

201327005A

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 25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 26 (2014) 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 25
大西 貴弘 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- クドアセプトンククタタの迅速簡易測定法に関する研究 47
小西 良子 (麻布大学 生命・環境科学部)

- 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 61
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* 属のの遺伝学的解析 79
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 95
八幡裕一郎 (国立感染症研究所 感染情報センター)

- Kudoa* 属粘液孢子虫の種同定に関する研究 103
佐藤 宏 (山口大学 農学部)

- 住肉孢子虫の遺伝子検査法と毒性タンパク質遺伝子の性状に関する研究 129
鎌田 洋一 (岩手大学 農学部)

- 馬肉生食による食中毒の病因物質とされる *Sarcocystis fayeri* の
アピコプラストゲノムの構造決定 143
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 25 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）

本研究グループではヒラメの生食を原因とする *Kudoa septempunctata*（以下クドア）による食中毒と馬肉の生食に伴う *Sarcocystis fayeri*による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)クドアによる食中毒

- クドア孢子による腸管上皮細胞の微絨毛の崩壊、ミトコンドリアや小胞体の膨化、および細胞崩壊がクドアによる下痢発症メカニズムのひとつであることを明らかにした。
- クドア刺激を受けた腸管上皮細胞から MIP-3 α が産生され、MIP-3 α の働きによって Enterochromaffin 細胞からセロトニンの産生が誘導されることを明らかにした。このセロトニン産生によって嘔吐が引き起こされる可能性が示唆された。
- ミトコンドリア遺伝子の多型により、クドアが ST1 と ST2 の二つの系統に分類でき、韓国産ヒラメの殆どが ST1 であることを明らかにした。この遺伝子多型は韓国産ヒラメの判別に利用できると思われる。
- ミトコンドリアゲノムと核ゲノムの配列解読を行った。ミトコンドリアゲノムについては、クドアの種内では塩基配列の 96～99%が同一であることを明らかにした。一方、クドアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。これらの遺伝子配列の違いは、検出系開発や疫学解析に応用できると思われる。
- クドアのゲノムサイズが 83mb で 3 本の染色体からなることが分かり、また二倍体であることが示唆された
- ヒラメ喫食による下痢または嘔吐の発病との関連はヒラメの個体の重量とヒラメの喫食量が発病と関連することを明らかにした。
- LAMP 法および核酸クロマトグラフィー法によるクドアの迅速検査法を開発した。妥当性試験結果より、2 種類の迅速簡便試験法は、養殖場での出荷時検査または検疫業務における輸入検査に適用可能であると考えられた。

- ヒラメの筋肉内には孢子に成熟する前の未成熟な細胞が多数存在し、部位によって成熟した孢子と未成熟な細胞の比率が大きく違うことが明らかになった。このことから孢子と未成熟な細胞の比率が検査結果に大きな影響を与えることが示唆された。
- 市販のウマヅラハギから *K. septempunctata* が分離された。ヒラメ以外の魚種に対しても早急に粘液孢子虫調査を実施する必要性が認められた。
- *Uncapsula* 属のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の塩基配列は *Kudoa* 属と高い類似性をもつこと、*Uncapsula* 属の種確認がまだ進んでいない現状においては、顕微鏡検査による孢子形態の確認を併用することが食中毒事例の原因究明において重要であることが考察された。
- リキッドフリーザーは5分という短時間の凍結でクドアを完全に失活させることができ、従来の凍結法に比べて肉質の変化が少ないことが明らかになった。リキッドフリーザーはクドア食中毒の予防に有効であることが示唆された。

(2) *Sarcocystis fayeri* による食中毒

- *Sarcocystis fayeri* アピコプラストゲノムの配列を完成させた。
- *Sarcocystis fayeri* の毒性タンパク質遺伝子を標的とした検査法を開発した。

研究分担者

小西 良子 麻布大学
 鎌田 洋一 岩手大学
 野崎 智義 国立感染症研究所
 黒田 誠 国立感染症研究所
 八幡裕一郎 国立感染症研究所
 佐藤 宏 山口大学
 久米田裕子 大阪府立公衆衛生研究所

八木田健司 国立感染症研究所
 竹内史比古 国立感染症研究所
 関塚 剛史 国立感染症研究所
 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
 岡崎 隆三 国立感染症研究所
 白藤由紀子 岩手大学
 石崎 直人 麻布大学
 李 迎春 山口大学

研究協力者

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所
 渡辺麻衣子 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
 山崎 朗子 国立医薬品食品衛生研究所
 古沢 博子 国立医薬品食品衛生研究所

阿久澤さゆり 東京農業大学
 森 広一郎 (独) 水産総合研究センター
 米加田 徹 (独) 水産総合研究センター
 福田 穰 大分県農林水産研究指導センター
 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

難波 豊彦 一般財団法人東京顕微鏡院
峰岸 恭孝 (株) ニッポンジーン
宇治家武史 (株) カイノス
Binh Thi Tran Institute of Ecology and
Biological Resources, Vietnam Academy of
Science and Technology

A. 研究目的

生鮮食品を原因とする原因不明の食中毒が増加している。これまでの研究からヒラメを原因食とする食中毒の原因微生物は粘液胞子虫の一種の *Kudoa septempunctata* (以下、クドア) であることが明らかになっている。また、馬肉を原因食とする食中毒の原因微生物として住肉胞子虫の *Sarcocystis fayeri* が同定されている。これらの微生物による食中毒は一過性の下痢や嘔吐が主な症状で、発症までの潜伏時間が比較的短いのが特徴である。しかし、これらの食中毒は年間 50 件以上発生しており、減少する傾向は見られない。そのためこれらの食中毒に対しての対策が早急に求められている。食中毒の予防法を構築するためにはこれらの寄生虫がどのようにして食中毒を引き起こすのか、その発症機序を明らかにすることが必要であると考えられる。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。そのため、本研究班では平成 23 年度より継続してこれらの寄生虫に関する研究を進め、以下のような研究を行っている。

