

- RAW 264 macrophage-like cell line. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 30:1365-1369, 2013
4. Ohnishi T, Furusawa H, Yoshinari T, Yamazaki A, Horikawa K, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Electron microscopic study of *Kudoa septempunctata* infecting *Paralichthys olivaceus* (olive flounder). Jpn J Infect Dis 66:348-350, 2013
 5. Kikuchi Y, Ohnishi T, Furusawa H, Kawai T, Fukuda Y, Yokoyama H, Sugita-Konishi Y: ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw *Paralichthys olivaceus* (Olive Flounder) using a Chicken Anti-Kudoa Antiserum. Biocontrol Sci 18:193-197, 2013
 6. Li Y-C, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporidia: Myxozoa: Myxozoa: Myxozoa: Myxozoa) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol Res 112: 1991-2003.
 7. Ohnishi T, Akuzawa S, Furusawa H, Yoshinari T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Inactivation of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder Meat by Liquid Freezing. Biocontrol Science (in press)
 8. 大西 貴弘 : *Kudoa septempunctata* 感染症. 化学療法の領域 29 巻 増刊号: 258-263, 2013
 9. 大西 貴弘, 古沢 博子, 佐古 浩, 乙竹 充, 福田 穰, 吉成 知也, 山崎 朗子, 鎌田 洋一, 小西 良子: クドア食中毒および *Kudoa septempunctata* の季節による特徴. 日本食品微生物学会雑誌 30: 125-131, 2013
 10. 小西良子, 鎌田 洋一, 大西 貴弘: 新しい寄生虫性食中毒. 感染症 43: 25-28, 2013
 11. 原田誠也、古川真斗、徳岡秀亮、松本一俊、八尋俊輔、宮坂次郎、斉藤守弘、鎌田洋一、渡辺麻衣子、入倉大祐、松本 博、小西良子 : 馬肉中に含まれる住肉孢子虫の危害性消失条件の検討による生食用馬肉を共通食とする食中毒事例の発生防止対策に関する研究、食衛誌 54, 198-203, 2013
 12. 佐藤 宏 : 粘液孢子虫類の種鑑別・分類体系が直面する課題. 獣医寄生虫誌 12(2): 105-116.
- 学会・講演・シンポジウム
1. Yahata Y, T. Ohnishi, Y. Sugita-Konishi, 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)
2. Ohnishi T, Kikuchi Y, Furusawa H, Yoshinari T, Yamazaki A, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Invasion of *Kudoa septempunctata* increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer, IAFP European Symposium (2013.8)
 3. Sato H, Li Y-C, Jimenez LA, Tsuduki H, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y: Two genetic lineages of *Kudoa neothunni* in tunas (*Thunnus* spp.) distributed in the western Pacific Ocean and consumed in Asian countries. Aquaculture 2013, , Las Palmas, Gran Canaria, Spain, November 3-6, 2013.
 4. 大西 貴弘: クドアとサルコシスティスによる新しい寄生虫性食中毒, 農水省 食品安全に係る科学セミナー (2013.7)
 5. 李 迎春, 都築秀明, 佐藤 宏, Lea Angsinco Jimenez, 大西貴弘, 小西良子: キハダマグロ寄生 *Kudoa neothunni* にみられた rDNA 2 型性, 日本獣医学会 学術集会 (2013.9)
 6. 大西 貴弘: 平成 25 年度日本食品微生物学会研究奨励賞受賞者講演-クドア食中毒における原因究明と病態発現機構解析に関する研究-, 第 34 回日本食品微生物学会学術総会 (2013.10)
 7. 大西 貴弘, 古沢 博子, 吉成 知也, 山崎 朗子, 堀川 和美, 鎌田 洋一, 小西 良子: ヒラメ寄生クドアの電子顕微鏡観察, 第 106 回日本食品衛生学会学術講演会 (2013.11)
 8. 大西 貴弘: New parasitic food-borne disease outbreak, 岐阜大学・大学院教育改革支援プログラム研修コース (2013.12)
 9. 河合高生, 原田哲也, 陳内理生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子. 乳のみマウスを使用したクドア の下痢原性に関する研究 (4), 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 2013, 東京
 10. 久米田裕子. 謎の食中毒の正体は、クドア・セプテンクタータ, 第 15 回くらしのサイエンス講演会 古くて新しい寄生虫～魚に潜む危険を減らすには!～, 2014, 大阪
 11. 久米田裕子. 最新食中毒事情-寄生虫クドア・セプテンクタータによる食中毒の紹介-, 食品の品質保証懇話会, 2014, 大阪
 12. 李 迎春, 都築秀明, 佐藤 宏, Lea Jimenez, 大西貴弘, 小西良子: キハダマグロ寄生 *Kudoa neothunni* にみられた rDNA 二型性. 第 156 回日本獣医学会 学術集会, 岐阜大学, 2013.09.20-22.
 13. 李 迎春, 友知久幸, 迫田菜摘, 山木誠也, 佐藤 宏: 山口市内のドンコに寄生する *Myxobolus* 属粘液胞子虫. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜大

学, 2013.09. 20-22.

