

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

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

#### *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）

*K. septempunctata* による嘔吐発症機序の基礎的な解析およびマクロファージの *K. septempunctata* に対する応答を解析した。Enterochromaffin 細胞（EC 細胞）様 QGP-細胞に *K. septempunctata* 胞子を接種すると、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* 胞子を接種したヒト腸管培養 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。以上のことから、*K. septempunctata* は直接 EC 細胞を刺激しセロトニン産生を促進させるだけでなく、*K. septempunctata* に刺激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 EC 細胞に作用しセロトニン産生を引き起こす可能性が示唆された。このような *K. septempunctata* によって引き起こされるセロトニン産生が嘔吐の発症につながるのではないかと考えている。*K. septempunctata* に対するマクロファージの応答について検討したところ、*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 $\beta$ 、MIP-2、TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  は *K. septempunctata* 胞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- $\kappa$ B を活性化することが明らかになった。これらのことから、*K. septempunctata* はマクロファージ上の TLR2 を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、TNF- $\alpha$  産生を引き起こすのではないかと考えられた。

#### A. 研究目的

*Kudoa septempunctata* はヒラメを生食した時に発生する原因不明食中毒の原因微生物として同定された新種の寄生虫である<sup>1)</sup>。この食中毒は一過性ではあるが強い下痢や嘔吐をおもな症状とする。我々のこれまで

の研究から、*K. septempunctata* 胞子が経口的にヒトに取り込まれ腸管に達すると、胞子より胞子原形質と呼ばれるアメーバ状の細胞が放出されることが明らかになった<sup>2)</sup>。この胞子原形質は腸管上皮細胞層に侵入し、大きな傷害を与える。これによって腸管上皮細胞層の透過性が著しく亢進す

る<sup>2)</sup>。この孢子原形質による腸管上皮細胞層の透過性亢進が、*K. septempunctata* による下痢発症機序のひとつとして考えられている<sup>2)</sup>。一方、*K. septempunctata* による嘔吐発症メカニズムに関しては、これまでのところ報告はない。一般的に最もよく知られている嘔吐発症機序は、異物が腸管にある Enterochromaffin 細胞 (EC 細胞) を直接あるいは間接的に刺激するというものである。刺激を受けた EC 細胞はセロトニンを産生し、このセロトニンが求心性迷走神経を刺激し、最終的に脳の嘔吐中枢が活性化される。本研究では *K. septempunctata* による嘔吐発症機序の基礎的検討として、EC 細胞におけるセロトニンの産生をクドアが誘導するか検討した。

*K. septempunctata* はヒトの腸管細胞に侵入した後、速やかに死滅し、長期間生存することはないと考えられている。ヒトからの *K. septempunctata* 排除機構についてはこれまでに議論されてきている。ひとつの仮説として、*K. septempunctata* が寄生するヒラメの浸透圧、つまり海水の浸透圧とヒト体内の浸透圧の違いのため、ヒトの腸管では長期間、生存できないのではないかと考えられている。また一方で、ヒトの免疫系が働いて、*K. septempunctata* が排除されるのではないかとの説がある。そこで本研究では *K. septempunctata* に対するヒトの免疫応答、特にマクロファージの反応に着目して研究を行った。

## B. 研究方法

### 1. ヒラメ筋肉中からの *K. septempunctata* 孢子の精製

*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、佐藤 純先生より分与いただいた。孢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  $\mu$ m 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  $\mu$ 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、室温で 1 時間振盪した。その後、もう一度 100  $\mu$ m 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孢子が含まれているため、クドア孢子は 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孢子 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孢子が含まれているので PBS に浮遊させた (精製クドア)。

## 2. 細胞

ヒト腸管 Caco-2 細胞は 10% 牛胎児血清 (FCS)、1% NonEssentialAminoAcid (GIBCO) および抗生物質 (100U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g ストレプトマイシン) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で継代維持した。マウスマクロファージ RAW264 細胞は 10% FCS および抗生物質を添加した DMEM で維持した。ヒト膵臓内分泌細胞 QGP-1 およびマウス繊維芽細胞 L929 は 10% FCS および抗生物質を添加した RPMI1640 で維持した。マウス由来の Toll like Receptors を 1 種類 (TLR2、TLR3、TLR4+MD-2+CD14、TLR5、TLR7、TLR8、TLR9 のいずれか) と NF- $\kappa$  依存性 SEAP reporter gene を発現している HEK 293 細胞は Invivogen (San Diego, CA) から購入した。HEK 293 細胞の維持は 10% FCS、10  $\mu$ g/ml blasticidin、500  $\mu$ g/ml G418、抗生物質を含む DMEM で維持した。すべての細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。Caco-2 細胞の分化を誘導する場合は Biocoat Cell Culture Inserts (BD Biosciences) 内に 2  $\times$  10<sup>5</sup> 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 時間培養した。翌日も同様に培地を交換し、さらに 24 時間培養し Caco-2 細胞の分化を誘導した。

### 3. QGP-1 細胞によるセロトニン産生量の測定

QGP-1 細胞を 24-well 細胞培養プレートに 2  $\times$  10<sup>5</sup>/well で播種した。37°C で 72 時間培養後、0.1% BSA と 2  $\mu$ M fluoxetine を含む HBSS で洗浄した。その後、披験物質を含む 0.25 ml HBSS を well に加え、細胞を 2 時間培養した。上清を回収し、セロトニン測定に使用するまで -80°C で保存した。セロトニン量は Serotonin EIA kit (Enzo Life Sciences, Inc, NY) で測定した。

