない事例が多い。この場合、他の食中毒検査と

同様に患者便からの検査が要求されるが、これまでに有効な糞便からの *K. septempunctata* 試験法は報告されていなかった。今回の検討では、昨年度確立した *K. septempunctata* 種特異的リアルタイムPCR法が患者便の検査にも有用であることが確認された。ヒラメ喫食から糞便検体採取までの期間と陽性率の関連性については、患者に経口摂取された大量の *K. septempunctata* 胞子が数日間にわたり糞便とともに排泄されるため、検体採取までの期間が短いほど陽性率が高くなると考えられる。

5. *K. septempunctata* のゲノム解析

ミトコンドリアゲノムについては、配列解読を完了し、*K. septempunctata* の種内および *Kudoa* の種間の比較を行った。*K. septempunctata* の種内でも配列に多様性があるために、検出系を作るときには注意が必要である。例えば、PCR判定については、塩基配列が保存されている領域にプライマを作る必要がある。一方で、種内の違いを利用して産地の区別ができれば、疫学解析にも応用できる。光学マッピングを用いて *K. septempunctata* の制限酵素地図を決定した結果、ゲノムサイズ 83mb で3本の染色体からなることが分かった。次世代シーケンサ解読によるゲノムのドラフト配列は、重複配列を除けば合計 83mb であり、ゲノムサイズについては同じ結果になっている。今年度決定した制限酵素地図は一倍体としてのものであるが、正確には相同染色

体同士が部分的に異なる二倍体であることが推測されるため、二倍体としてのアセンブルを来年度初めに行う。*K. septempunctata* と同様にミクソゾアに属する *Zschokkella nova* については、3対で合計6本の染色体があることが報告されており [Tyutyaev (2008) Tsitologiya 50:907; ロシア語]、染色体の数としては本研究と合致している。来年度は、制限酵素地図を利用して、*K. septempunctata* のゲノム配列を決定する予定である。

ヒト腸管培養細胞と接触した *K. septempunctata* の遺伝子発現解析を行ったところ、17の遺伝子グループで発現変動が観察できた。heat shock protein が経時的に増加しており、外部からの刺激に対する *K. septempunctata* の防御と解釈できる。一方で、他の遺伝子グループについては、配列からは機能が明確には推定できなかった。また、タンパク分解酵素は見当たらなかった。

発現変動を示した遺伝子の殆どが機能未知であった。*Kudoa* は培養さえもできない生物であるため、遺伝子の機能解析は難しい。しかし、食中毒の原因を探るという目的であれば、見つかった候補遺伝子について、タンパク質産生を質量分析などで確認し、さらに組換えタンパク質を作成して Caco-2 あるいはマウスに対する病原性を検討することも可能である。

6. 免疫学的迅速診断法確立のための抗体作製

ヒラメ組織中から回収された *K. septempunctata* を虫体のままホルマリン固定した抗原を用いて作製した抗血清は、*K. septempunctata* に対する特異抗体価を示さなかった。この結果は抗血清中の IgG の精製や凝集試験に用いる抗原の物理的破砕によっても変わらなかった。その理由として、凝集試験において *K. septempunctata* 虫体に存在するタンパク質のエピトープを IgG が認識できなかったこと、または抗体作製時において免疫抗原として用いた *K. septempunctata* の虫体容積が大きすぎたため、ウサギの免疫細胞が抗原として認識できず抗体産生が効率的に行われなかったこと等が考えられる。改善策としては、*K. septempunctata* が特異的に保有していると考えられるタンパク質を精製して免疫抗原として用いることで、より効率的な免疫動物体内の免疫細胞による抗原認識および抗体産生細胞による特異抗体産生が期待できると考えられた。

S. fayeri に対する抗体は昨年度において家兎を用いて作成して、一定の成果が得られているが、実際の馬肉を用いた評価により、特異性が比較的低いことが明らかになった。その原因として、使用したポリクローナル抗体の特異性のばらつきが考えられた。今後安定した検査結果を得るため、15kDa に対するモノクローナル抗体を作成することとした。免疫源に用いる 15kDa タンパクは、大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質として大量作成に成功している

