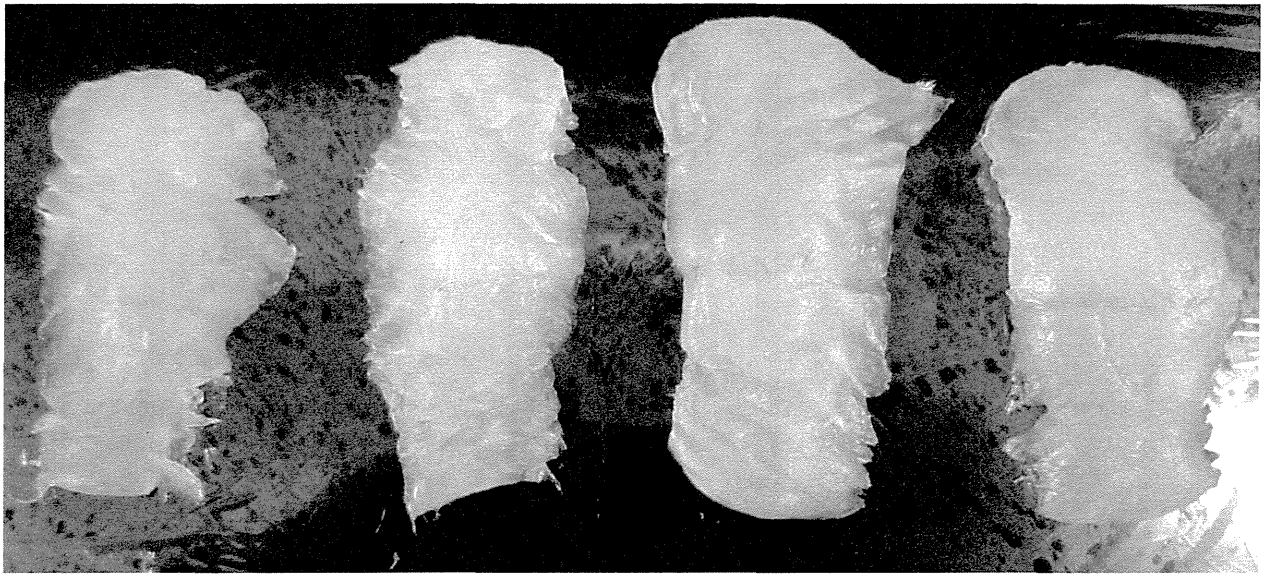


図6 冷凍方法の違いによるヒラメ筋肉中のクドア不活化効果の変化



Cold store (4°C) Liquid freezer (-30°C) Air blast freezer (-30°C) Air blast freezer (-80°C)
5 hours 5 minutes 5 hours 1 hour

図7 冷凍方法の違いによるヒラメ筋肉色調変化

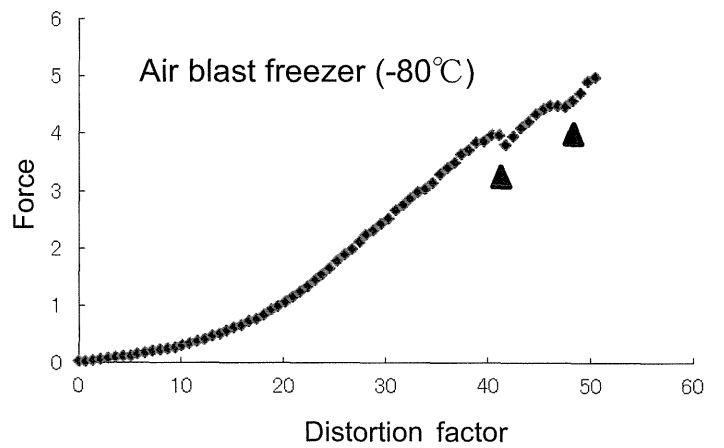
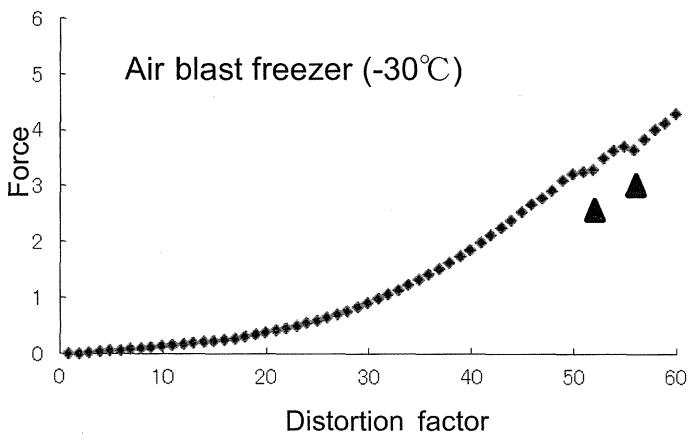
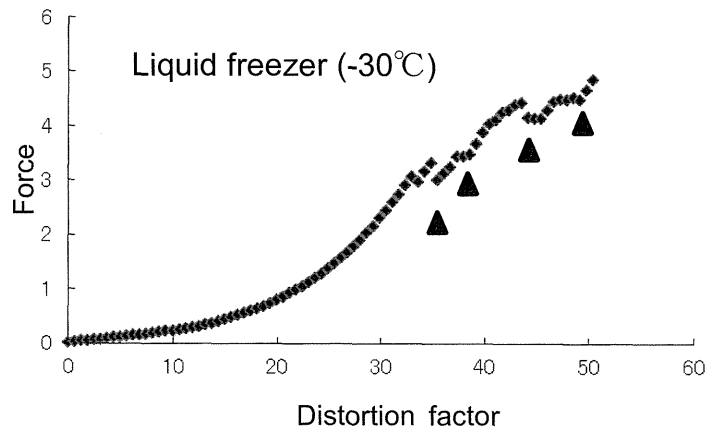
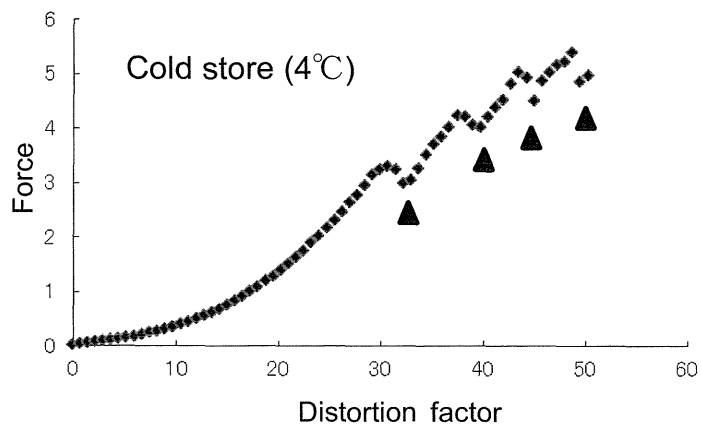