### 4. サイトカインの検出

RAW264 細胞 (4  $\times$  10<sup>5</sup> cells/well) を 24-well 細胞培養用プレートに播種し、37°C、24 時間培養した。培養後、*K. septempunctata* 孢子 (1  $\times$  10<sup>6</sup> spores) を加え、37°C、24 時間培養した。培養上清を 2000 rpm で 5 分、遠心処理した後、上清を回収し、実験に使用するまで -20°C で保存した。上清中のサイトカインは Mouse cytokine array panel A (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) を用いて検出した。また、上清中の TNF- $\alpha$  量は Quantikine mouse TNF- $\alpha$  ELISA kit (R&D Systems, Inc.) を用いて測定した。

### 5. L929 細胞に対する細胞毒性の測定

10% FCS を含む RPMI1640 に 5  $\times$  10<sup>5</sup> cell/ml になるように L929 細胞を浮遊させ、この浮遊液を 96-well 細胞培養プレート 1 well につき 100  $\mu$ l 加えた。37°C、3.5 時間培養後、披験物質 50  $\mu$ l とアクチノマイシン D (4  $\mu$ g/ml in RPMI1640) 50  $\mu$ l を加え、さらに 37°C、18 時間培養した。培養後、細胞をクリスタルバイオレットで染色した。細胞を 0.1% SDS で可溶化した後、分光光

度計 (540nm) で測定した。

## 6. *K. septempunctata* 認識 Toll-like receptor の探索

TLR 発現 HEK293 細胞を HEK-Blue Detection medium (Invivogen) に  $2.8 \times 10^5$ /ml になるように浮遊させた。この細胞浮遊液 180  $\mu$ l と *K. septempunctata* 孢子 ( $1 \times 10^7$  spores/ml) を混合した。この細胞浮遊液を 96-well 細胞培養プレートの 1 well に播種し、37°C、18 時間培養した。培養後、マイクロプレートリーダー (650 nm) で吸光度を測定した。

## C. 研究結果

### 1. *K. septempunctata* による嘔吐発症機序の解析

EC 細胞の株化細胞はまだ作出されていないため、初代培養を行う必要がある。そのため今回の実験では、ヒト膵臓内分泌細胞由来の QGP-1 細胞を EC 細胞のモデル細胞として使用した。QGP-1 細胞は EC 細胞と共通のマーカーを多く発現しており、刺激によりセロトニンを産生することができる<sup>3)</sup>。EC 細胞は Acrolein の刺激によりセロトニンを産生することが報告されているため、QGP-1 細胞が EC 細胞同様にセロトニンを産生することができるかどうかを確認した (図 1)。その結果、QGP-1 細胞は Acrolein 濃度依存的にセロトニンを産生することが明らかになった。そこで *K. septempunctata* の QGP-1 細胞への刺激能を検討するために、QGP-1 細胞に *K. septempunctata* 孢子 ( $5 \times$

$10^5$  spores/well) もしくは超音波破碎した *K. septempunctata* 孢子 ( $5 \times 10^5$  spores/well 相当) を接種した (図 2)。その結果、孢子を接種した場合、超音波破碎した孢子を接種した場合、いずれの場合も QGP-1 細胞はセロトニンを産生した (図 2)。

次に *K. septempunctata* の感染を受けた細胞がメディエーターを放出し、その働きによって間接的に QGP-1 細胞が刺激を受ける場合を想定して実験を行った。まず、Caco-2 細胞に *K. septempunctata* 孢子を ( $5 \times 10^5$  spores/well) 接種し、37°C、2 時間培養した。Apical 側、Basolateral 側それぞれの培養上清を回収し、その培養上清を QGP-1 細胞に接種し、2 時間後のセロトニン産生を測定した (図 3)。その結果、*K. septempunctata* 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 細胞がセロトニンを産生することが明らかになった (図 3)。

### 2. *K. septempunctata* に対するマクロファージの反応

*K. septempunctata* に対するマクロファージの反応を調べるために、*K. septempunctata* を接種した RAW264 細胞の培養上清に含まれるサイトカインを Mouse cytokine array で検出した (図 4)。その結果、IP-10、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、TNF- $\alpha$  が RAW264 細胞より産生されることが明らかになった (図 4)。これらのサイトカインの内、TNF- $\alpha$  に注目し、さらに研究を進めた。まず、*K. septempunctata* 刺激を受けたマクロフ

マクロファージの培養上清が持つ L929 細胞に対する細胞毒性を測定した (図 5)。その結果、 $10^3 \sim 10^4$  spores/well では L929 細胞に対する細胞毒性は確認できなかったが、 $10^5 \sim 10^6$  spores/well では強い細胞毒性が検出された (図 5)。L929 細胞は TNF- $\alpha$  に対して感受性であるため、RAW264 細胞の培養上清中に含まれる TNF- $\alpha$  の量を ELISA で測定したところ、 $10^5$  spores/well 以上の孢子数で TNF- $\alpha$  が産生された (図 6)。

マクロファージは多くの Toll-like receptors (TLRs) を発現している。TLRs は寄生虫をはじめとする多くの微生物の認識に参与している<sup>4)</sup>。そこで、*K. septempunctata* は RAW264 細胞に TLRs を介して認識されているかどうかを検討した (図 7)。その結果、TLR2 を発現している HEK293 細胞に *K. septempunctata* 孢子の超音波破砕物を接種すると、NF- $\kappa$ B 依存性のレポーター遺伝子が活性化されることが明らかになった (図 7)。

## 考察

昨年度は *K. septempunctata* の下痢発症機序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序のひとつであることを明らかにした。今年度は *K. septempunctata* の嘔吐発症機序について研究を行った。嘔吐発症にはいくつかの機序が知られているが、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。

そこで *K. septempunctata* による EC 細胞におけるセロトニン産生について検討を行った。今回の結果では *K. septempunctata* 孢子を QGP-1 細胞に接種すると、QGP-1 細胞におけるセロトニン産生を引き起こした。

