

様であると考えられている。今回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（図 2、3）、*K. septempunctata* 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 *K. septempunctata* 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、*K. septempunctata* 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の結果、*K. septempunctata* 孢子は、その機序は不明であるが、最終的には腸管上皮細胞を崩壊させることがわかった。昨年度に実施した光学顕微鏡解析の結果、腸上皮内に *K. septempunctata* 孢子が認められたことから、孢子が腸上皮内に侵入すると考えた。しかし、孢子自体には運動性はないことから、崩壊した細胞の位置に存在した孢子を、上皮内に存在する孢子と見誤った可能性が考えられた。

腸管上皮様に分化させた Caco-2 細胞層

への *K. septempunctata* 孢子接種 *in vitro* 実験では、孢子から遊離した孢子原形質が Caco-2 細胞に侵入すること、さらに、この侵入過程で細胞に大きな「穴」が開くことが報告された⁴⁾。しかし、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、*K. septempunctata* 孢子は、*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。

本研究では、電子顕微鏡解析により *K. septempunctata* がマウスの腸管で細胞障害を起こし、そのため下痢が生ずると考えられた。しかし、その詳細な機序は不明のままであり、*K. septempunctata* の下痢発症機構の解明には、今後もさらなる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

1. *K. septempunctata* 孢子が接着した腸管上皮細胞内に、極糸や孢子原形質が観察された。
2. *K. septempunctata* 孢子が作用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、および細胞崩壊が観察された。
3. Caco-2 細胞を使用した *in vitro* 実験で認められた「孢子より遊離した孢子原形質」が単独で腸管上皮細胞に侵入する現

象は観察されなかった。

4. 下痢発症モデル動物の乳のみマウスでは、詳細な機序は不明だが、*K. septempunctata* 孢子は、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、腸管内液体貯留を起こすと考えられた。
5. Caco-2 細胞での *in vitro* 実験と乳のみマウスでの *in vivo* 実験における電子顕微鏡像の差異の要因を含め、*K. septempunctata* の下痢発症機構の解明には、今後さらなる検討が必要であると考えられた

F. 参考文献

1. Matsukane et al. *K. septempunctata* n. sp. (Myxosporidia: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol. Res.* 2010; **107**: 865-872.
2. Kawai et al. Identification of *K. septempunctata* 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. Harada et al. 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.* 2012; **50**: 2964-2968.

4. Ohnishi et al. *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013; **10**: 137-142.
5. El-Matbouli et al. Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporian stage in *Tubifex tubifex*. *Int. J. Parasitol.* 1998; **28**: 195-217.

G. 研究発表

論文発表

なし

学会・講演・シンポジウム発表

1. 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 *K. septempunctata* 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
2. 久米田裕子: 謎の食中毒の正体は、クドア・セプテンプンクタータ, 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

3. 久米田裕子：最新食中毒事情－寄生虫
クドア・セプトエン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

