

い、Triton Xを用いることとした。

今年度の結果から、クドアセプテンプリンクタタの免疫源に適したクドア特異的タンパク質の同定を行い、これらの大量精製を行うこととした。

一方、馬肉中のザルコシステイスフェイヤーの検出のために、昨年度作成した抗体3種を用いて、実際の感染馬肉を用いてのイムノクロマト法を行った。

3種の抗体の中から、判定紙に使用するものと金コロイド標識するものの組み合わせを11種類作成して、感染馬肉の抽出液を用いてイムノクロマトストリップで検討した。その結果最も検出感度が良かった組合せは、図5の③に示した「判定紙15KA+金コロイド15KBの組合せ」であった。

しかし、図5の④に示した「判定紙15KB+金コロイド15KAの組合せ」(③の逆)では、目視判定が困難であったことから、ポリクローナル抗体のロット差が感度に大きく影響することが考えられた。

そのため製品の安定性を考慮し、今年度ポリクローナル抗体で行った抗体をすべてモノクローナル抗体により作成することが必要であると考えられ、来年度にむけて家兔抗15kDaモノクローナル抗体を作成することとした。

E. 結論

クドア食中毒はヒラメ中のクドアセプテンプリンクタタが原因でおこり、ザルコシステイス食中毒は、馬肉中のザルコシステイスフェイヤーが原因で起こることから、これらの食中毒の予防法として、市場に感染したヒラメおよび馬肉が流通しないことが効果的であ

る。そのためには、生産地又は消費前において迅速にかつ特異的に検出出来る検査法を確立することで有り、その方法としては免疫反応を利用するイムノクロマトグラフィーが有効である。

昨年度から取り組んでいる抗体作成は、クドアセプテンプリンクタタにおいては、特異性の高い抗体の作成が出来なかった。そのため、今年度はクドア胞子から免疫原性の高い、特異性のあるタンパク質の同定を試みた。その結果、クドア胞子をTriton X および熱処理で処理したときに抽出されるタンパク質に可能性があることが示唆された。

ザルコシステイスフェイヤーに対する抗体は昨年度において家兔を用いて作成して、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。

参考文献

(1) 平成23年度厚労省食品等試験費「生食用生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒病因物質調査」報告書

(2) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長、*Sarcocystis fayeri*の検査法について(暫定版):食安監発0823第1号

<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iya/ku/>

F. 研究発表

<口頭発表>

1. Sugita-Konishi, Y., Irikura, D., Saito, M,
Yahata, Y, Kamata, Y. : A parasite toxin of
sarcocystis in raw horse meat causes a new

food borne disease. International Association
for Food Protection European Symposium

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 サルコシスティス検出イムノクロマトグラフィーの組み合わせ

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪
判定紙	SAR 02	SAR 02	15K A	15K B	SAR 02 +15 KA	SAR 02 +15 KB	15KA+ 15KB	15KA	15 KB	SAR02+1 5KA	15KB
金コロイド	SAR 02	15K B	15K B	15K B	15K B	15K B	15KB	15KA	15 KA	15KA	15KA+1 5KB

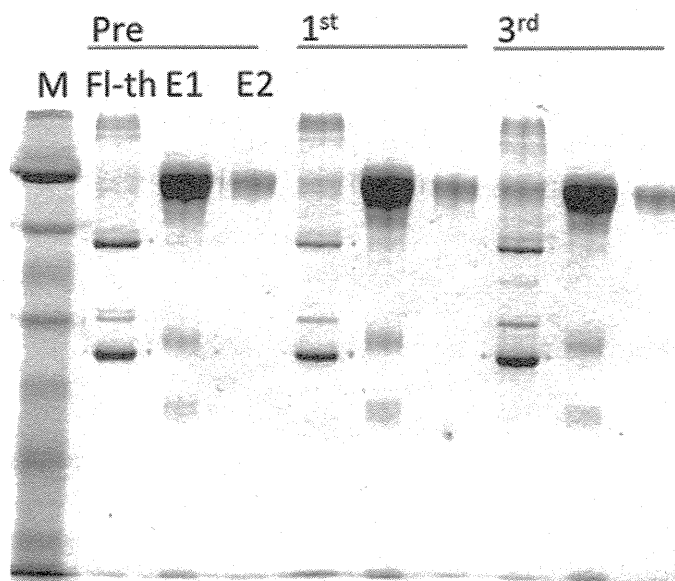
抗 *Sarcocystis fayeri* (シスト) 抗体 (SAR02)