ことから来年度免疫抗体を作成することとした。

7. マグロに寄生している *Kudoa* の形態学的、遺伝学的解析

今回の結果からキハダマグロでは2種が同一個体に感染していることもあることが明らかになった。よって、肉眼・顕微鏡検査を並行しない検査法では原因種確定の上で混乱を招く可能性がある。また、今回検出されたような4つの極嚢/殻片をもつ *Kudoa* 種は各種海産魚から種記載が最近増えつつあり、類縁種の鑑別においても精査が必要となってきた。生鮮魚介類を共通食とする原因不明食中毒の発症機構を明らかにする上で、原因食とその病原体の理解も対策立案上必要となることから、病原体の種もしくは系統の把握、それに適した種・系統マーカーの解明には今後とも取り組みが必要である。

8. *S. fayeri* のゲノム解析

新しい生鮮馬肉から Sarcocyst を得て新しくライブラリを作成した。次世代シーケンサーによりリードデータを取得し、MiSeq からは 1060 万リード、1.59Gbase、HiSeq からは 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。カバレッジは 50 倍あり、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されており、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma* の Apicoplast に相同性の高い配列が含まれていた。今後

は、ギャップクロージングとアノテーションが課題と考えられた。

9. シカ肉喫食による有症苦情事例と住肉孢子虫の関係およびシカ肉における住肉孢子虫中の寄生状況に関する調査

今回、潜伏期間が短く（約5～15時間）、症状も一過性の下痢や嘔吐で、馬刺しと同様の食中毒症状を呈していたことから、原材料のエゾシカ肉の残品について *Sarcocystis* 属の検査を実施したところ *Sarcocystis* 属が確認された。*S. fayeri* の15kDa タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の反応から本事例のシカ肉中の *Sarcocystis* 属にも病原性を担っている15kDa タンパク質があることが示唆された。本州における2地域の、50および30頭のシカの横隔膜肉片について、住肉孢子虫を検査したところ、2地域の合計80頭すべてに住肉孢子虫のシストを確認した。地域を隔てても、全個体にシストを認めている事実は、本州において、シカと未同定の野生肉食動物との間に、住肉孢子虫の生活環が確立していることが示唆された。

E. 結論

今回の結果から *K. septempunctata* による嘔吐発症機構の一部が明らかになった。*K. septempunctata* 食中毒への効果的な対策を講じるためには、発症機序を明らかにすることが不可欠である。次年度も継続して *K. septempunctata* による食中毒発症機構の解明に取り組んでいきたい。

今回の結果から *K. septempunctata* が感染するとマクロファージから種々のサイトカインが分泌されることが明らかになった。これらのサイトカインは *K. septempunctata* の生体からの排除に関与している可能性がある。今回の結果から、喫食後、数日間は患者便中から *K. septempunctata* 遺伝子が検出されることが明らかになっている。このような *K. septempunctata* の排除がどのような機構によって起こるのか、今後、研究を継続したい。

高級食材であるためヒラメは食中毒が発生しても残品が手に入らない場合が多い。そのため、患者便からの *K. septempunctata* 検出法の開発が以前より望まれていた。そこで、患者便からの検査法を確立した。*K. septempunctata* 試験法については、大阪府立公衆衛生研究所ホームページに掲載している。今後、本検査法を活用することによって、*K. septempunctata* 食中毒の詳細が明らかになることを期待したい。

ヒラメ以外の魚種による原因物質不明の有症苦情事例の報告が増加している。現時点で *K. septempunctata* 以外の粘液孢子虫が原因微生物として確認された事例はまだないが、有症苦情事例の報告の多い魚種に関しては、寄生している粘液孢子虫の分類、病原性などを詳細に検討していく必要性が認められた。