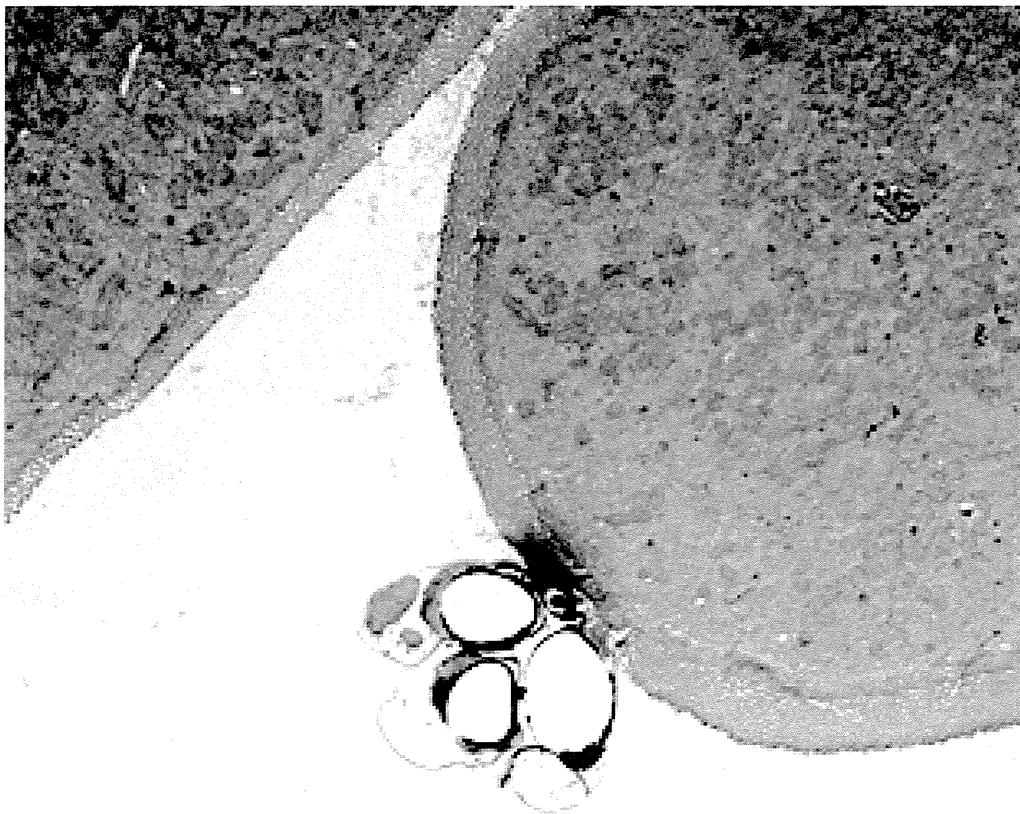


図1 腸管上皮細胞に接着した *K. septempunctata* 孢子 (投与後 0 時間)