- ①クドアおよび *S. fayeri* の病原因子の同定。
- ②クドアおよび *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迅速簡易検査法を構築する。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。特に今年度は以下の項目を中心に検討を行った。
- ①クドアによる下痢および嘔吐発症機構の解析
- ②クドアの疫学的検討
- ③クドアのゲノム解析
- ④クドアに対する迅速簡易検査法の作成
- ⑤粘液胞子虫の種同定の充実
- ⑦クドア不活化法の検討
- ⑧ *S. fayeri* のゲノム解析
- ⑨ *S. fayeri* 毒性成分を対象とした検査法の開発

B. 研究方法

1. クドアによる下痢および嘔吐発症機構の解析

クドアによる下痢発症機構を明らかにするために、Enterochromaffin (EC) 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。クドアが直接 EC 細胞に作用する場合、およびクドアの感染を受けた腸管細胞が何

らかのメディエータを産生し、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。

クドアによる下痢発症機構を明らかにするために、マウスにクドアを経口投与した後に、超薄切片を作製し、走査型電子顕微鏡観察を行った。また切片をニワトリ抗クドア胞子抗体と反応させ、ビオチン標識ヤギ抗ニワトリ IgG 抗体、10 nm 径金コロイド標識ストレプトアビジンに順次反応させた。この免疫染色を施した切片を酢酸ウランと鉛染色液で電子染色した後、透過型電子顕微鏡で観察した。

2. クドアのゲノム解析およびミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクドアの系統分類

ミトコンドリアの *cox1* 遺伝子内のプライマ (mtDNA_cox1-F, mtDNA_cox1-R) および *1-rRNA* 遺伝子内のプライマ (mtDNA_1-rRNA-F, mtDNA_1-rRNA-R) を設計し、PCR を行い、サンガー法で核酸配列を解読した。上記で解読ができなかった検体については、さらに外側に設計したプライマ (*cox1* については mtDNA_cox1-F2, mtDNA_cox1-R2、*1-rRNA* については mtDNA_1-rRNA-F2, mtDNA_1-rRNA-R2) で事前に PCR しておいてから、上記の PCR を行った。

クドアゲノム配列の解読のために食中毒残品のヒラメ刺身片、又は養殖ヒラメからクドア (*Kudoa septempunctata*) と *Kudoa*

neothunni を抽出した。検体から DNA を精製し、ペアエンドとメイトペアの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。ABYSS および Platanus プログラムを用いて、核およびミトコンドリアゲノムの配列をアセンブルした。系統解析は、MAFFT プログラムによりアミノ酸配列をアライメントした後に、>90%の配列で欠失しているサイトを除外した。系統推定は、RAxML プログラムにより最尤推定で行った。①ゲノム制限酵素地図の作成を昨年度より継続して行った。クドア (検体 201204・国内養殖場由来) の染色体 DNA 調製、および DNA 分子の制限酵素処理と光学的スキャンについては、昨年度報告書に記載した。昨年度に行った制限酵素地図のアセンブルにおいて、ヘテロな染色体領域が見つかり、二倍体であることが推測されたため、本年度は二倍体としてアセンブルし直した。

3. ヒラメ喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

本研究の研究デザインは地域相関研究で行った。利用したデータは平成 24 年度に厚生労働省医薬食品局食品安全部食中毒被害情報室に自治体から報告されたヒラメを提供し、食中毒として報告された事例とした。症例定義はヒラメを喫食し、24 時間以内に下痢または嘔吐の消化器症状を呈した者とした。事例のうち、患者のヒラメの喫食量、ヒラメの 1g あたりの *K. septempunctata*

の孢子数の情報が揃った 12 事例を利用した。利用した情報は事例毎の発症率、ヒラメの個体の重量 (Kg) (ヒラメ重量)、ヒラメ喫食量 (g)、ヒラメのクドア孢子数とした。解析方法は発症に関連する要因の検討を相関係数及び重回帰分析を行った。発症率とヒラメ喫食との関連は相関係数を算出した。相関係数が 0.200 以上の項目は多重共線性の可能性も検討し、重回帰分析を行った。

4. クドアに対する迅速簡易検査法の作成

クドアの表面タンパク質を電気泳動により分離・抽出した。抽出タンパクより得られたアミノ酸配列、DNA 配列をもとに LAMP 法を作成した。また、すでに公開されているクドアの 16S リボゾーム DNA 情報をもとに NASBA 法を用いた核酸クロマト法を作成した。作成した LAMP 法および核酸クロマト法の妥当性は 5 機関が参加した妥当性試験を行い、従来の測定法である PCR 法およびリアルタイム PCR 法と比較することによって評価した。

5. ヒラメ以外の海産魚に寄生する粘液孢子虫の種同定

国内外から海産魚を採取し、分子遺伝学および形態学的に粘液孢子中の分類を行った。*Unicapsula* 属の分子系統学的な位置づけと *Kudoa* 種との鑑別に必要な基本的な遺伝子情報はまだ部分的に知られている状態にとどまることから、多殻目未知種が関

わる種鑑別が求められた場合に分子遺伝学的マーカーの有用性を明確に示すことが難しい。そこで特に本年度は *Unicapsula* 属に焦点を当てて研究を行った。

6. クドア不活化法の検討

クドア寄生ヒラメを -30°C のエアーストフリーザー (MDF-U338、三洋)、 -80°C のエアーストフリーザー (ULT-1386-5、Thermo Scientific) もしくはリキッドフリーザー (凍眠 TL-1、テクニカン) で凍結した。ヒラメを解凍した後、クドア孢子を精製し Caco-2 細胞を用いた系でクドアの毒性を測定した。ヒラメ筋肉の破断特性をレオメーター (RE-33005S、山電) で測定し、冷凍による肉質の変化を評価した。