14. Binh Thi Tran, 李 迎春, Patrice Makouloutou, 山木誠也, 友知久幸, 迫田菜摘, 佐藤 宏: ベトナム産ニホンイトヨリダイから検出された粘液胞子虫 *Unicapsula pyramidata*. 第 156 回日本獣医学会学術集会, 岐阜大学, 2013.09. 20-22.
15. 李 迎春, 都築秀明, Lea Jimenez, 大西貴弘, 小西良子, 佐藤 宏: キハダマグロ筋肉寄生の *Kudoa neothunni* および *Kudoa thunni* の種内 rDNA 遺伝子の変異について. 第69回日本寄生虫学会 西日本支部大会, 香川県高松市, 2013.10. 19-20.
16. 佐藤 宏, Ying-Chun Li, Bin Thi Tran, 大西貴弘: 瀬戸内産マハゼからの国内未記録 *Unicapsula* sp. ならびにベトナム産ニホンイトヨリダイからの *Unicapsula pyrami-data* について. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 愛媛大学, 2014.03. 27-28.
17. Ying-Chun Li, 友知久幸, 山木誠也, 佐藤宏: 山口市内の淡水魚ドンコの筋肉寄生 *Myxobolus* sp. と腸壁寄生の *Cardimyxobolus* sp. について. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 愛媛大学, 2014.03. 27-28.
18. 小西良子: ヒラメに寄生するクドアセプトンpunkタタの新しいスクリーニング検査法と妥当性評価. 日本水産学会春季大会, 2014.3月

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

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

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 阿久澤さゆり（東京農業大学 応用生物科学科）

Kudoa septempunctata（以下、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胞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。昨年度の研究でクドア刺激を行った培養腸管 Caco-2 細胞の培養上清中に、Enterochromaffin 細胞（EC 細胞）のモデル細胞として利用されている QGP-1 細胞からセロトニン産生を誘導する物質が含まれていることが明らかになっている。そこで、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。以上の結果から、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。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。

以前よりリアルタイム PCR でもとめたクドア DNA のコピー数と顕微鏡観察で計数した胞子数との相関が低いことが指摘されていた。そのためヒラメ筋肉中のクドアの状態を電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ、胞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胞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。このことから胞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。

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 $^{\circ}$ C 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。以上の結果から、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。

A. 研究目的

Kudoa septempunctata (以下、クドア) はヒラメの生食による食中毒の原因微生物である。クドアは一過性の激しい下痢や嘔吐を引き起こすことが知られている¹⁾。クドアの胞子が腸管に到達すると胞子から胞子原形質と呼ばれる細胞が放出され、この胞子原形質がヒトの腸管上皮細胞層に侵入し、障害を与えることが報告されている²⁾。このような胞子原形質の腸管細胞層への侵入によって、腸管上皮細胞層の透過性が亢進し、これが下痢発症メカニズムのひとつと考えられている²⁾。一方、クドアは嘔吐も引き起こす¹⁾。一般的によく知られている嘔吐発症機序として、異物が腸管に到達すると、腸管にある Enterochromaffin 細胞 (EC 細胞) を刺激し、EC 細胞からセロトニンが産生される。セロトニンは求心性迷走神経を刺激し、脳にある嘔吐中枢が活性化されるというものである。昨年度の報告書で、クドアが直接 EC 細胞を刺激し、セロトニン産生を誘導する経路と、クドア感染腸管細胞が EC 細胞を刺激する何らかの物質を産生しており、この物質によって EC 細胞がセロトニンを産生する経路の 2 つの経路によって嘔吐が引き起こされている可能性を報告した。本年度はクドアによる嘔吐発症メカニズムをさらに詳細に検討した。

ヒラメに寄生する *Kudoa septempunctata* (クドア) の検査方法として、顕微鏡によってクドア胞子を直接観察・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胞子数と qRT-PCR 法で定量した DNA 量との間で相関性が高くな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胞子以外に、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、胞子数と 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、ヒラメ筋肉中でクドアがどのように寄生しているのかを明らかにするため、ヒラメ筋肉に寄生するクドアの電子顕微鏡観察を行った。

クドア食中毒で現在大きな問題になっているのが、本食中毒の効果的な予防法が存在しないことである。クドアは凍結処理によって容易に失活するが、凍結処理によって肉質が変化し、食感を重視するヒラメの商品価値が低下してしまう。そのため、凍結処理をクドア食中毒予防に使用することができない。また、肉質の変化が少ない冷蔵保存では、1 週間程度、クドアが生存するため効果はない¹⁾。こういったことから、現在のクドア対策は、養殖場にクドア感染稚魚を導入しない、出荷前にスクリーニングを行い、クドア陽性ヒラメを出荷しない、また、輸入検疫においてクドア感染ヒラメ国内への流入を阻止することなどに重点が置かれている。つまり、流通経路に感染ヒ