図8 冷凍方法の違いによるヒラメ筋肉の破断特性の変化

▲ : 破断点

分 担 研 究 報 告 書

クドアセプテンpunkタタの迅速簡易測定法に関する研究

小西 良子

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

クドアセプテンpunkタタの迅速簡易測定法に関する研究

研究分担者 小西 良子（麻布大学 生命・環境科学部）

協力研究者 黒田 誠（国立感染症研究所 ゲノムセンター）

協力研究者 竹内史比古（国立感染症研究所 ゲノムセンター）

協力研究者 森 広一郎（独立行政法人 水産総合研究センター）

協力研究者 米加田 徹（独立行政法人 水産総合研究センター）

協力研究者 福田 穰（大分県農林水産研究指導センター）

協力研究者 難波 豊彦（一般財団法人東京顕微鏡院）

協力研究者 吉成 知也（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究者 山崎 朗子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究者 古沢 博子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究者 石崎 直人（麻布大学 生命・環境科学部）

協力研究者 峯岸 恭孝（(株) ニッポンジーン）

協力研究者 宇治家武史（(株) カイノス）

クドア食中毒の原因となるクドアセプテンpunkタタを、迅速にかつ特異的に検出することは、食中毒予防対策のための衛生管理に重要である。現在通知法として、リアルタイム PCR や顕微鏡検査があるが、時間や費用がかさむ。そのため安価でかつ迅速簡便な方法が強く求められている。特に養殖現場や輸入検査時の検査は、スピードが重要である。そのため、本研究において、免疫学的測定法と遺伝子学的測定法の両面から、開発を試みた。

最終年度は、クドアセプテンpunkタタの表面抗原に対する抗体を作成したが、抗体価が期待ほど上がらなかったため、同時に開発を進めていた遺伝子学的測定法に転換した。遺伝子学的測定法としては、LAMP 法と核酸クロマト法を開発した。それぞれの妥当性を 5 機関での妥当性試験により検証した。その結果、核酸クロマト法は、 10^3 孢子/g のクドアを検出出来、農水省が養殖場における出荷検査のために開発した PCR 法と同等の感度を示した。一方、LAMP 法は、厚労省が定める食品衛生法違反 (10^6 孢子/g) である検体を効率よくスクリーニング出来る感度を示した。これらの結果から、本研究で開発した 2 種類の迅速簡便法は、それぞれの用途に応じた測定法に適応出来ることが示された。

A. 研究目的

クドア食中毒の病因物質として発見されたクドアセプトンクダタは、魚に寄生する粘液胞子虫である。平成23年6月に新しい食中毒病因物質として厚労省に認定されてから、本格的に食中毒と認識され¹⁾、また検査法が確立したことから、本食中毒の検査が行われるようになった。さらに平成24年12月末に食中毒事件票に「クドア食中毒」の項目が加わり、食中毒統計にクドア食中毒の実態が反映されるようになった²⁾。