7. ヒラメ筋肉中のクドアの観察

クドアの検査方法として、顕微鏡によってクドア孢子を直接観察・計数する直接観察法と、クドアの 18SrDNA を検出する定量的リアルタイム PCR 法 (qRT-PCR 法) が厚生労働省の暫定検査法に記載されている。しかしこれまでの研究から、直接観察法で計数した孢子数と qRT-PCR 法で定量した DNA 量との間で相関性が低いことが明らかになっている。この原因のひとつとして、ヒラメ筋肉中には顕微鏡で観察できる成熟した孢子以外に、顕微鏡で観察することのできない未成熟なクドア細胞が同時に存在するため、孢子数と DNA 量との間で相関性が低くなっているのではないかと考え

られている。そこで、クドア寄生ヒラメの筋肉を用いて常法に従い走査型電子顕微鏡観察を行った。

8. *S. fayeri* 毒性タンパク質を標的とする遺伝子検査法の作成

厚生労働省が通知したサルコシスティス遺伝子検査法では、その 18S rRNA 遺伝子が標的になっている。感染（寄生）体のもつ共通の配列より、病的症状を誘発する物質をコードする遺伝子を標的とするほうが、病因検出の意義は大きい。住肉胞子虫が保有する毒性タンパク質は 2 個のエクソンから構成されている。そこで、病因論的な意義に加え、科学行政的な意義も勘案し、18R rRNA 遺伝子と、毒性タンパク質遺伝子エクソン-1 あるいはエクソン-2 の同時検出 PCR 法の検討を行った。

9. *S. fayeri* のアピコプラストゲノムの構造決定

アピコプラストゲノムの想定は以下の通りに行った。*de novo assemble* で得られたコンティグをデータベースに使用し、BLAST 検索を行い、アピコプラストのコンティグ（複数）を取得した。リファレンス配列には近縁種であり既に Gen Bank に登録されている、*T. gondii* のアピコプラスト配列（U87145、以下 U87145 と略）を用いた。U87145 を参考にして、コンティグの並びを予測した。コンティグ末端の相同な配列部分でコンティグを接続し、アピコプラスト

ゲノムの全長を想定した。想定配列におけるコンティグの接続が正しいことを PCR-sequence で確認した。確定した *S. fayeri* アピコプラストゲノムの配列に、アノテーションを付与した。

tRNA のアノテーションの位置と種類は、tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) を使用して確認した。参考にした U87145 の配列には遺伝子途中で終止コドンがあるなど不完全な部分があり、*Toxoplasma* と *Neospora* のアピコプラスト配列を別途用意し、比較した。最終的に、本研究で U87145 を参考に作成した *S. fayeri*、*Toxoplasma*、*Neospora* の 3 つのアピコプラストゲノム配列、U87145、さらに U87145 とは独立の *Eimeria tenella* (AY217738)、計 5 つのアピコプラストゲノムの配列を使用して、CLC Genomics Workbench でアライメントを作成し、遺伝子の異同を確認した。

C. 研究結果

1. クドアによる下痢および嘔吐発症機構の解析

マウスにクドア胞子を経口投与後 1.5 時間では、腸管上皮細胞にクドア胞子が接着し、その極囊から極糸と考えられる管状の構造体が腸管上皮細胞に貫入している像が観察された。免疫電子顕微鏡解析を行い、同様の現象が生じている部分を観察したところ、極囊から生じた管状の構造体に金コロイドが結合することがわかった。実験に

供したニワトリ抗クドア孢子抗体は、孢子殻、孢子原形質および極糸に反応する。以上のことから、極囊から生じた管状構造体は極糸であり、孢子から弾出された極糸が腸管上皮細胞に貫入することがわかった。クドア孢子が作用した腸管上皮細胞では、微絨毛が変性・消失し、小胞体が膨化する像が観察され、孢子が腸管上皮細胞に障害を及ぼすことがわかった。また、孢子原形質と推定される構造体が障害を受けた腸管上皮細胞内に観察されることもあった。クドア孢子は、腸管上皮細胞の微絨毛を変性・消失させるだけでなく、ミトコンドリアを膨化させ、最終的には細胞を崩壊させることが確認された。加えて、この崩壊した細胞と隣接する細胞にもミトコンドリアの膨化といった障害が起きることが確認された。

クドアによる嘔吐発症機序を明らかにするために、スunksにヒラメから精製したクドア孢子を経口的に投与したところ、スunksの腸管でセロトニン陽性細胞が増加した。Caco-2細胞の培養上清中に含まれる物質を調べたところ、クドア刺激によってMIP-3 α 濃度が著しく上昇することが明らかになった。また、QGP-1細胞にはMIP-3 α に対するレセプターであるCCR6が発現していた。そこで、リコンビナントのヒトMIP-3 α をQGP-1細胞に接種すると、QGP-1からセロトニンが産生されることが明らかになった。

2. クドアのゲノム解析およびミトコンドリア遺伝子多型を用いたクドアの系統分類
食中毒事例、韓国産（市場流通品）、養殖場由来の合計117検体（少数の重複あり）を調べたところ、cox1-1かつ1-rRNA -1が66検体（ST1）、cox1-2かつ1-rRNA -2が49検体あった（ST2）。cox1-1かつ1-rRNA -2、あるいはcox1-2かつ1-rRNA -1の組み合わせについては、1検体ずつしか検出されず、コンタミネーションなどの実験的な問題によるものと考えられる。韓国産（市場流通品）の検体は全てST1であった。また、食中毒事例の韓国産成魚は、一例を除いて全てST1であった。従って、韓国産成魚のクドアの殆どはST1であることが推測された。国内養殖所由来の検体は、ST1、ST2の両型が入り交じっていた。食中毒事例については、ST1が多い傾向はあったが、両型が観察された。愛媛の大規模食中毒事例では、ST1、ST2の両型が検出された。遺伝子型と食中毒症状（有症か無症か）には有意な関連がなかった（Fisher 正確検定 $P=1$ ）。また、遺伝子型とクドア量にも有意な関連はなかった（logクドア量のt検定 $P=0.95$ ）。