このことから QGP-1 細胞は *K. septempunctata* を何らかの方法で認識できることが示唆された。そこで、*K. septempunctata* 孢子の超音波破砕物を QGP-1 細胞に接種したところ、セロトニンが産生されたため、QGP-1 細胞は *K. septempunctata* の虫体成分を認識している可能性が示唆された。また、*K. septempunctata* を接種した Caco-2 細胞の培養上清を QGP-1 細胞に作用させても、QGP-1 細胞におけるセロトニン産生が観察されたことから、*K. septempunctata* 感染時に Caco-2 細胞が QGP-1 細胞を刺激する何らかのメディエーターを産生している可能性が示唆された。

以上、今回の結果から *K. septempunctata* の嘔吐発症機序を考察すると、*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序と、*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ーを産生し、このメディエーターによって 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序が存

在することが示唆された。

*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 $\beta$ 、MIP-2、TNF- $\alpha$  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、樹状細胞の遊走に参与している<sup>5)</sup>。MIP-1 $\beta$  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<sup>6)</sup>。*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参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<sup>4)</sup>。今回の結果から *K. septempunctata* は TLR2 に認識され、転写因子 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B の働きによって TNF- $\alpha$  の産生につながるということが知られている<sup>7, 8)</sup>。今回の我々の結果でも *K. septempunctata* 刺激によって、TNF- $\alpha$  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- $\kappa$ B が活性化され、TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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。

#### D. 参考文献

1. Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y. et al. : 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. Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H. et al. : *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. Foodborne. Pathog. Dis., 10, 137-142, (2013)
3. Doihara, H., Nozawa, K., Kojima, R. et al. : QGP-1 cells release 5-HT via TRPA1 activation; a model of human enterochromaffin cells. Mol. Cell. Biochem., 331, 239-245, (2009)
4. Akira, S. : Toll-like receptor signaling. J. Biol. Chem., 278, 38105-38108, (2003)
5. Liu, M., Guo, S., Hibbert, J.M. et

- al.: CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 22, 121-130, (2011)
6. Ohtsuka, Y., Lee, J., Stamm, D.S. et al.: MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. *Gut.*, 49, 526-533, (2001)
7. Underhill, D.M., Ozinsky, A., Smith, K.D. et al.: Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced pro-inflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, 14459-63, (1999)
8. Wang, H., Wu, Y., Ojcius, D.M. et al. (2012): Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through Toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF-kappaB signaling pathways. *PLoS. One.*, 7, e42266, (2012)
- E. 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. 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)
4. 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)
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)
- ・学会・講演・シンポジウム発表
1. Takahiro Ohnishi, Takao Kawai, Tsuyoshi Sekizuka, Yuichiro Yahata, Makoto Kuroda, Yuko Kumeda, Yoshio Iijima, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi: *Kudoa septempunc-*

- tata* causes the novel food-poisoning outbreaks in Japan by consumption of olive flounder in raw, IAFP European Symposium, Poland (2012.5)
2. 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)
  3. 大西貴弘：クドアセプトエン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)
  4. 大西貴弘：クドアセプトエン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)
  5. 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 大西貴弘：クドアセプトエンク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，大阪府 (2013.2)
  10. 大西貴弘：クドアセプトエンク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)
  11. 大西貴弘：クドアセプトエンクタタとザルコシステイ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)
  12. 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)
  13. 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)