K. septempunctata および *S. fayeri* のゲノム解析は初年度より取り組んでいる課題である。本年度も継続して取り組んでお

り、来年度には全ゲノム解析を終了させる予定である。これによって、これらの寄生虫の病原性を解析する際に、遺伝学的な方向からアプローチできるようになるものと考えられる。

今回の結果からシカ肉の喫食による有症苦情事例に住肉胞子虫が原因微生物として関与している可能性が示唆された。シカは多くの自治体で駆除の対象となっており、駆除されたシカを食肉として有効利用しようとする動きが強まってきている。また、今回の結果からシカにおける住肉胞子虫の寄生率は高率であることが明らかになった。おそらく、シカ肉の場合も馬肉の場合と同様に加熱や冷凍処理することによって、食中毒の発生を防げるものと考えられる。産地に対して予防法を積極的に啓蒙していく必要性が認められた。

F. 研究発表

論文発表

1. Iijima, Y., Nakanishi, N., Furusawa, H., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y.: Inter-Laboratory Validation and Applications of Quantitative Real-Time PCR for the Detection of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Jpn. J. Infect. Dis., 65, 436-438, (2012)
2. 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. Parasitol. Res., 111, 819-826, (2012)
3. Li Y-L, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Muyltivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol Res., 112: 1991-2003, (2013)
4. Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Kumeda, Y.: Detection of *Kudoa septempunctata* 18S ribosomal DNA in patient fecal samples from novel food-borne outbreaks caused by consumption of raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Clin. Microbiol., 50, 2964-2968, (2012)
5. Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. Foodborne. Pathog. Dis., 10, 137-142, (2013)
6. 大西 貴弘: 食中毒原因物質としての”クドア”に関する最新の知見, モダン

- メディア, 58, 205-209, (2012)
7. 青木佳代, 石川和彦, 林 賢一, 新井陽子, 斎藤守弘, 鎌田洋一, 小西良子: シカ肉の *Sarcosystis* が原因として疑われた有症苦情の事例について, 日本食品微生物学雑誌, 30, 28-32, (2013)
 8. 鎌田洋一: 寄生虫毒素性食中毒一馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* の構成タンパク質が食中毒を誘発する一, 日本獣医師会雑誌, 65, 705-710, (2012)
 9. 鎌田洋一: ザルコシステイスが含まれる馬肉による食中毒, 日本食品微生物学雑誌, 29, 47-52, (2012)
 10. 佐藤 宏: 連載「動物病理学の今」第5回 最近話題の人獣共通寄生虫病, 病理と臨床, 30(8), 2-6, (2012)
 11. 佐藤 宏: 随伴侵入生物としての脊椎動物寄生蠕虫, 地球環境 17(2), 183-192, (2012)
 12. 大西 真, 黒田 誠, 八幡 裕一郎: ゲノムから見た感染症 網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索, NEUROINFECTION, 17(1), 35-41, (2012)
- 学会・講演・シンポジウム
1. Ohnishi, T., Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* causes the novel food-poisoning outbreaks in Japan by consumption of olive flounder in raw. IAFP European Symposium, Poland (2012.5)
 2. Sugita-Konishi, Y., Irikura, D., Saito, M., Yahata, Y., Kamata, Y.: Parasite toxin of *Sarcocystis* in raw horse meat causes a new food borne disease. IAFP European Symposium, Poland (2012.5)
 3. Yahata, Y., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Toyokawa, T., Nakamura, N., Taniguchi, K., Okabe, N.: *Kudoa septempunctata* caused outbreak in humans with raw flounder ingestion. IMED 2013, Viena, Austria, 15-18 February, (2013)
 4. 大西貴弘: クドア検査法, 衛生微生物技術協議会 第33回研究会, 横浜市 (2012.6)
 5. 大西貴弘: クドアセプテンプクタタによる新しい食中毒, 第44回東海北陸ブロック食品衛生監視員研修会, 名古屋市 (2012.8)
 6. 大西貴弘: クドアセプテンプクタタを原因とする新しい食中毒, 第61回九州地区獣医師大会・獣医学術九州地区学会, 宮崎市 (2012.10)
 7. 李迎春, 佐藤宏, 鎌田洋一, 大西貴弘, 小西良子: 日本近海産クロダイとイシガキダイにみられた *Henneguya* 属-*Myxobolus* 属粘液胞子虫3種について, 第154回日本獣医学会学術集会, 盛岡