クドアの検体 201204 については全ゲノム配列 19,350bp を決定できた。クドア検体 0904 と比較すると、塩基配列の96~99%が一致していることが分かった。

K. iwatai については、まだ複数のコンティグに分かれたドラフト配列であるが、細胞呼吸に関する *COX1*, *COX2*, *CYTB*, *ND1*, *ND5*、及びリボソーム RNA の大サブユニット

は全て存在していた。5つの遺伝子のアミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、*K. iwatai*に比べると*K. septempunctata*と*K. neothunni*が近縁になっており、これは核のrDNAに基づく既知の系統関係と合致している。

3. ヒラメ喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

12事例の発症率は中央値が72.5%（範囲：37.1-100.0%）であった。ヒラメの重量は中央値が1.2kg（範囲：0.8-1.5kg）であった。ヒラメの喫食量は中央値が25.1g（範囲：11.3-88.0g）であった。1gあたりのクドアの孢子数は対数をとった値で、中央値は 1.2×10^7 個/g（範囲： 9.4×10^5 - 5.8×10^7 ）であった。クドア孢子摂取数は1gあたりのクドアの孢子数とヒラメの喫食量を乗じ対数を取った値とした。クドア孢子摂取数の中央値は 2.4×10^7 個（中央値： 4.9×10^7 - 3.1×10^9 個）であった。

発症率とヒラメの重量（ $r=-0.611$, $P=0.035$ ）及び発症率とヒラメの喫食量（ $r=0.394$, $P=0.205$ ）は相関係数が0.300以上であった。そのうち、発症率とヒラメの重量は有意な相関であった。発症率と関連する要因としてヒラメの個体重量、ヒラメの喫食量、クドア孢子数について重回帰分析を行った。重回帰分析はモデル1としてヒラメ重量、対数をとったクドアクドア孢子数、ヒラメ喫食量を独立変数とした。モデル2をヒラメ重量、ヒラメ喫食量を独

立変数とした。モデル1では、 R^2 は0.446で、 $P=0.173$ であった。発症率をヒラメの個体重量、クドア孢子数、ヒラメの喫食量として重回帰分析を行った。回帰係数はヒラメの重量が-43.3（ $P=0.075$ ）、クドア孢子数が0.3（ $P=0.975$ ）、ヒラメの喫食量が0.2（ $P=0.336$ ）であった。モデル2では、 R^2 が0.446で、 $P=0.070$ であった。発症率をヒラメの個体重量、ヒラメの喫食量として重回帰分析を行った。回帰係数はヒラメの重量が-43.3（ $P=0.058$ ）、ヒラメの喫食量が0.2（ $P=0.305$ ）であった。

4. クドアに対する迅速簡易検査法の作成

K. septempunctata 特異的なLAMP法および核酸クロマト法を開発した。これらの試験法と厚労省および農水省が通知した方法とで性能を比較したところ、従来法よりも時間短縮、コストの低減が可能であり、*K. septempunctata* に特異的な反応であることが利点であることが分かった。本研究で開発した2つの迅速簡便法が衛生管理の試験法として妥当であるかを5機関で評価した。その結果、農水省の通知法と同等の検出感度であることが示された。一方LAMP法では厚労省の食品衛生法で規定されている 10^6 孢子/g以上の感染ヒラメをスクリーニング法として確実に検出出来ることが示された。この値を厚労省通知法であるリアルタイムPCR法と比較してみても、検査が必要とされるコピー数 10^7 と同等の感度を有していることが確かめられた。

5. ヒラメ以外の海産魚に寄生する粘液胞子虫の種同定

ベトナム沖で採取したニホンイトヨリダイ (*Nemipterus japonicus*) に寄生する *Unicapsula pyramidata*、瀬戸内海防府沖で得たマハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) に寄生する *Unicapsula* sp. A、集団食中毒事例の原因食調査に際して入手したカンパチ (*Seriola dumerili*) に寄生する *Unicapsula* sp. B の3種を対象として *Unicapsula* 属の分子遺伝学的特徴づけを行った。*Unicapsula* sp. B は形態学的ならびに分子遺伝学的に *U. seriolae* と同定された。また、養殖水産業現場において、最近、新しい養殖魚種としてカワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*) が注目され、積極的な取り組みが始まっていることから、市販のウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*) を調査対象として粘液胞子虫寄生の可能性を探ったところ、*Kudoa* 属3種の体側筋寄生が検出された。観察された *Kudoa* 種は、4つの極囊/殻片をもつ2種 (*Kudoa* sp. A; *Kudoa thyrsites*) と6~7つの極囊/殻片をもつ *Kudoa septempunctata* であった。

6. クドア不活化法の検討

クドア食中毒の効果的な予防法を確立するために、リキッドフリーザーによるヒラメ筋肉中のクドア胞子の不活化を試みた。その結果、リキッドフリーザーは5分という短時間の凍結で、クドアを完全に失活さ