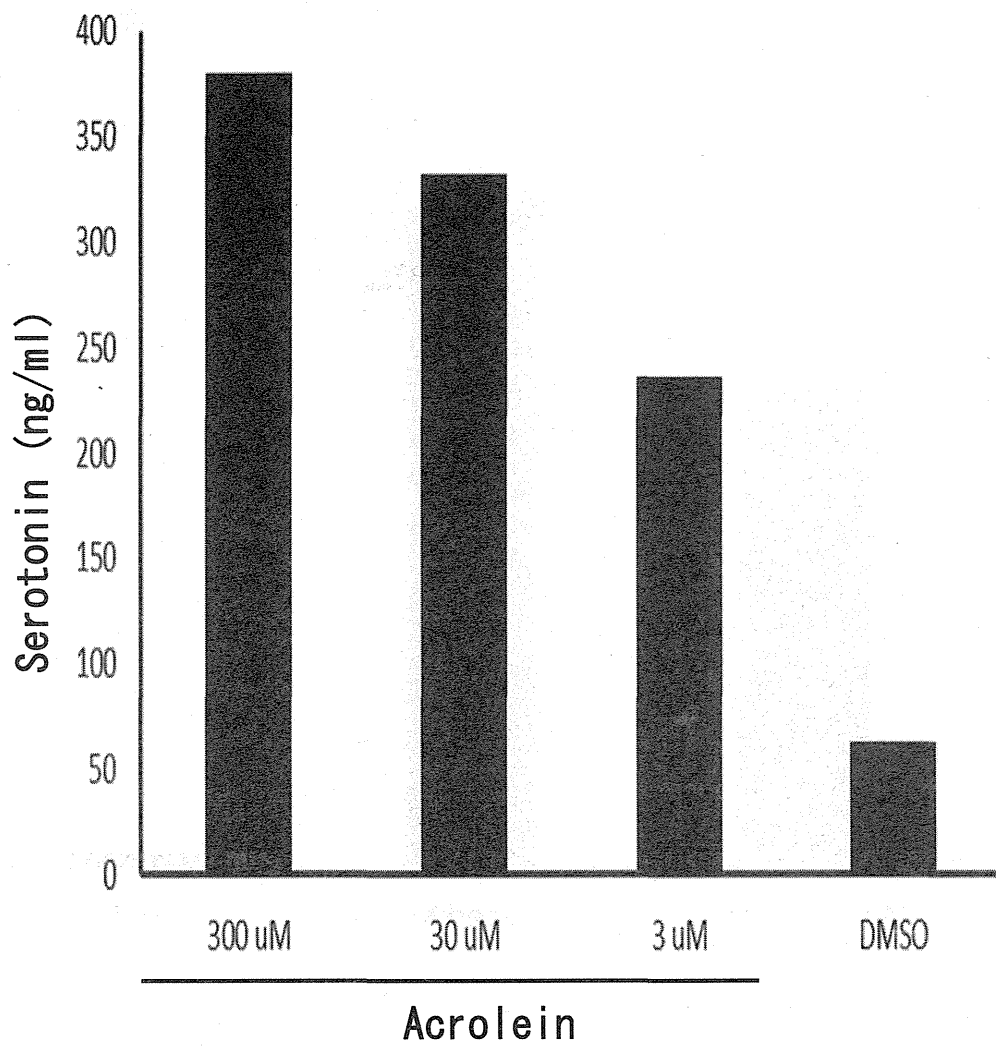


図1 Acrolein 刺激による QGP-1 細胞のセロトニン産生  
DMSO : 溶媒コントロール

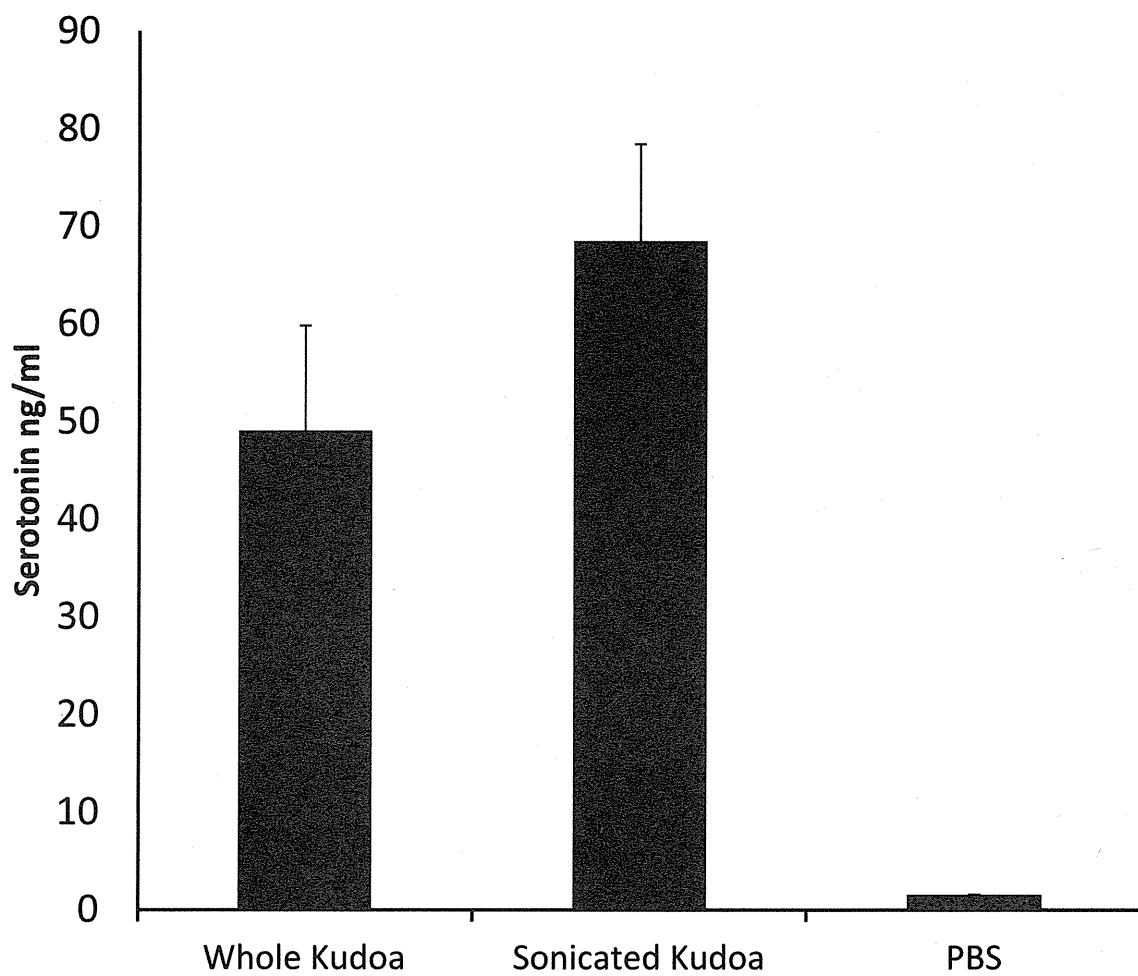


図2 *K. septempunctata* の直接刺激による QGP-1 細胞のセロトニン産生

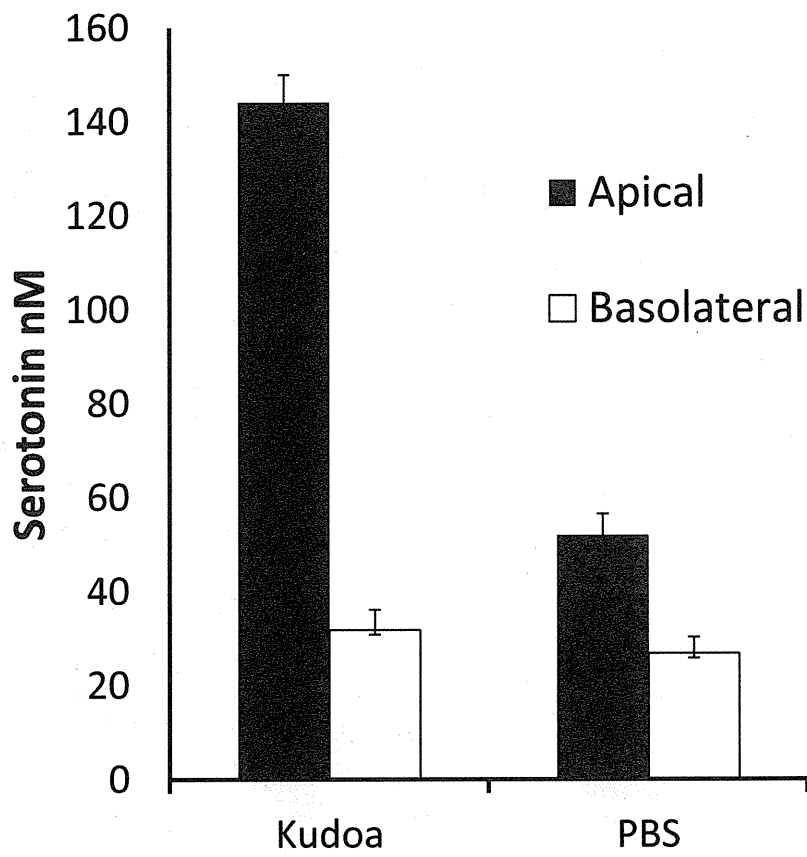


図3 *K. septempunctata* 感染 Caco-2 細胞の培養上清による QGP-1 細胞のセロトニン産生

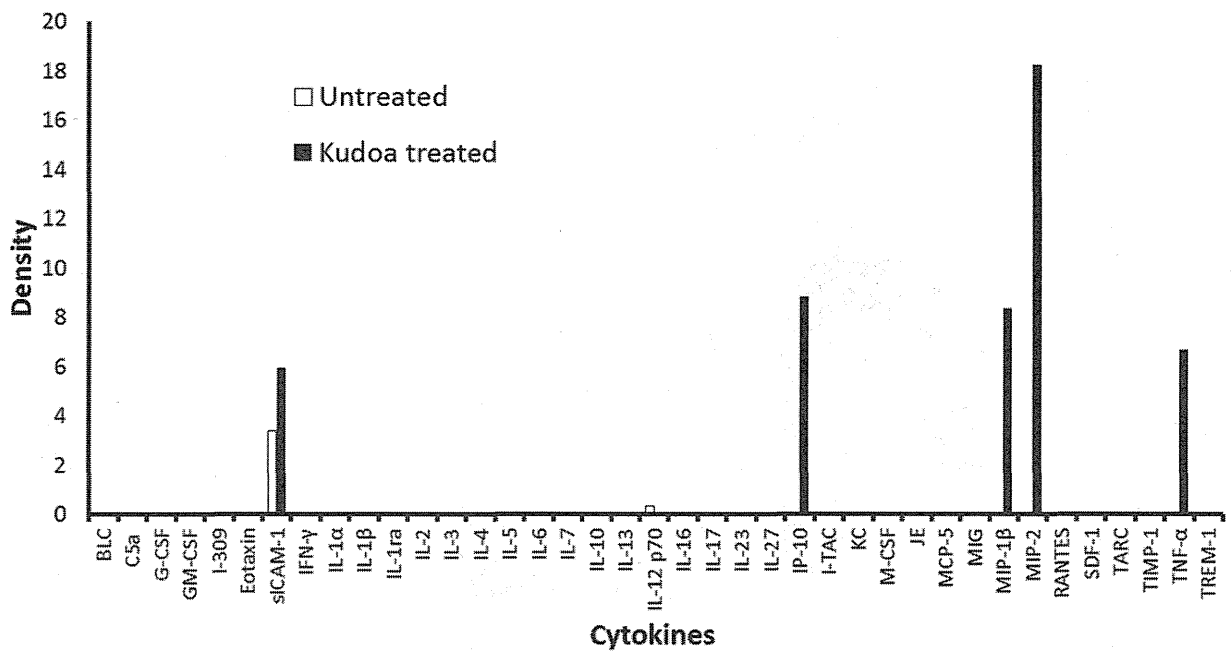


図4 *K. septempunctata* 刺激による RAW264 細胞のサイトカイン産生

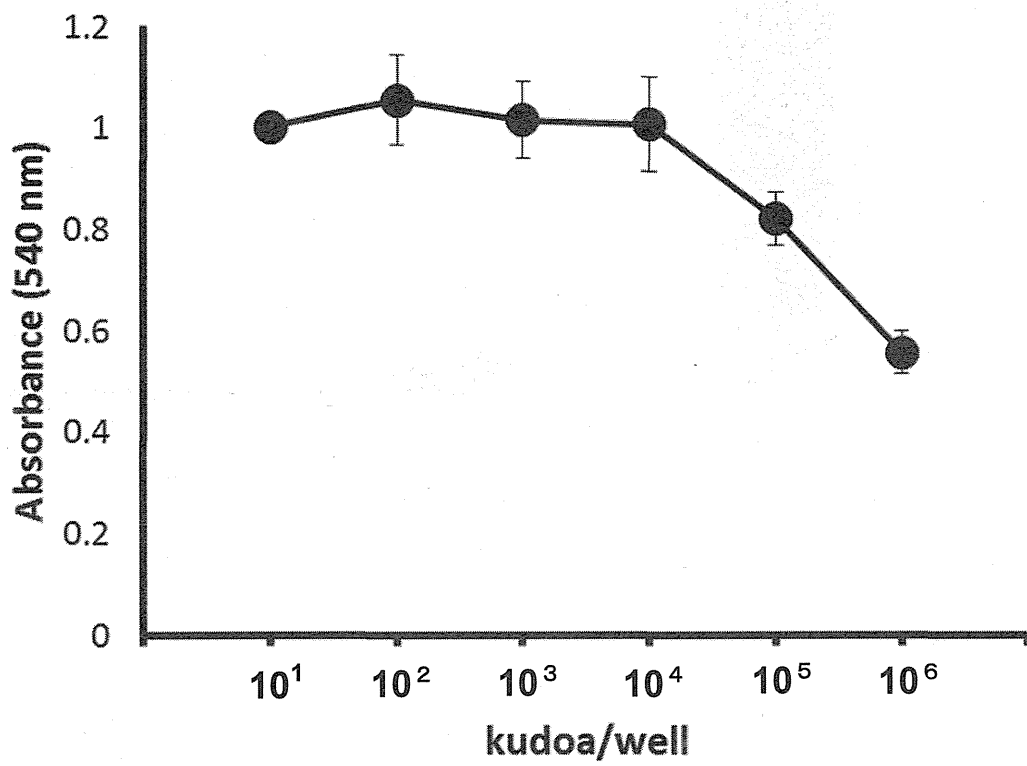


図5 *K. septempunctata* 刺激 RAW264 細胞の培養上清が示す細胞毒性

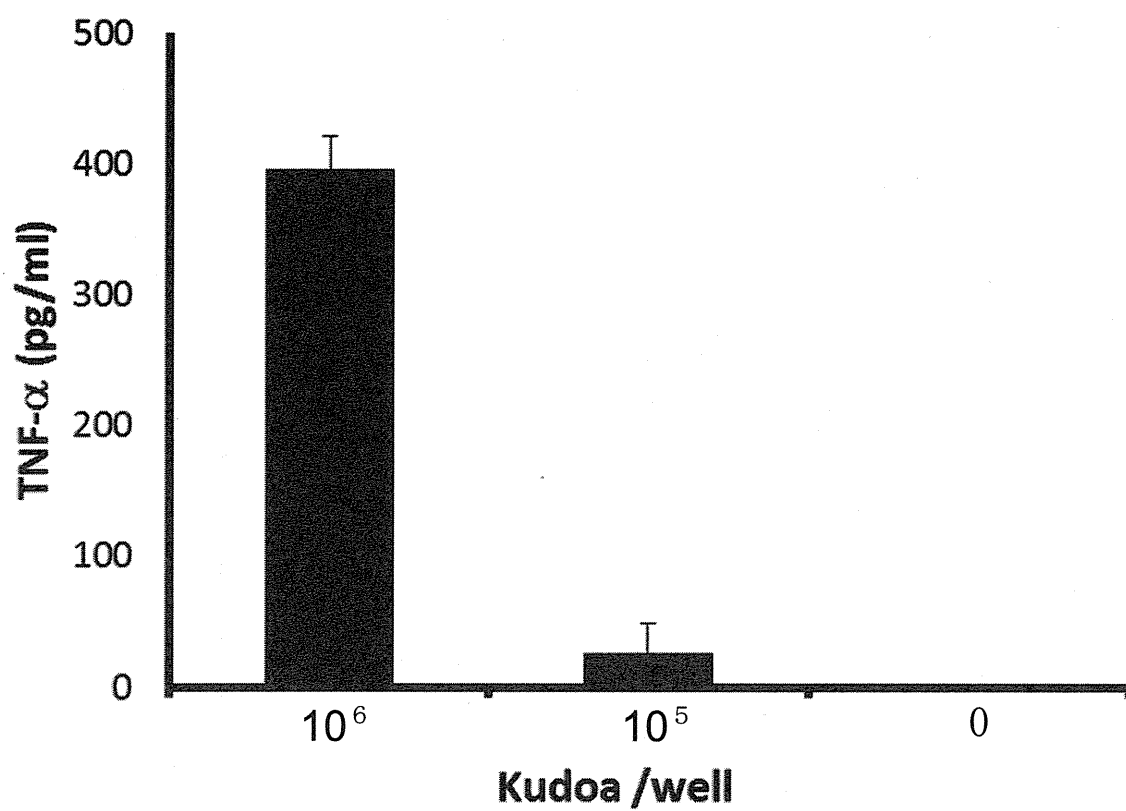


図6 *K. septempunctata* 刺激 RAW264 細胞の培養上清中の TNF- $\alpha$  量

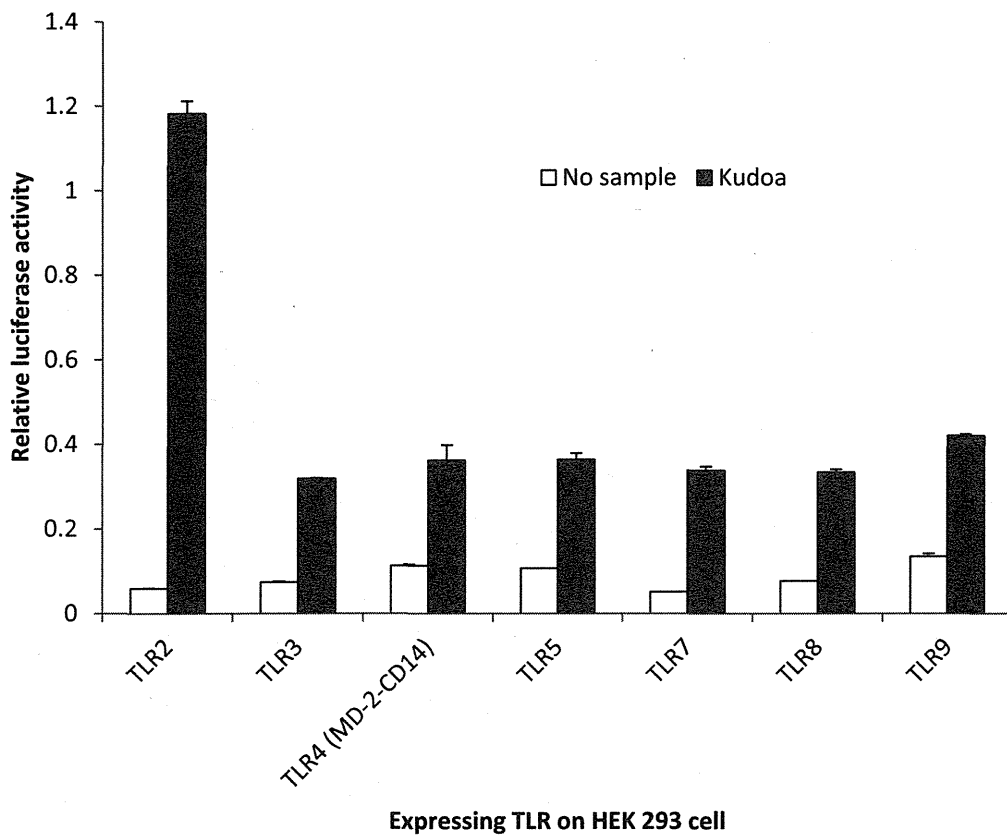


図7 TLR 発現 HEK293 細胞に対する *K. septempunctata* の作用

分 担 研 究 報 告 書