抗組換え 15KDa 毒性タンパク抗体 A (15KA)

抗組換え 15KDa 毒性タンパク抗体 B (15KB)

表2 家兎クドア抗体による凝集反応

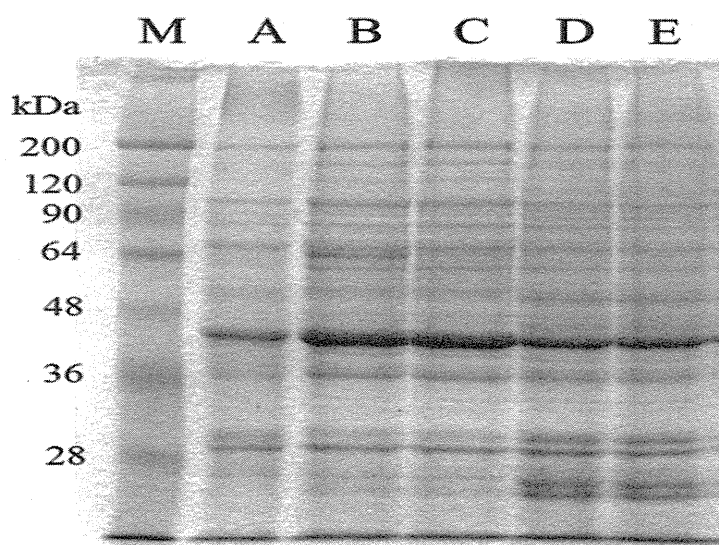
試験試料	凝集価 (agglutinin titer)		
	免疫前	1回免疫	3回免疫
全血清	1:254	1:254	1:254
IgG 精製	1:0	1:2	1:2
K. septempunctata 虫体を超音波破碎した後、Tween 20 or Triton-X100 を加えたものを抗原とした場合	1:64	1:64	1:64



Fl-th: flow through fraction
 E1: 1st Eluted fraction
 E2: 2nd Eluted fraction

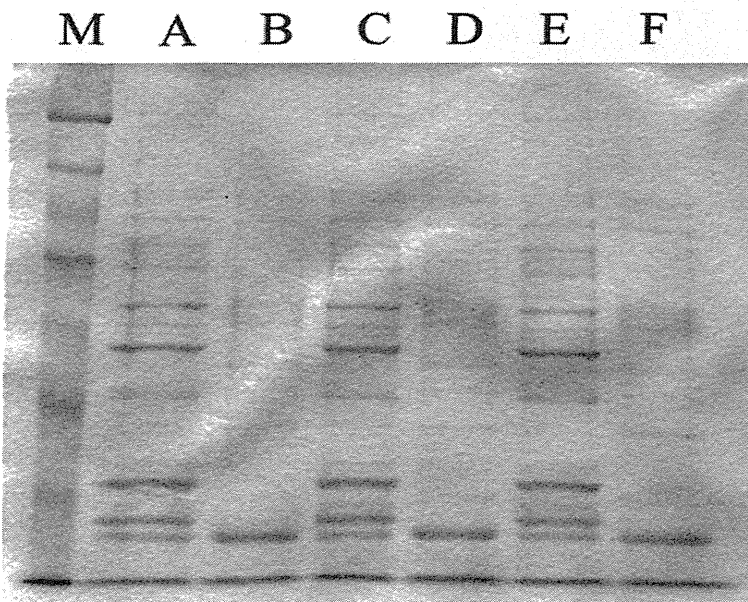
M : 分子量マーカー
 Fl-th : 濾過画分
 E : 溶出画分
 Pre : 免疫前血清
 1st : 一回免疫抗血清
 3rd : 三回免疫抗血清