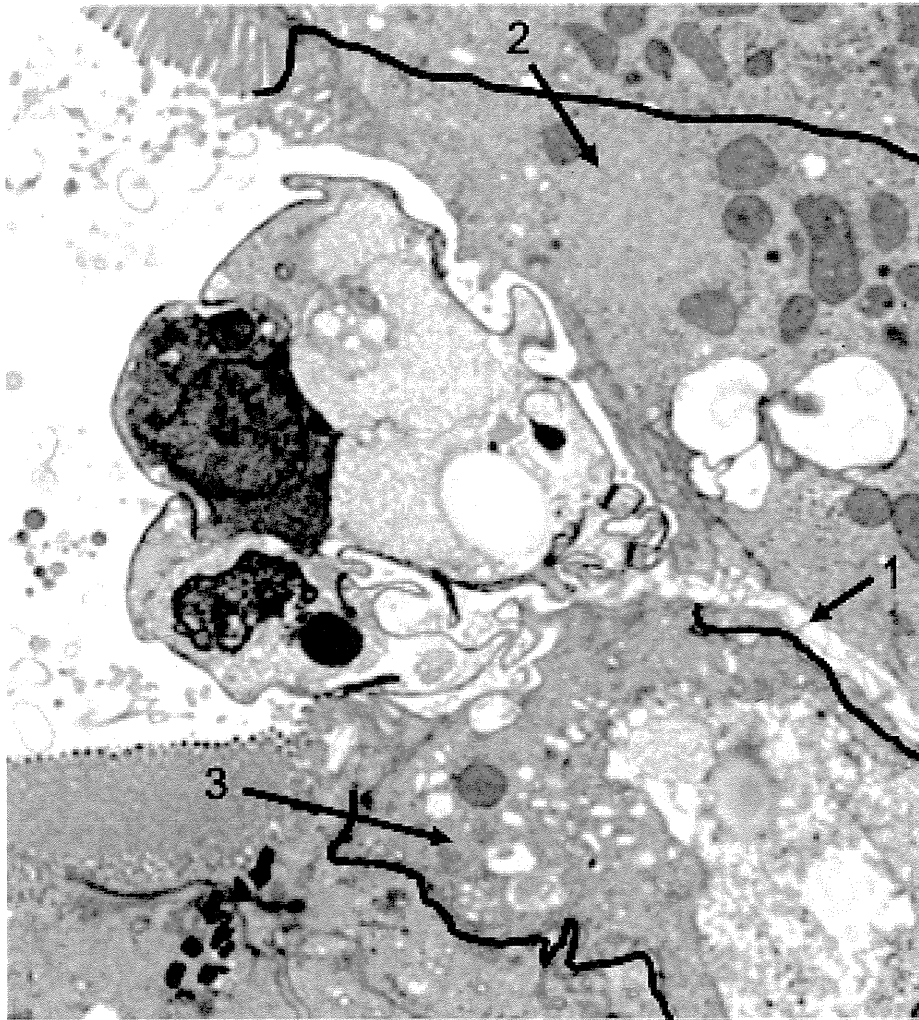
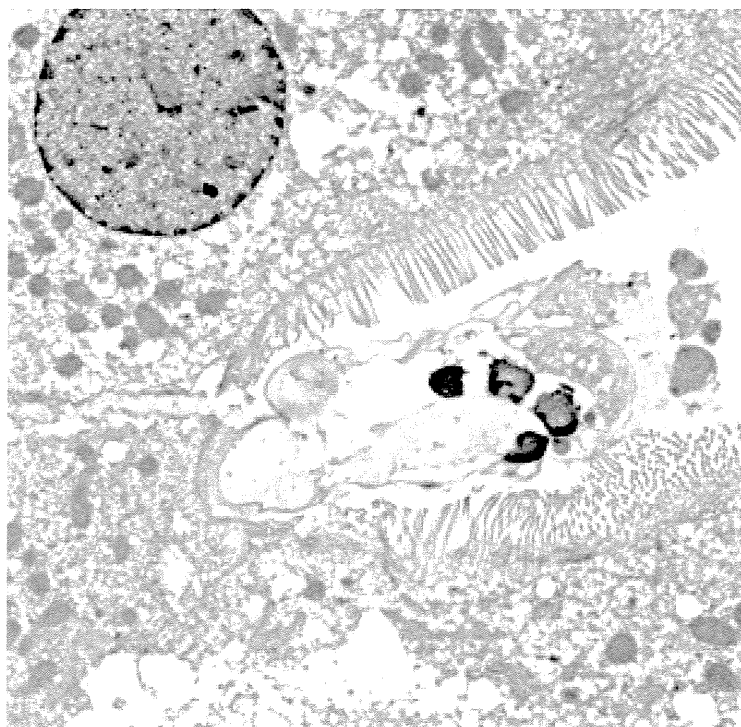


図2 腸管上皮細胞に接着した *K. septempunctata* 孢子 (投与後 1.5 時間)

- 1 : 極囊から弾出されたと考えられる極糸 2 : 微絨毛が変性・消失した上皮細胞
3 : 微絨毛が変性し、膨化した小胞体が観察される上皮細胞

(A)



(B)