そのような状況から、クドア食中毒の予防対策が農水省をはじめとして行われるようになった。農水省では、国内ヒラメを中心として、養殖場での予防措置が重要と考え、出荷前検査を行うよう指導を行った。また稚魚を養殖場に購入するときにも検査を行い、クドアフリーの養殖場をめざす指導を行っている。一方厚労省では、平成24年6月から輸入ヒラメに重点を置き、輸入時検査において、クドアセプトンクダタを発症推定量と考えられる 10^6 胞子/g 以上含むヒラメに対して、食品衛生法第6条違反を適応している。

このような食品衛生管理上のクドア試験に関しては、安価で、迅速簡易な試験法が切望されるが、現在通知されている方法は、リアルタイム PCR の手法と顕微鏡検査を組み合わせたものであるため、コストが高く、汎用的ではない。

そこで、本研究では特異抗体を用いた免疫学的測定法と遺伝子情報を用いた遺伝子学的測定法を確立して、安価で迅速簡便なクドア試験法の開発を目指した。

B. 研究方法

1. *K. septempunctata* 胞子の表面タン

パクの電気泳動

氷上にシャーレを置き、その中にヒラメ筋肉 1 g、PBS 5 mL 入れ、筋肉の上に 200 μ m メッシュを置き筋肉をほぐした。100 μ m ナイロンメッシュでろ過し、ろ液を 1500 rpm 15 分 10°C で遠心した。上清を捨て沈渣に PBS 1 mL 加えた。沈渣 1 mL を 30% Percoll に重層し、3500 rpm 30 分 4°C で遠心し、クドア画分を採取した。この画分を PBS で数回洗浄した。Percoll 処理後のクドア胞子 100 μ L に対して TritonX を 2 mL 加え、懸濁後 95°C 10 分ヒーティングブロックで加熱した。3000 rpm 10 分 4°C で遠心し、上清に 3 倍量のアセトンを加え -20°C 1 時間以上保存し、12000 rpm 30 分 4°C で遠心し沈殿をサンプルバッファー 1.5 mL に溶かし 12% スラブ電気泳動に用いた。

2. バンドからの抽出

電気泳動から得られたバンドを切り出し、1.5 mL チューブにいれ 200 μ L の抽出バッファーを加えゲルを細かく砕いた。更に 200 μ L の抽出バッファー(ゲル容積の 5 倍量)を加え一晩強く振とうさせた。抽出液をスピニングカラムに移し 1500 rpm 15 分 4°C で遠心しろ過液を集めた。遠心濃縮機を用いてろ液を 250 μ L 以下に濃縮した。1 mL (4 倍量)の氷冷アセトンを加え -80°C で 1 時間以上放置した。それぞれの抽出したバンドは、国立感染症研究所、ゲノムセンターの協力により、DNA シークエンス、アミノ酸シークエンスのデータベースより相動性の高い既知物質を推定した。

3. バンド3を抗原とする抗体作成

バンド3のアミノ酸シークエンスから、アルゴリズム解析を用いて、最も

抗原性の高いペプチドを82-95 番目 C+VRKTKYGEDKSEFNと推察した。このペプチドを作成して家兎に免疫を行ったが、抗体価は上がらなかった。

4. LAMP 法の開発

抽出バンドより得られたアミノ酸、DNA シークエンスからバンド3 の情報を基にプライマーを設計した(Table)

LAMP 法は、試料に 1.0M NaOH を 500 uL 添加し攪拌し 10 分放置した。1M Tris-HCl を 500 uL 添加し攪拌し、1500rpm 5 分 4°C で遠心し新たな 1.5 マイクロチューブに上清 100ul 回収し DW400ul 加え Template DNA とした。1 検体あたり 1.5×Isothermal Master Mix と 5×LAMP Primer Mix 5 uL の混合物を、Negative Control、Template DNA、Positive Control の順に、5 uL ずつそれぞれ添加した。Genie II にセットし 63°C 30 分反応させ、濁度を経時的にモニタリングした。本研究ではバンド3 からえられたプライマーを用いたが、プライマーを変えることにより、検出感度が上がることは確かめている。