図 1. 家兎を用いて作製した抗クドア胞子血清からの IgG 精製



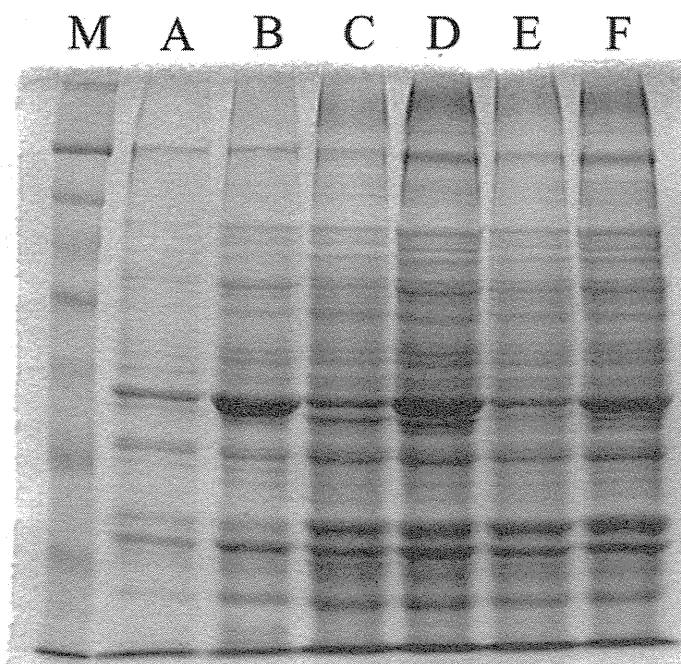
M : 分子量マーカー
A : Kudoa 抽出液
B,C : アメーバ画分 (2 連)
D,E : 外殻画分 (2 連)

図 2. クドアから抽出したアメーバ画分および外殻画分の SDS PAGE



- M: 分子量マーカー
- A: 0.2% Triton X
- B: 0.2% Triton X + 熱処理
- C: 0.5% Triton X
- D: 0.5% Triton X + 熱処理
- E: 1.0% Triton X
- F: 1.0% Triton X + 熱処理

図3. クドアの Triton X による処理後の SDS PAGE



M : 分子量マーカー

A : 0.05% SDS

B : 0.05% SDS + 熱処理

C : 0.15% SDS

D : 0.15% SDS + 熱処理

E : 0.5% SDS

F : 0.5% SDS + 熱処理

図 4. クドアの SDS による処理後の SDS PAGE



15min	7.6	5.7	25.8	16.8	15.8	13.3	17.2	11.1	9.5	5.7	10.8
30min	8.0	7.3	32.5	21.5	16.0	16.7	24.4	12.3	11.5	6.9	11.4

図5. サルコシステイス検出イムノクロマトグラフィーの結果

分 担 研 究 報 告 書

I. 食中毒患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の開発

II. 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

久米田 裕子

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

- I. 食中毒患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の開発
- II. 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

研究分担者 久米田 裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）
研究協力者 河合 高生（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）
研究協力者 原田 哲也（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）

要旨

ヒラメの生食を共通とする病因物質不明有症事例については、ヒラメ筋肉内寄生性の粘液胞子虫 *K. septempunctata* が関与することが明らかになり、これらの事例は平成 23 年度より食中毒として取り扱うことが通知された（平成 23 年 6 月 17 日付け食安発 0617 第 3 号）。本食中毒では喫食残品の入手が困難な場合が多く、このようなケースでは他の食中毒事例と同様に患者便の検査が要求されるが、これまでに有用な患者便試験法は報告されていなかった。そこで今年度の研究では、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。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。今回の患者便からの *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 (<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik.html>)。