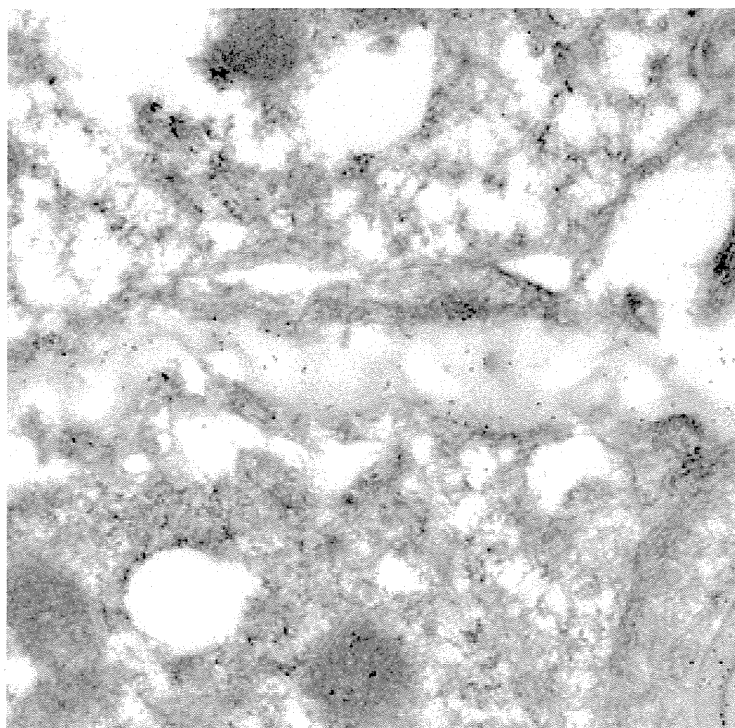


図3 *K. septempunctata* 胞子から弾出された極糸（免疫染色後の透過型電子顕微鏡像）

A (4,890倍) B (25,900倍)

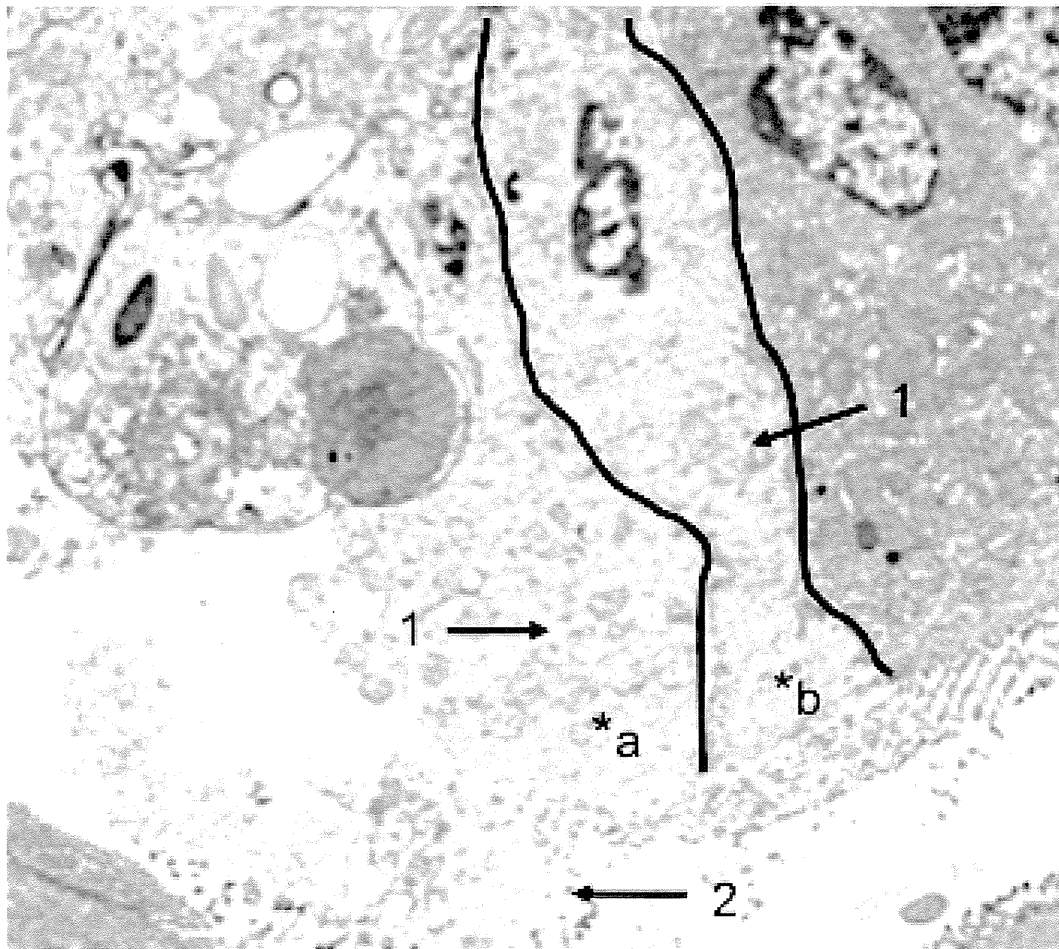


図4 *K. septempunctata* 孢子により障害を受けた腸管上皮細胞 (投与後 1.5 時間)