K. thyr sites or *K. Lateolabracis* それぞれが感染するヒラメを用いて、本反応の特異性を検討した。

5. 核酸クロマト法の開発

すでに通知法として使用されているクダア 16S リボソーム DNA の情報から RNA 情報を解析しオリゴヌクレオチドのプローブを作成した

核酸クロマト法は、NASBA 法により RNA を増幅させた。すなわち試料に NASBA 試薬を入れ、ヒーティングブロック上で 45°C 1 分間反応させた。さ

らにヒーティングブロック上で酵素試薬をいれ 45°C 30 分間保温反応させた。

増幅反応終了後、1.5 mL エッペンドルフチューブに展開液を 3 滴下し、核酸クロマトストリップを挿し 3 分後目視で確認した。

K. thyr sites or *K. Lateolabracis* それぞれが感染するヒラメを用いて、本反応の特異性を検討した。

6. コンベンション PCR 法

農水省の通知法を用いて行った³⁾。試料を、キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit で DNA を抽出し、鋳型 DNA 1.0 uL、プライマー 1.0 uL、10×PCR 緩衝液 2.0 uL、TaqDNA ポリメラーゼ 0.1 uL、dNTP 1.6 uL、滅菌 DW14.3 uL を加え、サーマルサイクラーで反応させた。その後ローディングバッファー 2 uL に対しサンプルを 3uL 混合し、混合液の 3 uL をゲルのウェルに入れ泳動にかけ染色した。

用いたプライマーは、

KSf... GTG TGT GAT CAG ACT TGA TAT G
KSr... AAG CCA AAA CTG CTG GCC ATT T
であった。

7. リアルタイム PCR 法

厚労省の通知に準拠して行った⁴⁾。

8. 複数機関による妥当性試験

スクリーニングを目的として、新しく開発された核酸クロマト法、LAMP 法の妥当性を従来の測定法である PCR 法およびリアルタイム PCR と比較することで評価を行った。妥当性試験には以下の 5 機関が参加した。

1. 大分県農林水産研究指導センター
水産研究部

2. (独) 水産総合研究センター
増養殖研究所
3. 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部
4. (一般財団法人) 東京顕微鏡院
5. 麻布大学 生命・環境科学部

9. 配布サンプルの準備

K. septempunctata. 胞子が筋肉 1 グラムあたり 10^3 から 10^6 個含まれる感染ヒラメは (独) 水産総合研究センター 増養殖研究所から提供された。

K. septempunctata, *K. thyrssites* または *K. Lateolabracis* が全く寄生していないヒラメ (以下非感染ヒラメ) は大分県農林水産研究指導センター水産研究部から提供された。

本研究で開発した試験法は、衛生管理に用いることを前提にしているため、妥当性に用いる被検体は、30 匹ヒラメから筋肉を均等に採取して作成したプール検体を用いた。プール検体は、感染濃度の異なるヒラメ 1 検体 0.5g に、非感染ヒラメ 29 検体各 0.5g (計 14.5g) を混合して作成した。ブランクプール検体は、非感染ヒラメ 30 匹を用いた。1 機関につき 1 濃度 2 検体ずつ計 10 検体をブラインド方式で、5 機関に配布した

5 機関では、それぞれプール被検体 15 g をストマフィルターに移し、PBS を 15 mL 加え手で押しつぶした。LAMP 法用にストマフィルターを通すまえの混合物から 500 mg を 2 mL チューブに取り、ストマフィルターを通した液体を核酸クロマト用、PCR 用として各 500 μ L を 1.5 mL チューブに取り、それぞれの試験法で測定を行った (スキーム 1)。うち 1 機関だけは、同じ検体を用いて

厚労省通知法に従ってリアルタイム PCR 法を行った。

C. 結果

1. クドア胞子表面タンパクの精製と同定

Triton X を用いてクドア胞子表面タンパク質を抽出し、SDS PAGE に供した (Fig 1)。6 つのタンパク質がバンドとして検出された。それらの DNA とアミノ酸シーケンスを分析し、データベースより、既知のタンパクとの相同性を検索した結果、バンド 1 は既知のタンパクではあるが、機能が不明なものであり、バンド 2, 3 はともに鮭の heat shock protein との相同性が 73% であった (Table 1)。そのほかのバンドはデータベースで一致するものが無かった。そのため、バンド 3 を用いて抗原性の高いペプチドを検索し、そのペプチド抗体を作成した。また、DNA シーケンスからプライマーを作成し、LAMP 法に用いた (Table 2)。

2. 核酸クロマト法および LAMP 法の結果

核酸クロマト法は *K. septempunctata* の RNA を簡単な前処理をするだけで RNA が精製されることが分かった。その後 NASBA 法のキット (市販) を用いて 45 $^{\circ}$ C の保温下で計 31 分増幅したのち、ラテラルフローの原理でオリゴ DNA とハイブリダイゼーションさせることで黒いラインを得ることが出来た。クドアの濃度が濃ければ反応は早くかつ濃くでることが分かった。またクロマト上に内部標準の陽性コントロールをふくんでいるため、1 本ずつ反応が確実に行われたかが判定できた。また、オ