せることができた。また、ヒラメ筋肉の色調および破断特性は4℃保存のものと非常に近似しており、従来の凍結法に比べて肉質の変化が少ないことが示唆された。

7. ヒラメ筋肉中のクドアの観察

クドア寄生ヒラメの筋肉を観察すると、クドアはシスト様の構造物を作り存在していた。ひとつのシスト様構造物の中に成熟したクドア胞子と未成熟なクドア細胞が同時に存在していた。未成熟な細胞の分化段階は様々であり、一定していなかった。胞子と未成熟な細胞の比率は同一個体のヒラメでも観察部位によって異なっていた。部位によっては胞子と未成熟な細胞が約1:1の比率で存在したが、成熟した胞子でほとんど占められている部位も存在した。

8. *S. fayeri* 毒性タンパク質を標的とする遺伝子検査法の作成

毒性タンパク質の検出のために、アニーリング温度を53℃から60℃まで、1℃のピッチでグラディエントを設定し、PCRを行った。エクソン-1の断片の大きさは約150 bp になるが、泳動図で、約150 bp のバンドが明瞭で、かつ、副反応バンドがみられない条件を検討した。66℃のアニーリング温度が適していると判断した。

毒性タンパク質遺伝子エクソン-1あるいはエクソン-2の同時検出PCR法の検討を行った。エクソン-1と18S rRNA 遺伝子の同時検出を試みたが、エクソン-1のバ

ンドのみが検出された。エクソン-2についての同時検出では、18S rRNA のサイズである 1,100 bp 付近と、エクソン-2 のサイズとなる 150 bp 付近にバンドが認められた。しかしながら、1,100 bp 付近のバンドの強度は弱く、複数のバンドが検出されていて、最適な PCR 反応を示していなかった。

シカ肉から DNA を抽出し、サルコシステイス遺伝子検査法を実施した。DNA の抽出は、馬肉より抽出する方法と同じ手法を用いた。また、18S rRNA 遺伝子を検出する PCR 法も、厚生労働省が通知した方法を用いて実施した。その結果、馬肉と同様に、1,100 bp の位置に、DNA の増幅バンドが検出された。

9. *S. fayeri* のアピコプラストゲノムの構造決定

アピコプラストは原虫の生存に必須な細胞小器官で、有効な薬剤標的になり得ると言われている。本年度はアピコプラストゲノム配列を完成させるために、PCR-シーケンスを行ってコンティグ間の接続を確定させ、アノテーションを行った。完成したゲノムの大きさは 32,702bp で、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストゲノムに比べると、SSU rRNA 遺伝子の 1 コピーが少なく、2kb ほど小さかった。*Toxoplasma* と同様に AT の割合が 79% と著しく高く、終止コドンの UGA は Tryptophan として読まれていると想像された。アノテーションの結果は、tRNA 遺伝子が 26、rRNA 遺伝子が 3、*rps* 遺

伝子が 10、*rpl* 遺伝子が 6、その他の遺伝子に ORF B、C、D、E、F、*rpoB*、*rpoC1*、*clp*、elongation factor-Tu、*ycf24* homolog が含まれていた。植物と大腸菌で必須な遺伝子ではないと考えられる、*rpl36* 遺伝子が欠失していた。この作業の途中過程で、公共データベースから取得した次世代シーケンサーの生データを用いて、*Neospora caninum* と *T. gondii* のアピコプラストゲノムの配列も整備した。

D. 考察

1. クドアによる下痢および嘔吐発症機構の解析

クドアを経口投与したマウスの腸管の電子顕微鏡解析で、孢子（極嚢）から弾出された極糸が腸管上皮細胞の内部に貫入していたことから、クドアは、実際の交互宿主の腸管内で示す感染様式にしたがってマウスの腸管内で感染を試み、その結果として、腸管内に液体が貯留する可能性が考えられた。昨年度に実施したニワトリ抗クドア孢子抗体を用いた免疫染色による光学顕微鏡解析では、腸上皮に接着した孢子や腸上皮内にある孢子を確認することはできたが、顕著な炎症像は観察されなかった。以上のことから、クドア孢子は腸上皮に対して細胞レベルで障害を与えるが、腸上皮全体には炎症などの大きな障害をもたらさないと考えられた。今回の電子顕微鏡解析では、孢子から遊離した孢子原形質が単独で腸管上皮細胞に侵入する象や「穴」は観察され

なかったことから、クドア胞子は、*in vitro* 実験と異なる様式でマウスの腸管上皮細胞に障害を与える可能性が考えられた。

クドアを経口投与することによって嘔吐することが報告されているスunksにクドア胞子を経口投与し、腸管におけるセロトニン陽性細胞を計数したところ、空腸、回腸でセロトニン陽性細胞の著しい増加が認められた。一般的に知られている嘔吐メカニズムとして、異物の刺激を受けた EC 細胞がセロトニンを産生し、このセロトニンによって、脳の嘔吐中枢が刺激されるというものがある。こういったことから、クドア投与時に認められるスunksの腸管におけるセロトニン産生が、クドアによる嘔吐を引き起こしている可能性が示唆された。昨年度の本研究では、クドアが直接 EC 細胞を刺激し、EC 細胞におけるセロトニン産生を誘導する系と、クドアの刺激によって腸管細胞から EC 細胞を刺激する物質が放出され、この物質によって EC 細胞からセロトニンが産生される系の、2 種類の経路が存在することを明らかにしている。本年度の研究では腸管細胞から産生される EC 細胞に対するセロトニン産生誘導物質の同定を試みた。その結果、クドア刺激した培養腸管 Caco-2 細胞の培養細胞中に MIP-3 α が分泌されているのを確認した。またリコンビナント MIP-3 α によって刺激を受けた QGP-1 細胞からセロトニンが産生されることを明らかにした。以上の結果から、クドアが腸管に到達すると、その刺激によって腸管

細胞から MIP-3 α が分泌され、分泌された MIP-3 α の働きによって EC 細胞よりセロトニンが産生される。最終的にこのセロトニンの働きによって嘔吐中枢が刺激され、クドアによる嘔吐が引き起こされるという、クドアによる嘔吐発症メカニズムが示唆された。