*a : *K. septempunctata* 孢子により障害を受けた細胞 *b : a の細胞に隣接する細胞
 1 : 膨化したミトコンドリア 2 : 変性した微絨毛

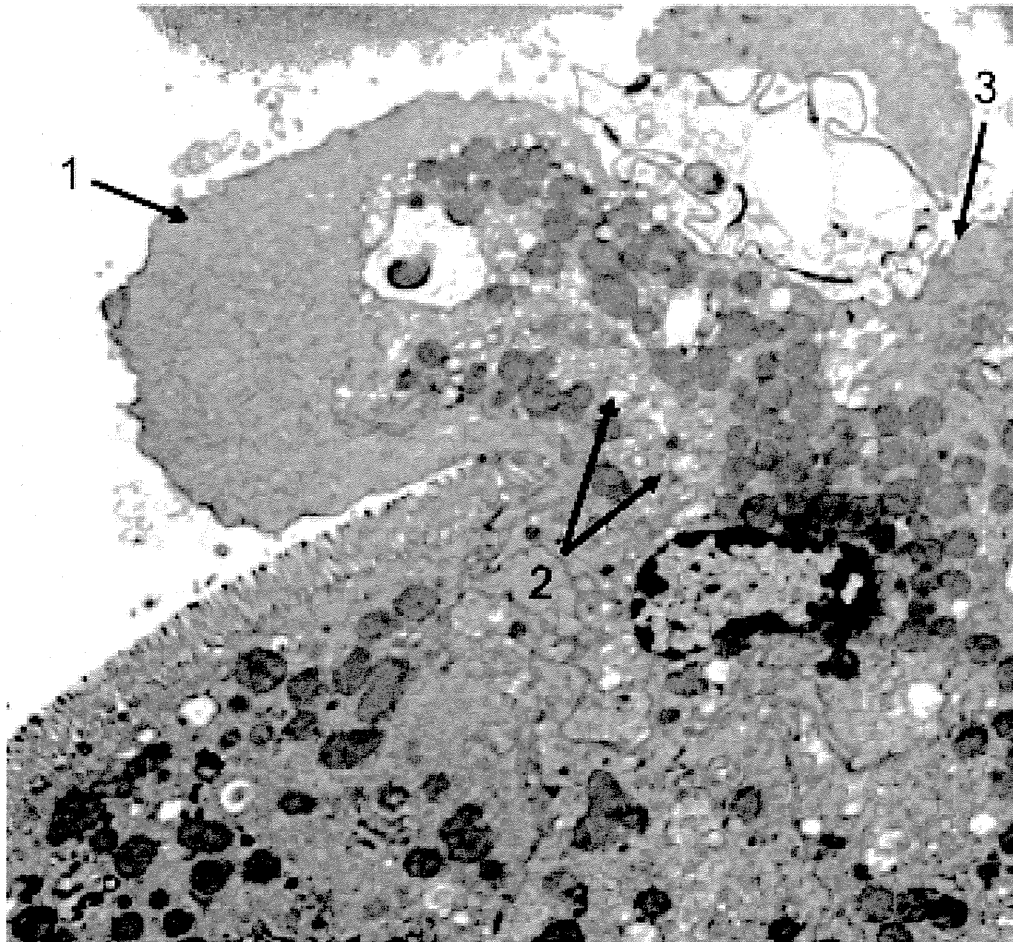


図5 *K. septempunctata* 孢子により障害を受けた腸管上皮細胞（投与後 1.5 時間）