リゴ DNA の量を調節することにより、クドアの定性限界を調節できることも分かった

LAMP 法は、本研究で得られた表面たんぱく質のうちバンド 3 を用いてプライマーを作成した。操作としては、DNA 精製のための特別なキットなどは使わずアルカリ処理でできることが分かった。その後は従来の LAMP 法と同じ試薬が使い、良好な反応物が得られた。本 LAMP 法では、増幅器および検出器を一体型にして、コンパクトかつ安価である条件を満たしたものを開発した。その機器を用いて 30 分間反応させた。現在のところ一度に 8 検体まではかれるが、陽性コントロールおよび陰性コントロールを除くと 6 検体までが可能である。濁度は自動的に機器に表示される。

本研究で開発した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結果を Table 3 に挙げた。両者とも時間短縮、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。

3. 妥当性試験結果

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。評価手法としては、スクリーニングに用いることを考慮に入れて、被検体は 30 検体をまとめたプール検体とした。すなわち 30 検体の中に 1 匹感染ヒラメが入っているとすると、どの濃度まで検出が可能であるかで妥当性を判定した。

その結果を Table 3 に挙げた。核酸クロマト法では 3.3×10^2 孢子/プ

ール検体 (g) , すなわち 30 検体中 1.0×10^4 孢子/g の感染ヒラメ 1 匹が入っているケースが検出限界であり、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 1.1×10^5 孢子/ プール検体 (g) , すなわち 30 検体中 3.1×10^6 孢子/g の感染ヒラメ 1 匹が入っているケースが検出限界であり、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。

D. 考察

クドアセプテンpunkタタは形態的に 10um ほどの大きさであり、孢子と呼ばれる殻に覆われている。本研究では、すでにクドアのホモジネイトに対する抗体は出来ているため⁵⁾ クドア表面構造を認識する抗体の作成を試みた。表面に現れているタンパク質を Triton X によって抽出し、SDS-PAGE を行った結果、6 つのバンドが検出された。一般的に寄生虫は、宿主から認識されにくい構造物を表面に有していることから、特異抗体は作りにくいとされている。それぞれのバンドを切り取って酵素分解したのち TOF-MS でアミノ酸シーケンスを調べた。その情報を基に DNA シーケンスを解析し、相同性の高い既知のタンパク質を検索したところ、鮭の heat shock protein と相同性が高いことが分かった。そこで、このタンパクを用いて、抗体作成を試みたが抗体価が検査に耐えうるほど上がらなかったため、遺伝子学的試験法の確立を試

みることとした。

遺伝子学的試験法の長所は、対象となるハザードの遺伝子の情報があれば特異性の高い試験法が短時間で作成出来ることである。*K. septempunctata* が感染しているヒラメは、他種のクドア属寄生虫も感染している可能性が高い。また、その種類も増加している。このような背景から *K. septempunctata* に特異性の高い試験法を短時間で確立するには、遺伝子学的手法を用いた簡便法が適していると思われる。

本研究で開発した核酸クロマト法は、高価な機器をつかわずに専門技術なしに測定できる。遺伝子の増幅とクロマトを行う 2 ステップがあるが、いずれも容易な作業である。

LAMP 法は、すでに多くのハザードの検査に応用されている技術で有り、PCR 法のように電気泳動をする必要が無い利点がある。専用のチューブに試薬を加えていき、生成する濁度で測定することから、1 ステップで測定が終わる簡易な測定法である。

本研究では、開発した 2 種の試験法の妥当性を、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

E. 結論

本研究は、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。

F. 参考文献

1. 厚労省「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について」
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110617_02.pdf
2. 厚労省「食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行等について」
http://www1.mhlw.go.jp/topics/syokueihou/tp1228-1_13.html
3. 水産庁増殖推進部裁培養殖課長通知
www.maff.go.jp/.../pdf/130131_bi

[o_kudoa.pdf](#)

4. Kudoa septempunctata の検査法について (暫定版)

http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110711_01.pdf

5. Kikuchi, Y., et al. ELISA Detection of Kudoa septempunctata in Raw Paralichthys olivaceus (Olive Flounder) using a Chicken Anti-Kudoa Antiserum. *Biocontrol Science*, 2013, Vol. 18(4) 193-197