2. クドアのゲノム解析およびミトコンドリア遺伝子多型を用いたクドアの系統分類
ミトコンドリア遺伝子多型により、クドアを ST1, ST2 の二つの系統に分類できることが分かった。国内養殖場からは ST1, ST2 両型が検出されたが、韓国産成魚の殆どは ST1 であった。従って、ミトコンドリア遺伝子多型はヒラメに寄生するクドアの由来の追跡(トレーサビリティ)に応用できる。ミトコンドリア遺伝子多型により区別されたクドアの二系統については、食中毒性の違いは検出されなかった。

ミトコンドリアゲノムについては、*Kudoa neothunni*、*Kudoa iwatai* の配列を解読した。ナナホシクドア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。この多様性を活かして、上記の系統解析が行えた。異なる種のクドアのゲノム配列が得られたので、今後の疫学解析のリソースとして利用できる。

核ゲノムについては、短い挿入長のライブラリに加えて中程度の挿入長のメイトペアライブラリを解読した。アセンブルは改善したが、まだ完成には至っていない。

光学マッピングを用いてナナホシクドア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。アセンブルの結果、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た。

3. ヒラメ喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

相関分析及び重回帰分析で、ヒラメの重量が増加すると発症率が減少し、ヒラメの個体の重量及びヒラメの喫食量が発症率と関連があった。ヒラメは成魚になるまでに3年程度かかる。養殖のヒラメは養殖開始から10ヶ月程度で出荷される。そのため、養殖されたヒラメは成魚になる前に出荷されている可能性が考えられ、ヒラメの個体そのものの免疫の状況などによる違いにより、個体の重量が増加すると発症率が減少する可能性が考えられた。一方で、本研究は地域相関研究であるため、交絡因子やバイアスに関する制御ができていない可能性がある。今後、個々の人を対象にしたヒラメの個体の重量、ヒラメの喫食量及びクドアの摂取量との関連を検討する必要がある。ヒラメ喫食量と下痢あるいは嘔吐の症状を呈することとの関連は有意ではなかったが相関係数が0.394で中程度の関連がみられた。ヒラメがクドアに汚染されている量が

異なったとしても、ヒラメの喫食量が増加することでクドアの摂取量が発症する閾値を超える事になるため関連が見られた可能性が考えられた。一方、クドアの汚染量は発症率との相関係数が-0.023で、関連がみられなかったことからクドアによりヒラメが汚染された孢子数よりはむしろヒラメの喫食量が下痢あるいは嘔吐を発症するための寄与が高い可能性が考えられた。本研究は地域相関研究であるために個人の状況の情報が得られないため、今後個人の状況を加味した検討ができる研究デザインでの検討が今後の課題である。クドア孢子の摂取量は中央値が 2.4×10^8 個（範囲： 4.9×10^7 - 3.1×10^9 個）であった。これまで、2010年に発生したアウトブレイク事例で推定された発病をきたす閾値の 7.2×10^7 と同程度のオーダーであることが考えられた。従って、本研究は地域相関研究ではあるが、バイアスや交絡因子の可能性は少ないことが考えられた。

4. クドアに対する迅速簡易検査法の作成

本研究で開発したLAMP法と核酸クロマト法の妥当性を、すでに通知法として発出しているPCR法（農水省通知法）とリアルタイムPCR法（厚労省通知法）と比較することで検証した。農水省では養殖場から出荷するときに、1ロットから30匹を無作為に抽出して*K. septempunctata*の有無の検査を行っている。今回効率がよい試験法であることも重要な点であることから30匹

すべてから一定量の検体を採取してプールすることを考えた。そのため、妥当性評価には、プールした被検体を使用している。その結果本研究で開発した両迅速簡便法とも、プール検体に対応が可能で有ることが示された。核酸クロマト法は、農水省通知と同等の感度を持ち、養殖場の出荷時検査や稚魚の導入時検査に適しており、LAMP法は厚労省の食品衛生法の遵守のための検査に適していることが示された。

5. ヒラメ以外の海産魚に寄生する粘液胞子虫の種同定

Uncapsula 属のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の塩基配列は *Kudoa* 属と高い類似性をもつこと、*Uncapsula* 属の種確認がまだ進んでいない現状においては、顕微鏡検査による胞子形態の確認を併用することが食中毒事例の原因究明において重要であることが考察された。

食中毒由来のカンパチから *U. seriolae* が検出されたが、他に有力視される原因病原体が確認されていないことを考慮すると、近縁の多殻目 *Kudoa* 属粘液胞子虫による食中毒原因としての可能性をも十分に検討される必要があると思われた。また、瀬戸内産ウマヅラハギから3種の *Kudoa* spp. が検出された。ウマヅラハギはこれまで特に粘液胞子虫感染を検討されて来なかった魚種であり、その感染種に強く興味をもたれるところであるが、その寄生種のうちの2種は食中毒原因として注目される *K. sep-*

tempunctata と死後筋肉融解の原因として注目される *K. thyrsites* であった。ヒラメ以外の海産魚から *K. septempunctata* が分離されたことから、ヒラメ以外の魚種についても *K. septempunctata* 寄生状況を確認し、対応していく必要があると思われた。