1 : 隆起した上皮細胞の一部 2 : 膨化した小胞体 3 : 変性・消失した微絨毛

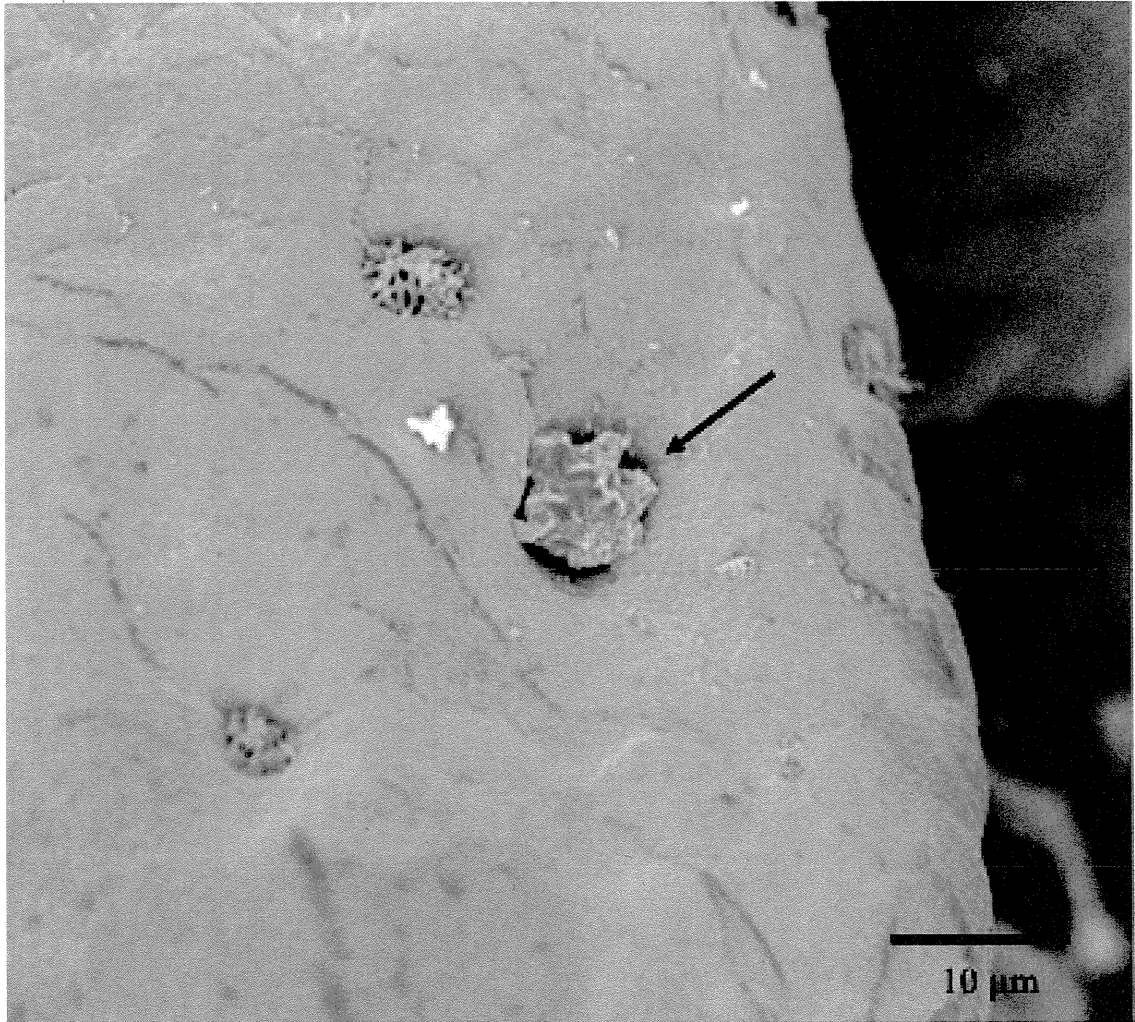


図6 腸上皮に接着した *K. septempunctata* 孢子 (投与後 1.5 時間)