ラメを流入させないように努力することしかできないのが現状である。このため万が一、流通経路にクドア感染ヒラメが入ってしまった場合、我々はそれに対処することができない。よって、ヒラメ出荷後に行うことのできるクドアの失活方法が必要であると考えられる。近年、冷気を食品に直接吹き付ける従来からのエアブラストフリーザーに代わって、液体の冷媒に直接食品を浸漬させるリキッドフリーザーの利用が浸透し始めている。リキッドフリーザーは液体の冷媒を利用するため、冷気を吹き付ける方法よりも熱伝導効率が良い。よって、食品中の水分が大きな氷の結晶に成長する前に凍結を完了させることができるため、凍結処理によって食品の細胞が破壊されにくくなり、解凍後も解凍前の鮮度を維持できるというものである。そこで本年度は、リキッドフリーザーをクドア失活法に利用できないか検討した。

B. 研究方法

1. ヒラメ筋肉中からのクドア胞子の精製

クドア感染ヒラメは独立行政法人 水産総合研究センター・増養殖研究所の佐藤純先生より分与いただいた。胞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 μ 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 μ 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 μ 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胞子が含まれているため、クドア胞子は 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胞子 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胞子が含まれているので PBS に浮遊させた。

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 μ 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。ヒト膵臓内分泌細胞 QGP-1 は 10% FCS および抗生物質を添加した RPMI1640 で維持した。すべての細胞は 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 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 10⁵ cells/ml を加え、37 $^{\circ}$ 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. Caco-2 細胞による MIP-3 α 産生量の測定

上記のとおり分化させた Caco-2 細胞に精製クドア孢子 (1×10^6 /ml) を接種し、2 時間後、培養上清を回収した。培養上清に含まれる MIP-3 α は Quantikine ELISA Human CCL20/MIP-3 α (R&D systems) で測定した。

4. 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 2×10^5 /well で播種した。37°C で 72 時間培養後、0.1% BSA と 2 μ 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。

5. スククスにおけるセロトニン産生細胞の検出

ヒラメから精製したクドア孢子を PBS に 5×10^7 孢子/ml に浮遊させ、ゾンデを用いて胃内に投与した。20 分後、小腸を取り出しホルマリン固定した。セロトニン産生細胞は抗セロトニンポリクロナール抗体 (株

式会社ニチレイバイオサイエンス) を用いた免疫染色によって検出した。空腸、回腸、結腸それぞれ 3 切片上のセロトニン陽性細胞を計数した。

6. MIP-3 α レセプターの発現

QGP-1 細胞における MIP-3 α レセプター CCR6 の発現は RT-PCR によって mRNA の発現として確認した。QGP-1 細胞より RNAeasy mini kit (キアゲン) を用いて RNA を抽出した。プライマーは CCR6-F (5' -ATTTCAGCGATGTTTTCGACTC-3') と CCR-R (5' -GGAGAAGCCTGAGGACTTGTA-3') を用い、RT-PCR は Superscript III/Platinum TaqMix (Life Technologies) で取扱説明書の指示に従って行った。内部コントロールとして β -ミクログロブリンをプライマー globlin-F (5' -CTCGCGCTACTCTCTTCTTTCTGG-3') と globlin-R (5' -GCTTACATGTCTCGATCCCACTTAA-3') で検出した。RT-PCR 後、PCR 産物はアガロースゲル電気泳動を行い、RNA の発現を確認した。

7. リッキドフリーザーを用いたクドア不活化の検討

ヒラメを 2 枚におろし 20g ずつの切り身に分け、それぞれをプラスチックバックに減圧封入した。切り身が入ったプラスチックバックを -30°C のエアースラストフリーザー (MDF-U338、三洋) もしくは -80°C のエ

アーブラストフリーザー (ULT-1386-5、Thermo Scientific) で1~5時間冷凍した。リキッドフリーザー (凍眠 TL-1、テクニカン) は冷媒を -30°C に冷却して使用し、1~5分間、プラスチックバックごと冷媒に浸漬した。冷凍処理後、プラスチックバックごと室温で解凍した。解凍後、破断特性をくさび型プランジャーと20Nロードセルを搭載したレオメーター (RE-33005S、山電) を用いて、プランジャーにかかる荷重とそれに伴うヒラメの歪率を測定することによって検討した。ヒラメは個体ごとに肉質、肉厚が異なるため、個体間で破断特性が一致しない。そのため、同じ個体から切り身を採取し、それぞれの冷凍処理を行った後に破断特性を測定した。ヒト培養腸管細胞への毒性の測定は既報に従い Caco-2 細胞におけるクドア孢子接種前と接種1時間後の経上皮電気抵抗を測定し、孢子を接種する前の経上皮電気抵抗値 (TER) を100%とし、接種1時間後の経上皮電気抵抗値との比率で毒性の評価を行った。試験は3回繰り返しておこない、その平均値を求めた。

C. 研究結果

1. スンクスにおけるセロトニン産生

これまでの我々の研究から、クドア孢子をスンクスに投与すると、スンクスが嘔吐することが明らかになっている¹⁾。そこで、クドアによる嘔吐がセロトニンを介した嘔吐中枢刺激によるものであることを確認するために、クドア孢子投与後のスンクスの