6. クドア不活化法の検討

クドアが寄生しているヒラメ筋肉を一般的なエアースラスト冷凍庫 (-30℃, -80℃) および液体冷媒を用いた急速冷凍法 (リキッドフリーザー) で凍結し、ヒト培養腸管細胞に対するクドアの毒性およびヒラメ筋肉の破断特性の変化について検討した。エアースラスト冷凍庫で -30℃, 4時間処理、-80℃, 1時間処理、リキッドフリーザーで5分の凍結処理でクドアは失活した。リキッドフリーザー処理ヒラメの破断特性は4℃冷蔵保管のヒラメの物と近似しており、ヒラメの筋組織が比較的良好に保持されていることが示唆された。これに対し、エアースラスト冷凍庫 -30℃, -80℃処理のヒラメは明確な破断点が消失しており、筋組織の変性が示唆された。また、リキッドフリーザー処理ヒラメの切り身は4℃冷蔵保存の物に近い色調、透明度を保持していたが、エアースラスト冷凍庫 -30℃, -80℃処理の切り身は白濁し、透明感が消失していた。以上の結果から、リキッドフリーザーによる凍結はヒラメの筋組織を比較の変性させずにクドアを失活させる方法として有用であることが示唆された。今後さらに条件を

検討することによって、クドア食中毒対策として利用できる可能性が示唆された。

7. ヒラメ筋肉中のクドアの観察

ヒラメ筋肉中のクドア細胞の分化・成熟の進行は同一個体のヒラメの中でも、また、ひとつのシスト様構造物の中でも一定していないことがあることが示唆された。直接観察法は孢子だけを計数するのに対して、qRT-PCR 法は孢子だけでなく未成熟なクドア細胞の DNA も検出すると考えられる。このため、孢子と未成熟な細胞の比率が検査結果に大きな影響を及ぼし、直接観察法による孢子数と qRT-PCR 法による DNA 量との相関性の低さにつながっているのではないかと考えられた。現時点では、直接観察法による孢子数と qRT-PCR 法による DNA 量に相関性が低い場合があるので、食中毒検査には孢子だけを検出する直接観察法が適していると考えられた。さらに、*K. septempunctata* 以外のクドア属の研究を行う場合も、検査法の選択と結果の解釈には注意が必要であると考えられた。

8. *S. fayeri* 毒性タンパク質を標的とする遺伝子検査法の作成

馬肉食中毒におけるサルコシステイス検査法を厚生労働省は通知した。顕微鏡検査に加え、遺伝子検査法が周知されている。その遺伝子検査法には、住肉孢子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的として、定性 PCR 法が記載されている。一方、病原微生物、感染性

微生物を検出するために、遺伝子検査法を開発する場合、直接の病原因子の遺伝子を標的とするのが通常である。そこで、本研究では、科学行政的な意義と、病因論からの妥当性の両方を満足させるため、住肉孢子虫の 18S rRNA 遺伝子と、毒性タンパク質遺伝子の双方を同時に検出する方法の開発を試みた。また、ウマに寄生する以外の種の住肉孢子虫が、シカに寄生し、シカ肉を喫食しての有症苦情事例が発生していることから、シカ肉を対象とした、住肉孢子虫の遺伝子検査法を検証した。*S. fayeri* の毒性タンパク質遺伝子を増幅させる PCR を、馬肉より抽出した DNA をテンプレートにして実施したところ、約 4,000bp のフラグメントが増幅されてきた。毒性タンパク質は 354bp で構成されていることから、ゲノム中では、同毒性タンパク質遺伝子は 2 個以上のエクソンから構成されていることが示された。この結果はゲノム解析の結果と一致した。研究班の泉山博士より、ゲノム中の塩基配列を解析した情報を入手し、2 つのエクソンの存在を確認できた。5' 端に位置するエクソン-1 は 250 bp、3' 端に位置するエクソン-2 は 154 bp で、エクソン-1 の 3' 端、エクソン-2 の 5' 端を相補するオリゴプライマーを用いて、エクソン-1 および-2 を検出する PCR 条件を検討した。アニーリング温度に勾配を持たせて解析したところ、エクソン-1 は 66°C、エクソン-2 は 60°C での、効率のよい増幅が観察され、この条件で、18S rRNA と各エクソン

の同時検出を試みたところ、エクソン2と18S rRNA 遺伝子断片の増幅が確認された。アガロース電気泳動像で見る限り、18S rRNA 遺伝子の増幅が最適でなく、今後、アニーリング温度以外の要因についても検討が必要であるが、同時検出法を確立できる可能性は十分に確認される。

シカに寄生する住肉胞子虫には、*S. hominis* や *S. suis*⁵⁾、*S. wapiti*、*S. sybillencis*⁶⁾ が報告されているが、シカニクからの住肉胞子虫遺伝子検査法は確立されていない。試みに、馬肉からの検査法を応用したところ、定性 PCR 法として、応用可能なことが示された

9. *S. fayeri* のアピコプラストゲノムの構造決定

馬肉生食による食中毒の病因物質と考えられている *S. fayeri* のアピコプラストに着目し、そのゲノムの構造と配列を決定し、アノテーションを付与した。PCR-シーケンスを行ってコンティグ間の接続を確定した。完成したゲノムの大きさは 32,702bp で、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストゲノムに比べると、SSU rRNA 遺伝子の1コピーが少なく、2kb ほど小さかった。他のアピコプラストゲノムと同様に AT の割合が 79% と著しく高く、終止コドンの UGA は Tryptophan として読まれていると想像された。アノテーションの結果は、tRNA 遺伝子が 26、rRNA 遺伝子が 3、*rps* 遺伝子が 10、*rpl* 遺伝子が 6、その他の遺伝子に ORF B、

C、D、E、F、*rpoB*、*rpoCl*、*clp*、elongation factor-Tu、*ycf24* homolog が含まれていた。植物と大腸菌で必須な遺伝子ではないと考えられる、*rpl36* 遺伝子が欠失していた。さらに公共データベースから取得した次世代シーケンサーの生データを用いて、*M. caninum* と *T. gondii* のアピコプラストゲノムの配列も整備した。