また、昨年度の調査研究で、我々は乳のみマウスを用いて *K. septempunctata* 孢子の下痢原性を評価し、*K. septempunctata* 孢子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」孢子が必要である可能性を示唆した。今年度は、*K. septempunctata* 孢子を乳のみマウスに投与し、腸管内液体貯留活性値の経時変化を測定するとともに、マウス腸管を採取し、抗 *K. septempunctata* 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、「生きた」*K. septempunctata* 孢子では、腸上皮に接着・侵入している像が観察された。

A. 研究目的

ヒラメの生食を共通とする病因物質不明有症事例については、ヒラメ筋肉内寄生性の粘液胞子虫である *Kudoa septempunctata* が関与することが明らかとなり、これらの事例は平成 23 年度より食中毒として取り扱うことが通知された（平成 23 年 6 月 17 日付け食安発 0617 第 3 号）。*K. septempunctata* による食中毒では喫食残品の入手が困難な場合が多く、このようなケースでは他の食中毒事例と同様に患者便の検査が要求されるが、これまでに有用な患者便試験法は報告されていなかった。

昨年度の調査研究では、我々は食中毒の喫食残品のヒラメから *K. septempunctata* を特異的に検出できるリアルタイム PCR 法の開発を試み、その結果、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リアルタイム PCR 法を開発した。そこで今年度の研究では、昨年度に確立したリアルタイム PCR 法を用い、食中毒患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法を確立したので報告する。さらに、本研究で確立したリアルタイム PCR 法とすでに報告されているヒラメミトコンドリア DNA を標的とした PCR 法（文献 1）を組み合わせ実施した結果、病因物質の推定が可能になった 2 つの事例を経験したので報告する。

また、昨年度の調査研究で、我々は乳のみマウスを用いて *K. septempunctata* 胞子の下痢原性を評価し、pH4～pH9 の pH 域では

失活しないが、75°C5 分以上の加熱処理や、-30°C1 日あるいは-80°C1 時間以上の凍結処理、および超音波処理により *K. septempunctata* の腸管内液体貯留活性が失活することを報告した。同時に、細胞の生死判定に使用されるトリパンブルー染色液で *K. septempunctata* 胞子を染色した結果、*K. septempunctata* 胞子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」胞子が必要である可能性を示唆した。

そこで、今年度は、乳のみマウスを用いて *K. septempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性の発生機序を解明することを目的とし、まず、精製した *K. septempunctata* 胞子を乳のみマウスに投与し、投与後 0 時間から 6 時間の腸管内液体貯留活性値の経時変化を測定した。次に、*K. septempunctata* 胞子を投与したマウスの腸管を採取し、HE 染色および抗 *K. septempunctata* 抗体を用いた免疫染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

B. 研究方法

I. 患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法の開発

1. リアルタイム PCR 法

PCR 反応液は、Takara Premix Ex Taq™ (Perfect real time) および各 0.2 μM のプライマーとプローブ（表 1）を用いて 23 μl 容量で調整し、DNA 抽出液を 2 μl 加え、最

終容量 25 μ l とした。反応条件は 95°C, 30 s \rightarrow (95°C, 5 s \rightarrow 60°C, 31s) \times 50 cycles とした。

2. DNA 抽出法の検討

感染ヒラメより抽出した精製 *K. septempunctata* 孢子液を 1.6×10^4 個/g あるいは 1.6×10^6 個/g で添加したヒト糞便を用いて、3つの市販キット(QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)、FastDNA SPIN Kit for soil (MP-biomedicals)、UltraClean Fecal DNA Kit (MO BIO))のDNA抽出効率を cycle threshold (Ct) 値により相対的に比較した。次に、最も効率の高いDNA抽出キットについては、 1.6×10^{-1} から 1.6×10^3 個/g で孢子を添加したヒト糞便を用い、検出下限値を測定した。なお、FastDNA SPIN Kit for soil では、以下に示す通り取扱説明書の一部を改良し、DNA抽出を実施した。