- 市 (2012.9)
8. 佐藤宏, 李迎春, Lea A. Jimene, 都築秀明, 大西貴弘, 小西良子: 日本国内で消費されるマグロに寄生する *Kudoa neothunni* の 2 系統について, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 盛岡市 (2012.9)
 9. 原田哲也, 河合高生, 陳内理生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子: 食中毒患者糞便からのナナホシクドア試験法, 第 33 回食品微生物学会学術総会, 福岡県 (2012.10)
 10. 河合高生, 原田哲也, 陳内理生, 菊池裕, 大西貴弘, 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 (3), 第 33 回食品微生物学会学術総会, 福岡県 (2012.10)
 11. 大西貴弘: クドアセプテンpunkタタによる食中毒について, 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術講演会, 大阪市 (2013.2)
 12. 大西貴弘: クドアセプテンpunkタタを原因とする食中毒について, 平成 24 年度大分県食品衛生監視員・と畜食鳥検査員・狂犬病予防員研究発表会, 大分市 (2013.2)
 13. 大西貴弘: クドアセプテンpunkタタとザルコシスティスによる新しい食中毒, 徳島県公衆衛生獣医師協議会, 徳島市 (2013.2)
 14. 大西貴弘: クドアを原因とする食中毒について, 平成 25 年度日本魚病学会春季大会, 藤沢市 (2013.3)
 15. 大西貴弘: クドアを原因微生物とする新しい寄生虫性食中毒, 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉市 (2013.3)
 16. 鎌田洋一: ザルコシスティスが含まれる食中毒, 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 大阪市 (2013.2)
 17. 鎌田洋一, 入倉大祐, 斉藤守弘, 大西貴弘, 小西良子: 馬肉食中毒の原因寄生虫であるフェイヤー住肉胞子虫の病原性タンパク質の性状, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 盛岡市 (2012.9)
 18. 鎌田洋一, 入倉大祐, 斉藤守弘, 小西良子: 馬肉ザルコシスティス食中毒の病因毒素タンパク質の同定と性状解析, 第 103 回日本食品衛生学会, 東京 (2012.5)
 19. 原田哲也. クドア検出法の開発と食中毒事例への応用, 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 大阪市 (2013.2)
 20. 竹内史比古, 関塚剛史, 野崎智義, 大西真, 小西良子, 大西貴弘, 黒田誠: ナナホシクドアの退化したミトコンドリアゲノムが明らかにする、ミクソゾアの左右相称動物起源, 日本進化学会第 14 回東京大会, 東京 (2012.8)
 21. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食中毒, 公益法人愛知県獣医師会公衆衛生部会学術勉強会, 愛知県蒲郡市 (2012.8)
 22. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食品-粘液胞

子虫，住肉胞子虫，アニサキスを中心としてー，岡崎市保健所開設 10 周年記念事業(食品衛生月間)特別講演会，愛知県岡崎市 (2012. 8)

23. 佐藤 宏：生鮮海産魚の生食を原因とするクドア食中毒，平成 24 年度獣医学術学会北海道地区学会シンポジウム，江別市 (2012. 9)

24. 佐藤 宏：生活環境と寄生虫症，山口県獣医師会平成 24 年度公衆衛生講習会，山口市 (2012. 11)

25. 佐藤 宏：身近な寄生虫と食品-粘液胞子虫，住肉胞子虫，アニサキスを中心としてー，岐阜市保健所：食の安全に関する講演会，岐阜市(2012. 11)

26. 八木田健司，内田雄治：国産重種馬肉における *Sarcocystis fayeri* 汚染実態調査，第 82 回日本寄生虫学会大会，東京 (2013. 3)

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