腸管におけるセロトニン陽性細胞の検出を行った。その結果、クドア孢子投与20分後、空腸、回腸でセロトニン陽性細胞の有意な増加が認められた (図1)。

2. 腸管における MIP-3 α の産生

昨年度の研究ではクドア孢子で刺激した Caco-2 細胞の培養上清を QGP-1 細胞に接種すると、QGP-1 細胞からセロトニンが産生されることを報告した。QGP-1 細胞はヒト膵臓の内分泌細胞由来で、腸管に存在する Enterochromaffin (EC 細胞) 細胞共通のマーカーを多く発現しており、EC 細胞のモデル細胞として利用されている³⁾。そこで、培養上清に含まれるセロトニン産生誘導物質の同定を試みた。分担研究者の黒田の研究から、クドア孢子で刺激すると、Caco-2 細胞における MIP-3 α の RNA の発現量が増加することが明らかになっている。そこでクドア刺激を行った Caco-2 細胞の培養上清中の MIP-3 α 濃度を ELISA で測定した。その結果、クドア刺激を行うと apical 側の培養上清中の MIP-3 α 濃度が著しく上昇することが明らかになった (図2)。

3. MIP-3 によるセロトニン産生誘導

MIP-3 α が Caco-2 細胞の培養上清に含まれるセロトニン産生誘導物質であるかどうか検討を行った。まず、MIP-3 α のレセプターである CCR6 が QGP-1 細胞で発現しているかどうか、mRNA の発現を確認した。その結果、QGP-1 細胞は CCR6 を発現しているこ

とが明らかになった(図3)。そこで、QGP-1細胞にリコンビナントヒトMIP-3 α を接種したところ、MIP-3 α の濃度に依存してQGP-1細胞からセロトニンが産生されることが明らかになった(図4)。しかし、Caco-2の細胞破砕液をQGP-1細胞に接種しても、QGP-1細胞からセロトニン産生は認められなかった。

4. ヒラメ寄生クドアの電子顕微鏡観察

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(図5a)。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(図5c-g)。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(図5h-i)。

5. リキッドフリーザーを用いたヒラメ筋肉中のクドア不活化の試み

4 $^{\circ}$ C冷蔵保管したヒラメからクドア胞子を精製し、Caco-2細胞に接種したところ、1時間後には胞子接種前の約20%にまでTERが低下した(図6)。TERの低下は腸管細胞層の透過性が亢進したことを示唆するため、クドア胞子がCaco-2細胞に対して毒性を示すことを確認できた。一方、1~3分

のリキッドフリーザー処理では4 $^{\circ}$ C冷蔵保管と同様にTERの低下が認められたが、5分の処理でTERの低下を抑制することができたことから、クドアの毒性が失活したことが示唆された。同様に、-80 $^{\circ}$ Cで1時間以上の処理を行うと、胞子接種前と比べてTERの低下を抑制することができたことから、クドアの毒性が失活したことが示唆された。-30 $^{\circ}$ Cでは5時間の処理を行ってもわずかではあるがクドアの毒性が残存した。

クドアの毒性が最も低下した冷凍処理時間(リキッドフリーザー5分、-80 $^{\circ}$ C1時間、-30 $^{\circ}$ C5時間)におけるヒラメ切り身の色調の変化を観察したところ(図7)、リキッドフリーザー処理では切り身の透明感が失われておらず、4 $^{\circ}$ C冷蔵保管の物と近似していた。しかし、-30 $^{\circ}$ C、-80 $^{\circ}$ C処理では切り身の透明感が失われ、白濁化が進んでいた。次に冷凍処理(リキッドフリーザー5分、-80 $^{\circ}$ C1時間、-30 $^{\circ}$ C5時間)と4 $^{\circ}$ C冷蔵保管のヒラメの破断特性を比較した(図8)4 $^{\circ}$ C冷蔵保管のヒラメでは歪率30%の付近に明確な破断点が観察された。

これはこの時点でレオメーターのプランジャーが切り身の表層を突き破ったことを示している。その後も歪率約38、44、48%で破断点が確認できた。これらの破断点はプランジャーが切り身の内部に侵入した後、筋肉内部の筋束(もしくは筋層)をプランジャーが突き破ったことを表している。リキッドフリーザー処理のサンプルも4 $^{\circ}$ C冷蔵保管と類似した破断特性を示し、歪率約

32、42、47%で破断点が観察された。破断点も明瞭で、切り身の硬さや内部の筋構造が比較的良好に保存されていることが示唆された。一方、-30℃処理では最初の破断点が現れるのが歪率約 50%で、4℃冷蔵保管やリキッドフリーザーに比べて遅れて出現することが明らかになった。この結果は切り身の硬さが失われ柔らかくなってしまい、荷重をかけてもプランジャーがなかなか切り身の表層を突き破れず、むしろ荷重をかけることによって切り身が崩れていく様子を示唆している。また破断点も非常に不明瞭であったことから、筋肉内部の筋構造が失われていることが示唆された。以上の結果から、-30℃処理を行うと筋肉の硬さが失われ柔らかくなり、切り身の品質が大きく低下したことが明らかになった。-80℃処理でも、最初の破断点の出現が歪率約 39%と 4℃冷蔵保管やリキッドフリーザーに比べて遅れて出現したことから、切り身の硬さが失われていることが示唆された。しかし、最初の破断点の出現が-30℃処理より低い歪率で見られたことから、切り身の硬さの保持という点で、-30℃処理よりは優れていると思われる。しかし、破断点は不明瞭なものであったことから、-30℃処理同様、筋肉内部の筋構造が失われていることが示唆された。これらの結果から、-80℃処理も-30℃処理同様、切り身の品質が大きく低下していることが示唆された。