- ① Lysing Matrix E tube に患者便試料 300 mg を秤量する。
- ② Sodium Phosphate Buffer を 489 μ l 加える。
- ③ 転倒混和し、Lysing Matrix E tube のビーズと試料液を混ぜる。
- ④ 10,000 rpm で数秒遠心後、さらに Sodium Phosphate Buffer を 489 μ l 加える。
- ⑤ MT Buffer を 122 μ l 加える。
- ⑥ FastPrep Instrument により、速度 6.0 で 40 秒間破碎後、14,000 \times g で 5 分

間遠心する。

- ⑦ 250 μ l の PPS を加えた 2.0ml マイクロチューブに上清を全量移し、転倒混和した後、14,000 \times g で 5 分間遠心する。
- ⑧ 再懸濁した Binding Matrix を 1 ml 加えた 15 ml 遠心チューブに、上清を全量移す。
- ⑨ 2 分間転倒混和後、3 分間静置する。
- ⑩ 3,000 rpm で数秒遠心し、滅菌先細スポイド等で沈渣をくずさないように上清を捨てる。
- ⑪ 1 ml の SEWS-M (使用前にエタノールで希釈) を沈渣に加え、転倒混和にて再懸濁する。
- ⑫ 3 分間静置後、マイクロピペットで上清を捨てる。このとき、Binding Matrix を吸いとらないように注意する。
- ⑬ ピペッティングにより再懸濁し、全量 (約 600 μ l) を SPIN Filter に移し、14,000 \times g で 1 分間遠心する。
- ⑭ Catch tube を交換し、乾燥のために 14,000 \times g で 2 分間遠心する。
- ⑮ Catch tube を 1.5 ml マイクロチューブに交換し、室温で 5 分間放置する。
- ⑯ 100 μ l の DES を加え、チップを使い Filter 上で Binding Matrix と懸濁する。
- ⑰ 14,000 \times g で 1 分間遠心し、溶出液を PCR サンプルとして使用する。

3. 特異性の確認

ヒラメの喫食と関連がなく他の病因物質が特定された下痢症患者便 41 検体(サルモネラ検出 7 検体、カンピロバクター検出 7 検体、ノロウイルス検出 17 検体)について本試験法を実施した。

4. 患者便を用いた有用性の確認

2011年5月～2012年7月に近畿地方で発生した28件の*K. septempunctata*による食中毒事例(疑い事例を含む、表2)に由来する患者便93検体を用いて、本試験法の有用性を評価した。

5. 陽性検体の増幅産物確認

リアルタイムPCR法で陽性と判定された検体について、増幅産物を確認するため、アガロースゲル電気泳動を行った。さらに、これらの増幅産物についてF-プライマー(5'-ATGGATAACTGTGGTAAATCTGAGCTAATAC-3')およびR-プライマー(5'-CCAGTTGGTCGAGTCTAATAAATGC-3')を用いたnested-PCR法を実施した。

II. 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. ヒラメ筋肉中の *K. septempunctata* 孢子の精製

ヒラメの筋肉を1g秤量し、筋肉上に200µm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* 孢子を粗抽出した。この粗抽出液を100µm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、100µm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で15分間、4°Cで遠心した。得られた沈渣に*K. septempunctata* 孢子が含まれているため、沈渣を1mlのPBSで懸濁して*K. septempunctata* 孢子抽出液とした。パーコール処理によって*K. septempunctata* 孢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* 孢子抽出液を15%パーコール液の上に重層し、3,000rpm、4°Cで遠心し、その沈渣をPBSに浮遊させた(精製孢子液)。

2. 乳のみマウス試験

4～5日齢のddYマウスに*K. septempunctata* 孢子抽出液を0.1ml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。