E. 結論

1. クドアによる下痢および嘔吐発症機構の解析

透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用い、クドア胞子投与後のマウスの腸管を観察した。その結果、クドア胞子は、腸管上皮細胞に作用し、微絨毛の崩壊、ミトコンドリアや小胞体の膨化、および細胞崩壊を起こすことがわかった。詳細な機序は不明だが、クドアは、極糸、胞子原形質あるいは胞子自体が腸管上皮細胞に障害を及ぼすことにより、腸管内に液体貯留を起こす、すなわち下痢を発症させると考えられた。

クドアによる嘔吐発症機序についてはクドア自身が直接 EC 細胞を刺激し、セロトニン産生を誘導する系とともに、クドア胞子が腸管に達すると、腸管上皮細胞から MIP-3 α が産生され、MIP-3 α の働きによって EC 細胞からセロトニンの産生が誘導される系の2種類の系が存在していることを明らかにした。最終的にセロトニンが脳にある嘔吐中枢を刺激し、嘔吐が引き起こされる可能性が示唆された。

2. クドアのゲノム解析およびミトコンドリア遺伝子多型を用いたクドアの系統分類

ミトコンドリア遺伝子多型により、クドアをST1, ST2の二つの系統に分類できることが分かった。国内養殖場からはST1, ST2両型が検出されたが、韓国産成魚の殆どはST1であった。この方法を用いてミトコンドリア遺伝子多型はヒラメに寄生するクドアの由来の追跡（トレーサビリティ）に応用できることが明らかになった。

ミトコンドリアゲノムと核ゲノムの配列解読を行った。ミトコンドリアゲノムについては、クドア種内では塩基配列の96～99%が同一であることを明らかにした。一方、クドアの種間では遺伝子領域のみが保存されていた。これらの遺伝子配列の違いは、検出系開発や疫学解析に応用できることが明らかになった。

クドアについては、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83mbで3本の染色体からなることが分かり、また二倍体であることが示唆された。

3. ヒラメ喫食に関連した原因不明食中毒の疫学的検討

クドアが寄生したヒラメの喫食による下痢または嘔吐の発病との関連を検討し、ヒラメの個体の重量とヒラメの喫食量が発病と関連することを明らかにした。12事例に

おけるクドア摂取量の中央値がこれまで報告した発病の閾値の推定値と同程度であった。

4. クドアに対する迅速簡易検査法の作成

クドア食中毒の衛生管理に適した試験法を開発することを目的として行った。ヒラメに感染するクドア属の寄生虫は食中毒病因物質と指定される *K. septempunctata* だけではないことから、*K. septempunctata*のみを特異的に検出する系を開発する必要性がある。短時間に確実に特異性の高い検査法を開発するには、遺伝子情報を用いた検査法が適していると考えられた。そこで核酸クロマト法とLAMP法を開発して、スクリーニング法としての妥当性を検討した。妥当性試験結果より、本研究で開発した2種類の迅速簡便試験法は、養殖場での出荷時検査または検疫業務における輸入検査に適用可能であると考えられた。

5. ヒラメ以外の海産魚に寄生する粘液胞子虫の種同定

市販のウマヅラハギから *K. septempunctata* が分離された。ヒラメ以外の魚種に対しても早急に粘液胞子虫調査を実施する必要性が認められた。

6. クドア不活化法の検討

リキッドフリーザーによる凍結法はクドアを短時間の処理で不活化することができ、またヒラメの肉質の変化を最小限に抑える

ことができるため、クドアの不活化法として有用であることが明らかになった。

7. ヒラメ筋肉中のクドアの観察

ヒラメ筋肉中には孢子になる前の未成熟なクドア細胞が存在することが明らかになった。孢子と未成熟細胞との比率は個体や部位によって異なるため、孢子と未成熟細胞との比率がクドア検査の結果に大きな影響を与えることが示唆された。

8. *S. fayeri* 毒性タンパク質を標的とする遺伝子検査法の作成

毒性遺伝子は2個のエクソンから構成されていた。PCRにおけるアニーリング温度の検討を行い、3'端側のエクソンと、18S rRNA遺伝子の断片を増幅できるPCR条件を設定できた。同条件のPCRにより、3'端側エクソンの増幅は明瞭であるが、18S rRNA遺伝子の増幅が弱く、今後、最適化させる必要が認められた。

馬肉を対象とした遺伝子検査法である定性PCR法を、シカ肉に応用したところ、住肉孢子虫18S rRNA遺伝子の共通配列部分の増幅が認められた。シカ肉における住肉孢子虫遺伝子検査法の確立が可能と考えられた。

9. *S. fayeri* のアピコプラストゲノムの構造決定

昨年度より継続して行っているアピコプラストゲノム配列を完成させるために、PCR

シーケンスを行ってコンティグ間の接続を確定させ、アノテーションを行った。完成したゲノムの大きさは32,702bpで、近縁の*Toxoplasma*のアピコプラストゲノムに比べると、SSU rRNA遺伝子の1コピーが少なく、2kbほど小さかった。また、公共データベースから取得した次世代シーケンサーの生データを用いて、*Neospora caninum*と*T. gondii*のアピコプラストゲノムの配列も整備した。

F. 研究発表

論文発表

1. Li Y-C, Sato H: Two novel myxosporean species (Myxosporea: Bivalvulida), *Myxobolus marumotoi* n. sp. and *Cardimyxobolus japonensis* n. sp., from the dark sleeper, *Odontobutis obscura*, in Japan. Parasitol Res [Published online: 31 January 2014, DOI 10.1007/s00436-014-
2. Kamata Y., Saito M., Irikura D., Yahata Y., Ohnishi T., BEsso T., Inui T., Watanabe M., Sugita-Konishi Y.: A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. in press, 2014
3. Ohnishi T, Oyama R, Furusawa H, Ohba N, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: *Kudoa septempunctata* was recognised by toll-like receptor 2 produced by a