G. 研究発表

1. 小西良子ら、「ヒラメに寄生するクドア セプテン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

- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

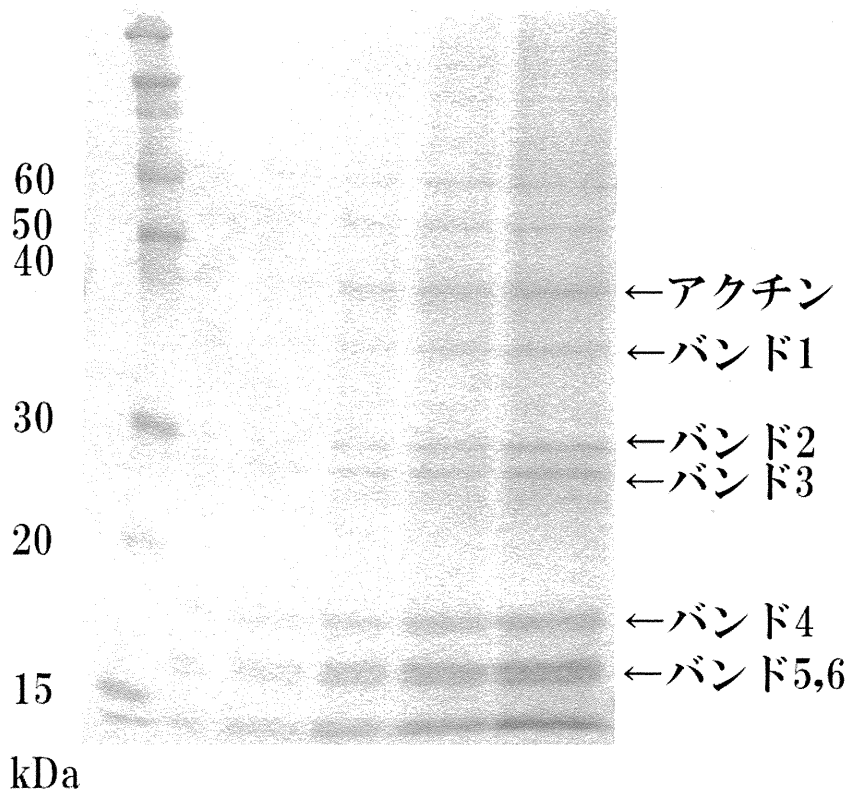


Fig.1. 新鮮な *K. septempunctata* 胞子の表面タンパク質の SDS-PAGE パターン

：

：

Table 1. SDS-PAGE から切り出したバンドの同定

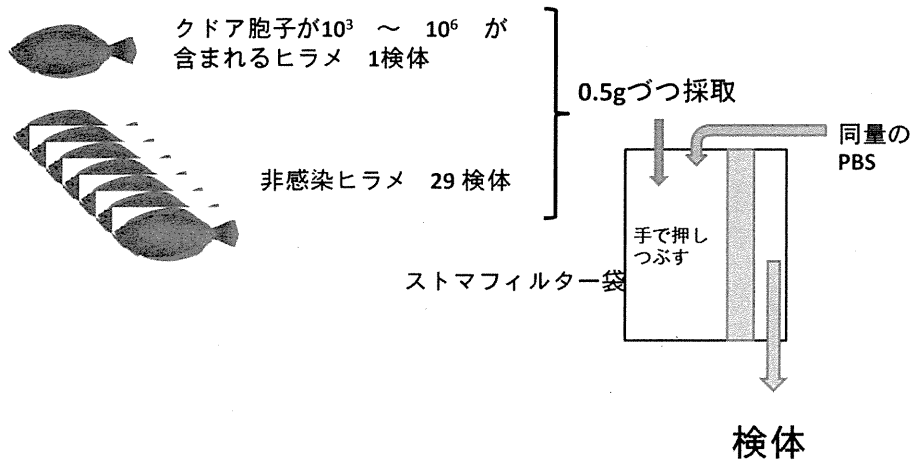
バンド	相同性
バンド 1	機能不明の既知のタンパク質と同一性あり
バンド 2or3	鮭由来 Heat shock protein と同一性 73%

Table 2 SDS-PAGE から抽出したバンド 3 を基に作成したプライマー (LAMP 法)

	Primer name	Primer sequence (5'→3')	base
C3 LAMP primer set	C3_FIP	TTG CGA ACG TGT CTT CCA TGA ACC GAT GAT GTG AAA TGG AA	41
	C3_BIP	ACC GTGAAT TTGAAC TTC CTG CCT AGA ACT CCA TCT GAA GTC AC	44
	C3_F3	CGT GTA CGT TGG AGA CTA TTC	21
	C3_B3	TCT TAT CAG ACT TGT CCT GGA	21
	C3_LoopF	ACC TTT ATT TTC CCT CCC TCG	21
	C3_LoopB	TGC TCA AAG ACT CTC TTC GTC	21

Table 3. 既知の通知法と本実験で開発した迅速簡便法との性能の比較

	定性的 PCR (農水省通知)	核酸クロマト 法	リアルタイム LAMP	リアルタイム PCR (厚労省 通知)
プライマー	Ribosomal 26S DNA	Ribosomal 16S RNA	Surface protein (C3)	Ribosomal 16S DNA
交差性	なし	なし	なし	あり
所用時間	3 時間 (不含 DNA 抽出)	1 時間 以 内 (含 DNA 抽 出)	1時間以内(含 DNA 抽出)	2 時間(不含 DNA 抽出)
必要器材	PCR 電気泳動	なし	なし	リアルタイム PCR