3. マウス腸管の組織学的観察

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、国立医

薬品食品衛生研究所・菊池裕先生より分与を受けたニワトリ抗*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。

B. 研究結果

I. 患者便からの*K. septempunctata*遺伝子検出法の開発

1. DNA抽出効率の検討

1.6×10⁴ 個/g の孢子添加糞便 3 検体を用いた DNA 抽出法の検討では、3 つの市販キットのうち FastDNA SPIN Kit for Soil が最も高い抽出効率を示した。また、1.6×10⁶ 個/g の孢子添加糞便では 3 検体中 2 検体で、このキットを用いた場合の抽出効率が有意に高かった(表 3)。

FastDNA SPIN Kit for soil を用いた場合の検出下限値は、糞便 1g あたり孢子 1.6×10¹ 個で、高感度に孢子 DNA を検出することが可能であった(表 4)。また、この結果から、本試験法では ΔRn=0.35 で Ct 値 41 以下を陽性とする判定基準を設定した。

2. 特異性の確認

ヒラメの喫食と関連のない下痢症患者糞便 41 検体では、本試験法による偽陽性は確認されなかった。

3. 患者便による有用性の検討

K. septempunctata による食中毒患者便

93 検体のうち 53 検体が、本試験法で陽性となった(表 2)。陽性検体の Ct 値の範囲は 32.13 から 40.85 で、75.5% の検体が 35.0cycles 以上の Ct 値を示した(図 1)。Ct 値が高い検体では非特異反応による偽陽性が疑われたが、リアルタイム PCR 産物の電気泳動の結果、陽性となったすべての検体で 159bp の増幅産物が確認された(図 2)。さらに、陽性検体すべてについて nested-PCR 法で特異的増幅産物を確認した。これらの結果から、リアルタイム PCR 法により得られた結果は、特異的反応によるものと確認された。

ヒラメの喫食から検体採取までの期間と陽性率の比較を行ったところ、ヒラメの喫食から 3 日以内に採取された検体の陽性率は 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(図 3)。

II. 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

1) パーコール精製した *K. septempunctata* 孢子を乳のみマウスに投与し、投与後 0 時間から 6 時間の FA 値を測定した。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(図 4)。

2) 投与後 1.5 時間の腸管組織を抗 *K.*

sempunctata 抗体を用いた免疫染色にて染色し、光学顕微鏡下で観察した。陰性対照として凍結処理した *K. sempunctata* 胞子をマウスに投与した場合、腸上皮に免疫染色像はほとんど観察されなかったのに対し (図 5B)、無処置の生きた *K. sempunctata* 胞子を投与したマウスでは腸上皮に免疫染色像が観察された (図 5A)。

C. 考察

I. 患者便からの *K. sempunctata* 遺伝子検出法の開発

これまでの疫学調査により、多数の喫食者が含まれる *K. sempunctata* による食中毒事例では、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 2)。これは、提供された複数のヒラメのうち、一部が *K. sempunctata* に感染していたために、その感染ヒラメの喫食者のみ発症したと考えられる。そのため、疫学情報のみで *K. sempunctata* を病因物質と確定することは難しく、喫食残品であるヒラメが入手できた場合には、*K. sempunctata* 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刺身や寿司で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. sempunctata* 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. sempunctata* 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。また、便検体からの DNA 抽出に 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。

今回の検討で、すべての陽性患者検体で Ct 値が 30 cycles 以上であったことは興味深い結果であった。経口摂取された *K. sempunctata* 胞子が消化管内でどのように消化され、排泄されるかは現在のところ不明であるが、今回の結果から患者便に含まれる抽出可能な *K. sempunctata* の DNA は極微量であると推察された。

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も本研究の成果の一つである。我々は、患者に経口摂取された大量の *K. sempunctata* 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ている。*K. sempunctata* は 2010 年に同定された新種の粘液胞子虫であり (文献 3)、その下痢発症機序についてもいまだ不明な点が多い。これまでに報告されるクリプトスポリジウム等の寄生虫