D. 考察

クドア食中毒は激しい下痢や嘔吐を特徴とする。下痢発症メカニズムについてはクドアの孢子原形質の腸管細胞侵入がその原因の一つであることが明らかになっている。しかし、クドアがどのようにして下痢を引き起こすかについては明らかになっていない。そこで、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にクドア孢子を経口投与し、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⁴⁾。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。分担研究者の黒田らの研究から、クドアで刺激した腸管細胞では MIP-3 α の mRNA の転写が促進されること

が明らかになっている。このことはクドア刺激によって、MIP-3 α の合成圧力が腸管細胞にかかっていることを示唆する。このことから、クドア刺激によって MIP-3 α タンパクが分泌されている可能性が考えられたため、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 が分泌されているか確認した。その結果、クドア刺激によって MIP-3 α が腸管細胞より分泌されることが明らかになった。おそらくヒトや動物でクドア感染時に MIP-3 α が分泌される場合、潜伏時間の短さから新たに転写された mRNA から合成されたタンパクではなく、すでにタンパクとして細胞内に存在していた MIP-3 α が細胞外に分泌されるものと思われる。MIP-3 α がクドア刺激によって腸管細胞から分泌されることが明らかになったので、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かどうか確認したところ、QGP-1 細胞からセロトニンが産生されることがわかった。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。MIP-3 α は CC ケモカインの一種で、強力な白血球の遊走因子である。MIP-3 α がどのようにして EC 細胞からセロトニン産生を誘導するかについて

は明らかではないが、MIP-3 α は標的細胞の細胞内カルシウム濃度を上昇させ、脱顆粒を引き起こすことが報告されている⁵⁾。EC 細胞によるセロトニン分泌は、脱顆粒によっておこることが知られている。おそらく MIP-3 α はその脱顆粒誘導作用によって、EC 細胞からのセロトニン分泌を促進するものと考えられた。

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場合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。

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。エアブラスト冷凍庫で -30°C 、4時間処理、 -80°C 、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°C 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、エアブラスト冷凍庫 -30°C 、 -80°C 処理のヒラメは明確な破断点消失しており、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°C 冷蔵保存の物に近い色調、透明度を保持していたが、エアブラスト冷凍庫 -30°C 、 -80°C 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的に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。今回は切り身20g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。

E. 結論

1. クドア孢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。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. ヒラメ筋肉中の孢子と未成熟細胞と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。

3. 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。

F. 参考文献

1. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, 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 54:1046-1052, 2012
2. 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
3. Doihara H, Nozawa K, Kojima R, Kawabata-Shoda E, Yokoyama T, Ito H: QGP-1 cells release 5-HT via TRPA1 activation; a model of human enterochromaffin cells.. Mol Cell Biochem 331:239-245, 2009
4. 大西貴弘: *Kudoa* 属由来の毒性物質の作用機序に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 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:21-35, 2014

5. Al-Aoukaty A, Rolstad B, Giaid A, Maghazachi AA: MIP-3alpha, MIP-3beta and fractalkine induce the locomotion and the mobilization of intracellular calcium, and activate the heterotrimeric G proteins in human natural killer cells. *Immunology* 95:618-624, 1998
- G. 研究発表
- 論文発表
1. 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 RAW 264 macrophage-like cell line. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 30:1365-1369, 2013
2. Ohnishi T, Furusawa H, Yoshinari T, Yamazaki A, Horikawa K, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Electron microscopic study of *Kudoa septempunctata* infecting *Paralichthys olivaceus* (olive flounder). *Jpn J Infect Dis* 66:348-350, 2013
3. Kikuchi Y, Ohnishi T, Furusawa H, Kawai T, Fukuda Y, Yokoyama H, Sugita-Konishi Y: ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw *Paralichthys olivaceus* (Olive Flounder) using a Chicken Anti-Kudoa Antiserum. *Biocontrol Sci* 18:193-197, 2013
4. Ohnishi T, Akuzawa S, Furusawa H, Yoshinari T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Inactivation of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder Meat by Liquid Freezing. *Biocontrol Science* (in press)
5. 大西 貴弘: *Kudoa septempunctata* 感染症. *化学療法の領域* 29 巻 増刊号: 258-263, 2013
6. 大西 貴弘, 古沢 博子, 佐古 浩, 乙竹 充, 福田 穰, 吉成 知也, 山崎 朗子, 鎌田 洋一, 小西 良子: クドア食中毒および *Kudoa septempunctata* の季節による特徴. *日本食品微生物学会雑誌* 30: 125-131, 2013
7. 小西良子, 鎌田 洋一, 大西 貴弘: 新しい寄生虫性食中毒. *感染症* 43: 25-28, 2013
- 学会・講演・シンポジウム発表
1. Ohnishi T, Kikuchi Y, Furusawa H, Yoshinari T, Yamazaki A, Kamata Y, Sugita-Konishi Y: Invasion of *Kudoa septempunctata* increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer, IAFP European Symposium (2013.8)
2. 大西 貴弘: クドアとサルコシステイスによる新しい寄生虫性食中毒, 農水省 食品安全に係る科学セミナー (2013.7)
3. 李 迎春, 都築秀明, 佐藤 宏, Lea