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

小西 良子



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

分担研究報告書

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

研究分担者 小西 良子（国立医薬品食品衛生研究所）  
研究協力者 菊池 裕（国立医薬品食品衛生研究所）  
研究協力者 吉成 知也（国立医薬品食品衛生研究所）  
研究協力者 山崎 朗子（国立医薬品食品衛生研究所）  
研究協力者 古沢 博子（国立医薬品食品衛生研究所）  
研究協力者 峰岸 恭孝（（株）ニッポンジーン）  
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）

研究要旨

クドア食中毒およびザルコシスティス食中毒の原因となるクドアセプテンpunkタタ、ザルコシスティスフェイヤーを、迅速にかつ特異的に検出することは、これら食中毒の予防対策に重要である。特に養殖現場や食肉検査場で利用できる迅速簡便検査法は、安全な食品を供給する目的において必要不可欠である。そのため、本研究において、免疫学的検出法と確立するため、特異性の高い抗クドアセプテンpunkタタ抗体および抗ザルコシスティス抗体の作成を試みた。

今年度は、まず、全クドアセプテンpunkタタ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。そのため、免疫原性の高い抗原を得るために、クドア胞子の外殻の精製を試みた。

ザルコシスティスフェイヤー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。

## A. 研究目的

クドア食中毒とザルコシステイス食中毒はそれぞれヒラメに寄生するクドアセプテンpunkタタおよび馬に寄生するザルコシステイスフェイヤーが病原物質である。それを受けて、本研究では予防対策の策定を目的に、食品衛生管理のための検査法の確立に関する一連の研究を行った。

今年度は、昨年度の成果を受けて、免疫原性の高い抗原の特定を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 家兎クドアセプテンpunkタタ抗体の作成

クドアセプテンpunkタタ胞子の精製は以下の方法で行った。クドアセプテンpunkタタ感染ヒラメの筋肉を定量採取し、200 $\mu$ mのメッシュで裁断、濾過した後、100 $\mu$ mのメッシュでさらに濾過し、1500 rpm $\times$ 10分 10度の条件で遠心した。沈殿を10-30%のグラジエントパーコールにより遠心し、クドア胞子を精製した。精製クドア胞子を10%ホルムアルデヒド溶液で固定したものを免疫抗原とした。ウサギを免疫動物として用い、10<sup>7</sup>/mlのホルマリン固定クドアセプテンpunkタタ抗原溶液をアジュバント(TiterMax: フナコシ)と混合し、3回免疫を行った。抗体価の確認のため、免疫前、一回免疫後、三回免疫後に採血し、抗血清を得た。