性下痢症では、ヒト腸管での感染増殖による腸管上皮の傷害が下痢症の発症機序の一要因とされている。しかし、乳のみマウスを用いた下痢原性の研究では、マウス腸管上皮での *K. septempunctata* の感染増殖は確認されておらず、他の寄生虫性下痢症とは発症機序が異なると考えられた。今回の成績からも、患者の腸管内で *K. septempunctata* の感染増殖が起きているとは考えにくく、*K. septempunctata* の下痢症発症機序については、更なる検討が必要であると考えられた。

なお、今回示した患者便からの *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 (<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik.html>)。

【事例 1】

「概要」

大阪府の飲食店利用者 2 グループ 8 名中 7 名が喫食後 3～4 時間で腹痛、嘔吐、下痢等の胃腸炎症状を示した。患者の発生状況から *K. septempunctata* による食中毒が疑われたが、喫食残品は入手不可能であったため、患者 7 名についての糞便検査が行われた。

「検査」

糞便検査の結果、7 検体中 3 検体が *K. septempunctata* 陽性であった。しかし、そ

の後の聞き取り調査で、患者 1 名が「ヒラメを食べていない」と主張したため、ヒラメ喫食の有無を確認するため、糞便の抽出 DNA についてヒラメミトコンドリア DNA を標的とした PCR を実施した (文献 1)。その結果、*K. septempunctata* 陽性の 3 検体中 1 検体でヒラメミトコンドリア DNA を検出した。この結果から、少なくともヒラメミトコンドリアが陽性となった患者 1 名については、当該飲食店の利用から糞便採取までの間にヒラメを喫食していたと考えられた。

「結末」

喫食状況および患者の症状、および検査結果を総合的に判断し、病因物質 *K. septempunctata* として、当該施設は行政処分された。

【事例 2】

「概要」

A 県の飲食店を利用した 6 グループ中 2 グループ 21 名が喫食後 4～12 時間で嘔吐、下痢を発症した。この事例では、喫食残品ヒラメが入手不可能であったため、食中毒とは断定されなかった。しかし、入手できた喫食残品のマグロからリアルタイム PCR 法 (通知法) で *K. septempunctata* 陽性となったため、研究目的として大阪府立公衆衛生研究所で喫食残品マグロの試験を実施した。

「試験結果」

通知法の顕微鏡法に準じて試験を実施し

たところ、血球計算板の枠外に6極のクドア胞子を1個確認した(検出下限値付近で計数不可)。次に、マグロ抽出DNAを用いて本研究班で確立した*K. septempunctata*種特異的リアルタイムPCR(文献4)を実施したところ、*K. septempunctata*陽性でマグロ1gあたり10の3乗個(孢子数換算)が検出された。また、*K. septempunctata*28S rDNAを標的としたPCR(文献5)を実施したところ、357 bpの増幅産物が得られ*K. septempunctata*陽性となった。さらに、マグロ抽出DNAについて、ヒラメミトコンドリアDNAを標的としたPCRを実施したところ、陽性となった。

「考察」

マグロより*K. septempunctata*が検出された原因として、試験結果から以下の2つが推測された。1)入手不可能であった喫食食品が*K. septempunctata*感染ヒラメであり、このヒラメからのクロスコンタミネーションによりマグロに*K. septempunctata*孢子が付着した。2)マグロに*K. septempunctata*が感染していた。しかし、これまでにマグロへの*K. septempunctata*感染は報告されていないこと、検出された*K. septempunctata*孢子数が下痢や嘔吐の発症孢子数(1gあたり約10の6乗)に比べ少ないこと、さらに、マグロ抽出DNAよりヒラメミトコンドリアDNAが検出されたことを考慮すると、クロスコンタミネーションを原因とするのが最も妥当であると考えられ