Angsinco Jimenez, 大西貴弘, 小西良子：
キハダマグロ寄生 *Kudoa neothunni* にみ
られた rDNA 2 型性, 日本獣医学会学術
集会 (2013. 9)

4. 大西 貴弘:平成 25 年度日本食品微生物
学会研究奨励賞受賞者講演-クドア食中
毒における原因究明と病態発現機構解析
に関する研究-, 第 34 回日本食品微生物
学会学術総会 (2013. 10)
5. 大西 貴弘, 古沢 博子, 吉成 知也,
山崎 朗子, 堀川 和美, 鎌田 洋一,
小西 良子:ヒラメ寄生クドアの電子顕
微鏡観察, 第 106 回日本食品衛生学会学
術講演会 (2013. 11)
6. 大西 貴弘: New parasitic food-borne
disease outbreak, 岐阜大学・大学院教
育改革支援プログラム研修コース
(2013. 12)

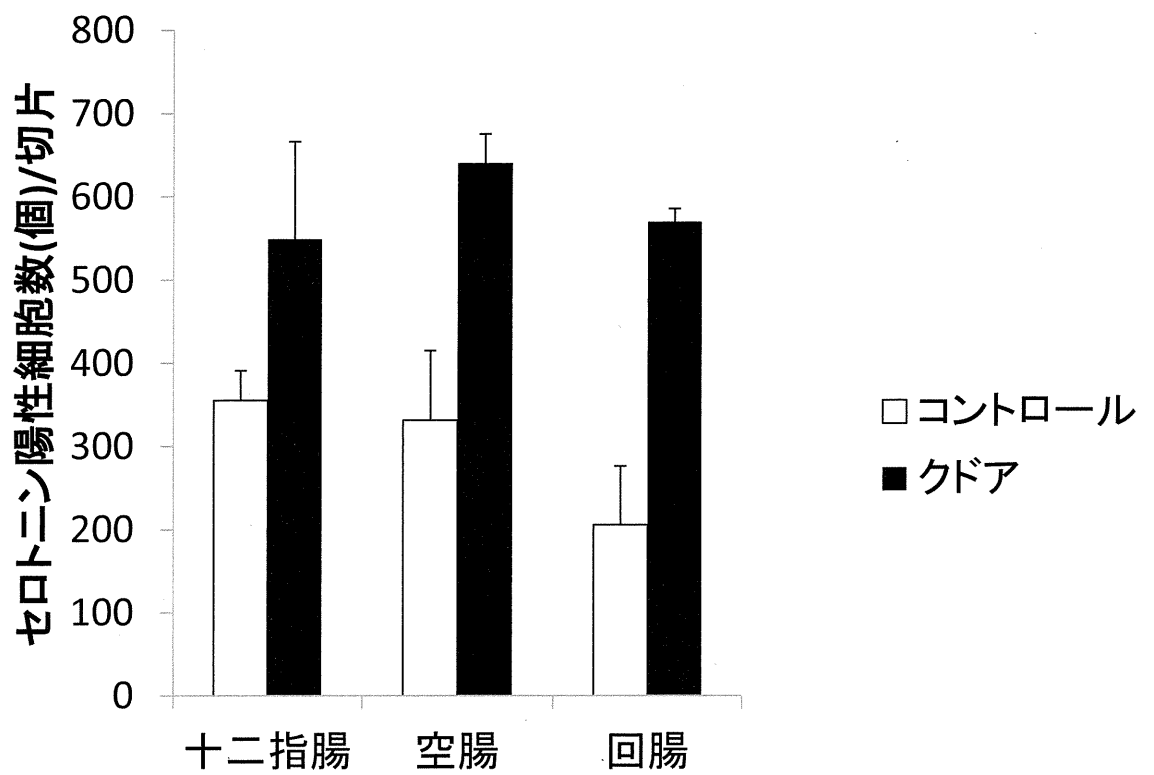


図1 クドアを経口投与したスunks腸管のセロトニン陽性細胞数

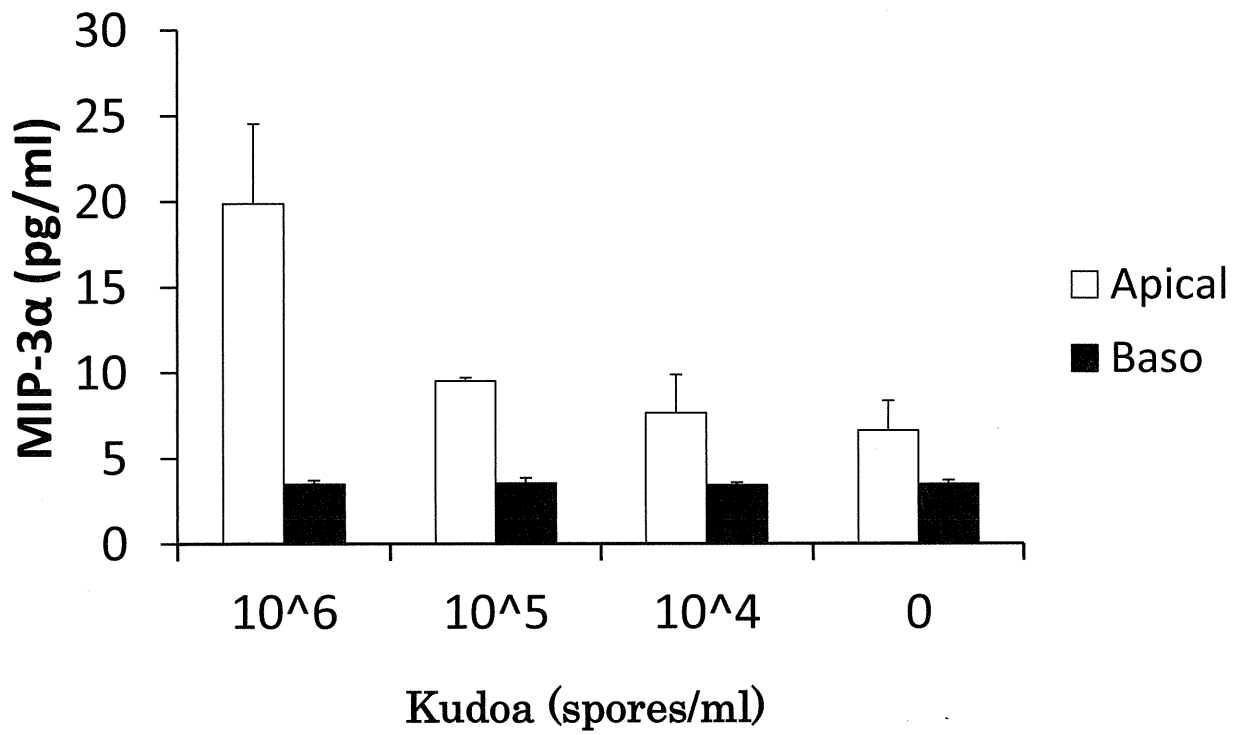
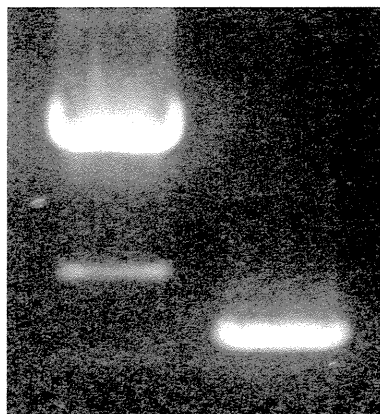