- 核酸クロマト法

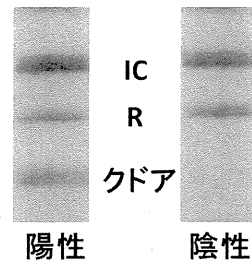
検体 (100 μ L) + クドア前処理液, vortex

NASBA 法

45°C 1分

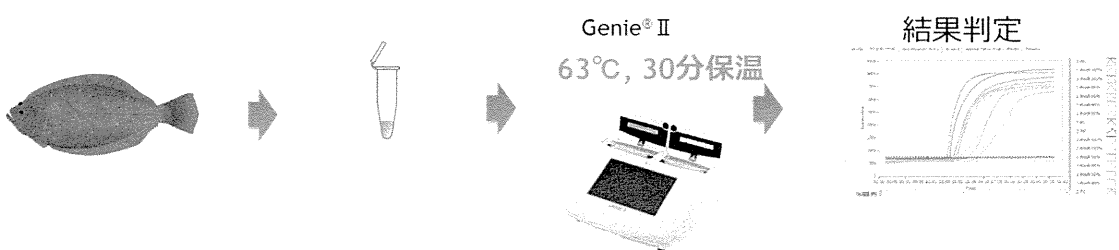
45°C 30分

核酸クロマト



IC (Internal control) : 増幅阻害把握用

- LAMP 法



- PCR 法 (農水省通知)

スキーム 1. クドア試験法 のプロトコール

Table 4. 妥当性試験結果

感染ヒラメの <i>K.septempunctata</i> 濃度	プール検体中の <i>K.septempunctata</i> 濃 度(/g)	定性的 PCR					核酸クロマト法					リアルタイム LAMP					リアル タイム PCR	
		機関 1	機関 2	機関 3	機関 4	機関 5	機関 1	機関 2	機関 3	機関 4	機関 5	機関 1	機関 2	機関 3	機関 4	機関 5	機関 5	
Blank	Blank	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	5.01E+03
1.0x10 ⁴	3.3 x 10 ²	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	5.91E+04
4.0 x10 ⁴	1.3 x 10 ³	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	5.61E+05
5.8 x10 ⁵	1.9 x 10 ⁴	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	1/2	1/2	1.77E+06
3.4. x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁵	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	3.03E+07

分 担 研 究 報 告 書

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 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（食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

乳のみマウスを用いた *Kudoa 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）

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）。しかし、本寄生虫の病原性の機序は明らかになっていない。我々は、*K. septempunctata* の下痢原性を下痢発症モデル動物である乳のみマウスを用いて研究を行い、「生きた」*K. septempunctata* 孢子が用量依存性にマウスの腸管内に液体を貯留させ、下痢を発症させることを明らかにしてきた。そして昨年度の調査研究で、*K. septempunctata* 孢子による腸管内の液体貯留は一過性であることを報告するとともに、抗 *K. septempunctata* 孢子抗体を用いた免疫染色を行い、*K. septempunctata* 孢子は腸上皮に作用するが、顕著な炎症を起こさないことを報告した。今年度は、より微細な構造が観察できる透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用い、*K. septempunctata* 孢子投与後のマウスの腸管を観察した。その結果、*K. septempunctata* 孢子は、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、*K. septempunctata* は、極糸、孢子原形質あるいは孢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。

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^{1,2,3)}、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）。

我々は、下痢発症モデル動物の乳のみマウスを用いて *K. septempunctata* 胞子の下痢原性を継続的に評価し、トリパンブルー色素排除能を有する、いわゆる「生きた」*K. septempunctata* 胞子が用量依存性にマウスの腸管内に液体を貯留させ、下痢を発症させることを明らかにしてきた。そして昨年度の調査研究で、*K. septempunctata* 胞子は一過性に腸管内に液体を貯留させることを明らかにするとともに、抗 *K. septempunctata* 胞子抗体を用いた免疫染色を行い、光学顕微鏡下で観察することにより、「生きた」胞子は腸上皮に顕著な炎症を起こさずに、腸上皮に接着し、腸上皮の内部まで侵入することを報告した。すなわち、*K. septempunctata* 胞子の腸上皮への接着・侵入が腸管内の液体貯留を惹起する可能性を示唆した。

一方、ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を使用した *in vitro* の実験では、腸管上皮様に分化させた Caco-2 細胞層に *K. septempunctata* 胞子を接種すると、約 1 時

間で透過性が亢進されること、および電子顕微鏡解析の結果、接種された胞子から胞子原形質が遊離し、この胞子原形質が Caco-2 細胞に侵入することが報告された⁴⁾。

そこで今年度は、*K. septempunctata* 胞子による下痢発症機序の解明を目的とし、腸管組織の変化をより詳細に明らかにするため、*K. septempunctata* 胞子投与後のマウスの腸管を電子顕微鏡下で観察した。