た。

II. 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

乳のみマウスにおける*K. septempunctata*孢子のFA活性を経時的に調べたところ、FA値は投与後0.5時間で上昇し始め、1.5時間後に最大値を示した。その後徐々に低下し、投与後5、6時間には投与直後のFA値まで低下した(図4)。大腸菌耐熱性エンテロトキシン(ST)の場合、投与後1時間から8時間にかけてFA値は0.09以上の高値を示すことから(文献6)、*K. septempunctata*孢子のFA活性は一過性で、STよりも弱いと考えられた。

また、*K. septempunctata*孢子を投与したマウスの腸管組織を光学顕微鏡下で解析したところ、HE染色後の腸管組織標本では*K. septempunctata*孢子の存在を確認することが困難であった(データ示さず)。しかし、抗*K. septempunctata*抗体を用いた免疫染色後の腸管組織標本では、腸上皮に免疫染色像が観察された(図5A)。凍結処理した*K. septempunctata*孢子を生乳のみマウスに投与した場合、腸上皮には免疫染色像が観察されなかったことから(図5B)、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。*K. septempunctata* 胞子の下痢原性機序の解明には、胞子の接着・侵入像をより詳細に観察する必要があると考えられた。さらに、光学顕微鏡を用いた解析では、抗*K. septempunctata*抗体を用いる免疫染色が有効であると考えられた。

D. 結論

1. *K. septempunctata* による食中毒の患者便から、*K. septempunctata* を種特異的に検出できるリアルタイム PCR 法を開発した。
2. 糞便からの胞子 DNA 抽出法について 3 つの市販キットを検討した結果、FastDNA SPIN Kit for soil が最も抽出効率がよかった。開発したリアルタイム PCR 法は、検出下限値が糞便 1g あたり胞子 1.6×10^1 個で、高感度であった。
3. 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。陽性検体の Ct 値の範囲は 32.13 から 40.85 で、75.5%の検体が Ct 値 35.0 以上であった。
4. 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。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. 今回示した患者便からの *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 (<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik.html>)。
6. 精製した *K. septempunctata* 胞子を乳のみマウスに投与した結果、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、投与後 5、6 時間には投与直後の FA 値まで低下した。以上より、*K. septempunctata* 胞子の FA 活性は一過性であると考えられた。
7. 抗 *K. septempunctata* 抗体を用いた免疫染色後の腸管組織標本では、腸上皮に免疫染色像が観察された。凍結処理した *K. septempunctata* 胞子を投与した場合には腸上皮に染色像が観察されなかったことから、生きた *K. septempunctata* 胞子が腸上皮に接着・侵入すると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Saitoh et al. Detection Japanese flounder-specific DNA from gut contents of potential predators in the field. Fisheries Science 2003; 69: 473-477.
- 2) Kawai et al. Identification of *K.*

- sempunctata* 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.
- 3) Matsukane et al. *K. sempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol Res* 2010; 107: 865-872.
- 4) Harada et al. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *K. sempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int. J. Food Microbiol.* 2012; 156: 161-167.
- 5) Grabner et al. Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *K. sempunctata*, *K. thyrsites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). 2012. *Aquaculture*, 338-341: 36-40.
- 6) Giannella, R. A. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect. Immun.* 1976; 14:95-99.
- F. 研究発表
- 論文発表
- 1) Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., and Kumeda, Y. Detection of *K. sempunctata* 18S Ribosomal DNA in Patient Fecal Samples from Novel Food-Borne Outbreaks Caused by Consumption of Raw Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 2964-2968.
- 学会発表
- 1) 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 *K. sempunctata* 試験法, 第33回日本食品微生物学会学術総会, 2012, 福岡.
- 2) 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 *K. sempunctata* の下痢原性に関する研究 (3), 第33回日本食品微生物学会学術総会, 2012, 福岡
- 講演・シンポジウム
- 1) 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, 2013, 大阪