抗体価の確認は、凝集試験を用いた。凝集反応の抗原は、抗体血清作製に用いたホルムアルデヒド固定クドア胞子をそのまま、または超音波破碎したのちPBSに浮遊させた溶液を用いた。V字底96穴プレート(nunc)に1.5 $\times$ 10<sup>6</sup>/穴の抗原を接種し、50 $\mu$ lの抗血清を2<sup>-15</sup>倍までの範囲で二倍階段希釈して各穴に加えた後一晩静地し、凝集または沈殿を確認した。

免疫回数による抗体価の比較のため、免疫前、一回免疫後、三回免疫後の抗血清三種類を用いた。各抗血清については、市販のProteinGカラムを用いて、アルブミン等の血清タンパクを除去することによってIgGを精製した。IgGの精製度の確認にはSDS-PAGEを用いて、溶出分画に単離バンドが表れていることを確認した(図1)。

### 2. クドアセプテンpunkタタ胞子外殻からの抗原精製

方法1: ヒラメから抽出したクドアセプテンpunkタタを牛胎児血清含有PBS中に懸濁し、コラーゲンプレート上でインキュベートした。この処理により、クドアセプテンpunkタタがアメーバと外殻に分離し、アメーバのみがコラーゲンプレートに吸着する。上清を回収し、遠心処理により外殻を回収、またコラーゲンプレートに吸着したアメーバはスクレイパーを用いて回収した。それぞれをSDS-PAGEバッファーに懸濁し、熱処理後SDS-PAGEに供した。方法2: 3種の界面活性剤(Triton X、Tween 20、SDS)をそれぞれ加えたPBSにKudoaを懸濁し、95 $^{\circ}$ C又は室温で10分間インキュベートした。遠心処理後、上清を回収し、さらにアセトン沈殿によりタンパク質を回収した。