B. 研究方法

1. ヒラメ筋肉中の *K. septempunctata* 胞子の精製

ヒラメの筋肉を 1 g 秤量し、筋肉上に 200 μm 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* 胞子を粗抽出した。この粗抽出液を 100 μm 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、100 μm 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 $\times g$ で 15 分間、4°C で遠心した。得られた沈渣に *K. septempunctata* 胞子が含まれているため、沈渣を 1 mL の PBS で懸濁して *K. septempunctata* 胞子抽出液とした。パーコール処理によって *K. septempunctata* 胞子を精製する場合は、30%パーコール液の上層に 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* 胞子抽出液を 15%パーコール液の上に重層し、3,000 rpm で 1 時間、4°C で遠心し、その沈渣を PBS に浮遊させた(精製胞子液)。

2. 乳のみマウス試験

4 ~ 5 日 齢 の ddY マウスに *K. septempunctata* 精製胞子液を 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。

3. マウス腸管の電子顕微鏡解析

マウス腸管から十二指腸部位を切り取り、2%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド溶液と 2%四酸化オスミウム溶液で二重固定し、脱水後に Epoxy 樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルと鉛染色液で電子染色を施して透過型電子顕微鏡で観察した。また、脱水した試料を t-ブチルアルコールに置換し、凍結乾燥後、プラズマオスミウムコーティングを施して走査型電子顕微鏡で観察した。

さらに、マウス腸管の免疫電子顕微鏡解析のために、採取したマウス十二指腸部位を 4%パラホルムアルデヒド、0.1%グルタルアルデヒド混合固定液に固定した後、洗浄・脱水し、LR-White 樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、国立医薬品衛生研究所の菊池裕先生より分与を受けたニワトリ抗 *K. septempunctata* 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ニル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。

C. 研究結果

1. *K. septempunctata* 胞子の下痢原性 (透過型電子顕微鏡解析)

パーコール精製した *K. septempunctata* 胞子を乳のみマウスに投与し、経時的に FA 値を測定しつつ、マウス十二指腸を採取し、その微細構造を透過型電子顕微鏡で観察した。これまでの実験と同様に、FA 値は一過性に上昇し、投与後 1.5 時間で最高値を示した (データは示さず)。

K. septempunctata 胞子投与後 0 時間の腸管では、胞子が腸上皮細胞に接着している像が観察された (図 1)。投与後 1.5 時間では、腸管上皮細胞に *K. septempunctata* 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 (図 2)。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 (図 3A)、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 (図 3B)。実験に供したニワトリ抗 *K. septempunctata* 胞子抗体は、胞子殻、胞子原形質および極糸に反応する⁴⁾。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、胞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。

K. septempunctata 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 (図 2)、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 (データは示さず)。

K. septempunctata 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 (図 4)。また、*K. septempunctata* 孢子は、上皮細胞の一部を隆起させることもあった (図 5)。なお、凍結処理を施した *K. septempunctata* 孢子を投与した場合には、孢子によって障害を受けた腸管上皮細胞は観察されなかった (データは示さず)。

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を使用した *in vitro* 実験では、孢子から孢子原形質が遊離し、この遊離した孢子原形質が細胞内に侵入することが報告された⁴⁾。しかし、乳のみマウスの十二指腸では、孢子原形質が単独で腸管上皮細胞に侵入する像は観察されなかった (データは示さず)。

2. *K. septempunctata* 孢子の下痢原性 (走査型電子顕微鏡解析)

K. septempunctata 孢子投与後 1.5 時間および 3 時間の十二指腸を、走査電子顕微

鏡で観察した。腸上皮に接着した *K. septempunctata* 孢子は、腸上皮下に沈み込み、あたかも孢子が腸上皮内に陥入しているかのような像が観察された (図 6)。さらに、孢子が沈み込んだ領域の周辺部では、上皮の一部が隆起し、その頭頂部の微絨毛が変性して、微絨毛の先端が明瞭に観察できるようになった (図 7)。このような腸上皮の一部が隆起する現象は、透過型電子顕微鏡解析の結果 (図 5) と一致した。また、孢子が接着した腸上皮の周辺においても、顕著に変性した微絨毛が観察された (図 8)。

D. 考察

今回実施した電子顕微鏡解析により、*K. septempunctata* 孢子を乳のみマウスに投与すると、十二指腸では孢子が腸管上皮細胞に接着し、その孢子が接着した腸管上皮細胞では、微絨毛の崩壊、ミトコンドリアや小胞体の膨化、および細胞崩壊が起きることがわかった。このような障害を受けた腸管上皮細胞あるいはその隣接する上皮細胞には、極糸や孢子原形質が認められることがあった。生活環が唯一解明されている粘液胞子虫である *Myxobolus cerebralis* では、魚体外に出た孢子は、交互宿主である環形動物に経口摂取された後、腸管腔内で極糸を弾出して腸管上皮細胞に接着し、その後、孢子原形質が腸管上皮組織に侵入することが報告されている⁵⁾。*K. septempunctata* を含む粘液胞子虫類の生活環は、この *M. cerebralis* の生活環と同