図2 クドア接種 Caco-2 細胞による MIP-3 α 産生



CCR6 β -マイクログロブリン

図3 QGP-1 細胞における CCR6 mRNA の発現

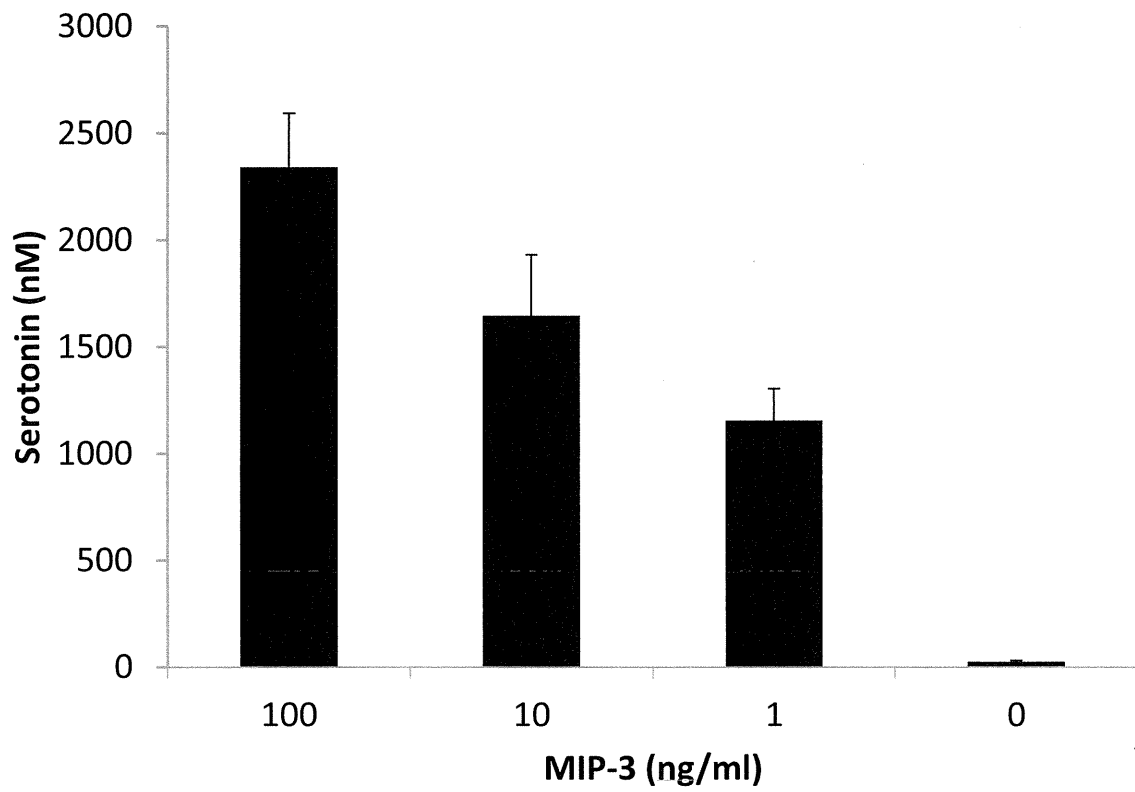


図4 リコンビナント MIP-3 α による QGP-1 細胞におけるセロトニン産生

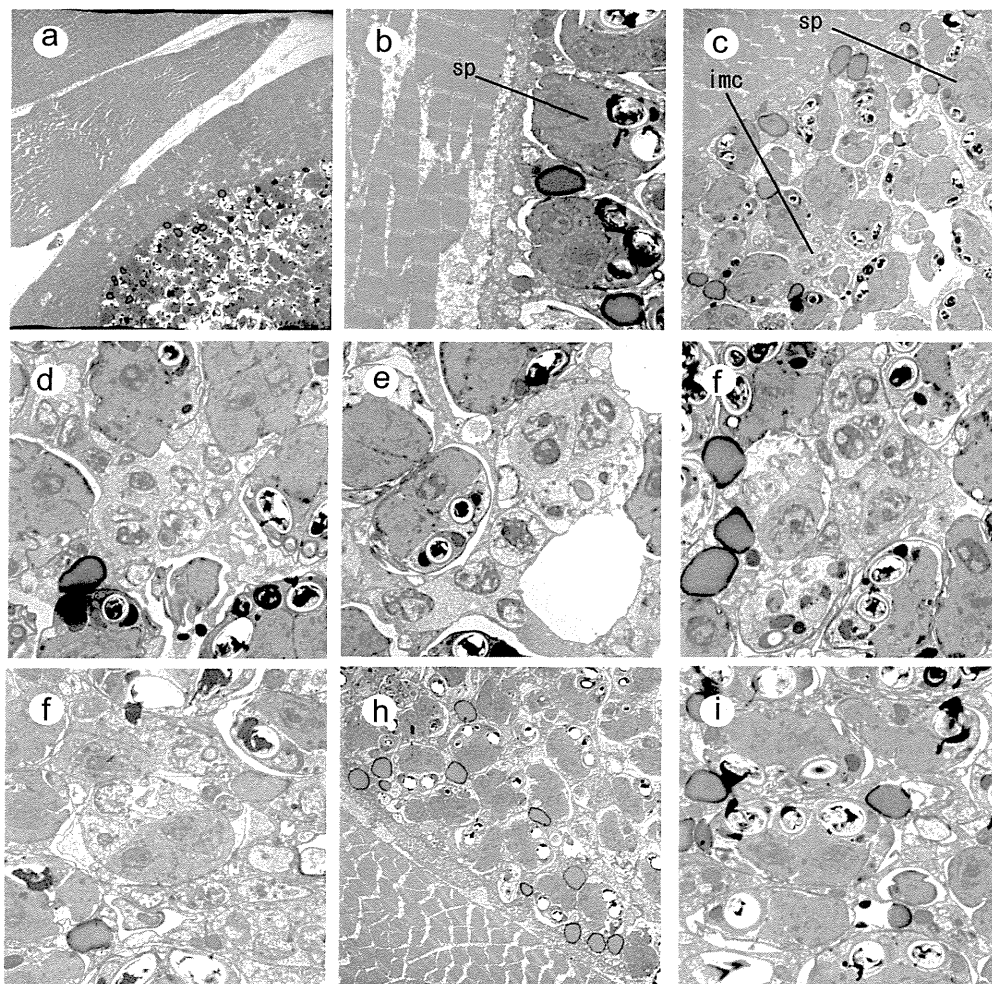


図5 ヒラメ筋肉中のクドア細胞の電子顕微鏡観察

a: ヒラメ筋肉中のクドア細胞, b: クドア胞子, c-g: 胞子の間に見られる未成熟細胞, h-i: ほとんど胞子で占められる部位. sp: 胞子, imc: 未成熟細胞