### 3. ザルコシステイスフェイヤー抗体

#### 1) 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。

表1に示した組合せにより、判定紙に用いる抗体および金コロイド標識抗体を決定した。11種の組み合わせを作成し、その効果を実際のザルコシステイス感染馬肉を用いて、イムノクロマトグラフィー法試験で検証した

ザルコシステイス感染馬肉サンプル(横隔膜)は、通知法によるPCRで陽性が確認されたものを使用した。PCR法の結果により喫食者が発症するレベルであると考えられた。使い捨てメスを用いてミンチにした馬肉0.3gに0.05%のTriton X-100を添加したPBS、600  $\mu$ lを添加し、良く攪拌した。軽くスピンドアウンした後、150  $\mu$ lをイムノクロマトストリップへ添加した。15分後および30分後にイムノクロマトリーダーにて値を測定した。

## C. 結果

### 1. 家兎クドアセプテンpunkタタ抗体の作成

ウサギを用いた免疫により作製した抗血清は、クドアセプテンpunkタタ胞子を抗原とした凝集試験を用いて抗体価を測定した。V字底96穴プレート(nunc)に $1.5 \times 10^6$ /穴の抗原を接種し、50  $\mu$ lの抗血清を $2^{-15}$ 倍までの範囲で二倍階段希釈して各穴に加えた後一晩静地し、凝集または沈殿を確認した結果、免疫前、一回免疫後、三回免疫後の抗血清全てにおいて、希釈倍率256倍で凝集反応を呈し、希釈倍率について三種類の抗血清間における差は認められなかった。そのため凝集試験の改善策として、ProteinGを用いた抗血清中のIgG精製を試みた。市販のProteinGカラムを用いて、アルブミン等の血清タンパクを除去し、IgGの精製度をSDS-PAGEにて確認した(図1)。精製し

たIgGを用いて凝集試験を再び試みたが、一回免疫後と三回免疫後のIgGで希釈倍率2倍、免疫前のIgGで無希釈で凝集反応が認められ、免疫前と免疫後血清の間に大きな差は認められなかった。さらなる改善策として凝集試験に用いる抗原の改善に着目し、クドアセプテンpunkタタ胞子を超音波破碎した後、Tween 20 または Triton X100を0.05%の濃度で加えたものを抗原として用い、再び凝集試験を行った。しかし、Tween 20 または Triton X100のどちらを使用した結果についても希釈倍率64倍で凝集反応が認められ、クドアセプテンpunkタタ虫体そのものを使用した結果より高い希釈倍率で凝集反応が見られたが、免疫前の血清中IgGと免疫後の抗血清中IgGとの比較においては凝集反応を呈する希釈倍率に差異が認められず、いずれの結果においても特異抗体価は認められなかった(表2)。

### 2. クドアセプテンpunkタタ胞子外殻からの抗原精製

方法1で精製を行った結果、顕微鏡観察下においては、アメーバと外殻が分離されていることを確認した。しかし、レーンB,CとD,Eを比較すると、タンパク質のパターンに大きな違いは認められなかった。25kDa付近に外殻特異的なタンパク質が観察されることがあったが、再現性は得られなかった(図2)。

次にTriton Xについて濃度を検討した。0.2、0.5、1.0%で抽出効率に差はほとんど見られなかった。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(図3)。  
SDS による処理も試みたが、Triton X  
と同等の結果が得られた(図4)。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。

### 3. ザルコシスティスフェイヤーに 感染した馬肉を用いたイムノクロマト グラフィ

抗 15kDa ポリクロの A を判定紙、B を  
金コロイド標識抗体に使用した場合に、  
喫食者が発症するレベルの馬肉(横隔  
膜)で陽性ラインが得られることが確  
認された(図5③)。判定はイムノク  
ロマトリーダーの値で、15分後:25.8、  
30分後32.5:10以上で目視可能とした。  
ウエスタンブロットの結果から、抗原  
として組換え 15kDa タンパク質を使用  
した場合でも、野生型(シスト由来)  
の 15kDa タンパク質と親和性の高い抗  
体を得ることが可能であることが示唆  
された。

### D. 考察

ヒラメ組織中から回収されたクドア  
セプテンpunkタタを虫体のままホル  
マリン固定した抗原を用いて作製した  
抗血清は、クドアセプテンpunkタタ  
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碎によ  
っても変わらなかった。その理由とし  
て、凝集試験においてクドアセプテン  
punkタタ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クドアセプテン

punkタタ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つ  
たこと等が考えられる。改善策とし  
ては、クドアセプテンpunkタタが特異  
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。

この仮説を検証するため、クドアセ  
プテンpunkタタ特異的なタンパク質  
を抽出することを行った。まず、クド  
アセプテンpunkタタ胞子を外殻とア  
メーバ体に向け、外殻に特異的に存在  
するタンパク質の検索を SDS PAGE にて  
行ったが、アメーバ体に存在せず、外  
殻のみに存在するタンパク質は見出す  
ことが出来なかった。そこで、表面活  
性剤を用いて、外殻内に存在するであ  
ろうタンパク質の抽出を試みた。表面  
活性剤として Triton X と SDS を用いた。  
処理法としては、表面活性剤で溶解し  
た場合と、さらに熱を加えた場合を行  
った。その結果 Triton X と SDS 処理で  
は、濃度に関係なくあまり違いが見ら  
れなかったが、熱処理を行うことによ  
り、検出されるバンドの数がへり、抗  
原として精製しやすいタンパク質が得  
られる可能性が示唆された。

一般にイムノクロマトグラフィなど  
の簡便法と呼ばれる測定法において  
は、前処理が簡便であることが重要で  
ある。そのため原則表面活性剤を使わ  
ず免疫源を作成したかったが、生のク  
ドア胞子全体を免疫源とならないこと  
がわかったため、表面活性剤の 2 つの  
内、比較的抗原抗体反応に影響の少な