矢印 : *K. septempunctata* 孢子

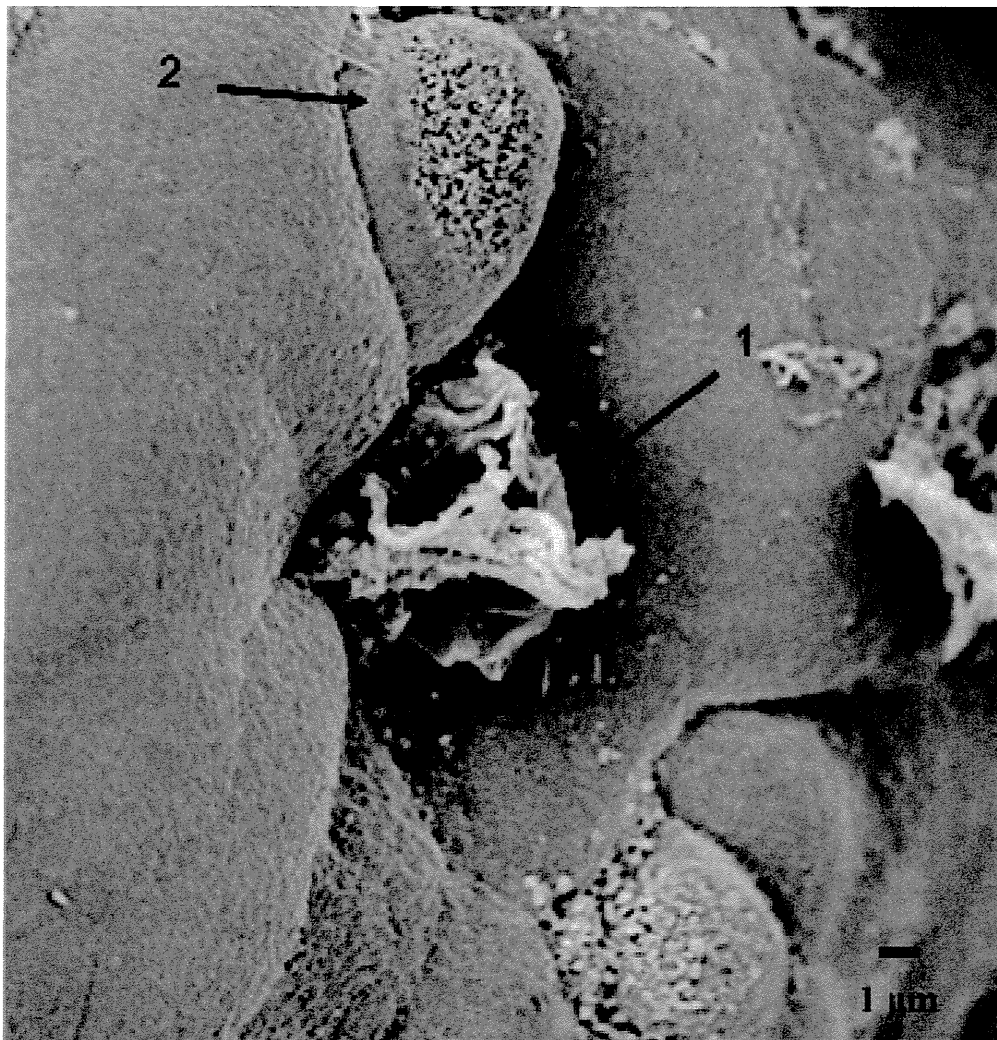


図7 腸上皮に接着した *K. septempunctata* 孢子 (投与後 1.5 時間)

1 : *K. septempunctata* 孢子 2 : 隆起した上皮細胞の一部