

201327005B

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23～25年度 総合研究報告書

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

### 総合研究報告書

- 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)

### 総合研究(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 ..... 39  
小西 良子 (国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部)

- 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  
定量リアルタイム PCR (QPCR) 法による *K. septempunctata* 検出法の開発 ..... 53  
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* 属の遺伝学的解析 ..... 73  
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 ..... 99  
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 ..... 113  
佐藤 宏 (山口大学 農学部)

- 獣肉中の危害物質の解析とその検査法ならびに  
野生動物肉の食品危害性に関する研究 ..... 135  
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* のゲノム解析 ..... 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

# 総合研究報告書

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 23～25 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）

総合研究報告書

*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）  
研究分担者 小西 良子（麻布大学）  
研究分担者 久米田裕子（大阪府公衆衛生研究所）  
研究分担者 黒田 誠（国立感染症研究所）  
研究分担者 八幡雄一郎（国立感染症研究所）  
研究分担者 佐藤 宏（山口大学）  
研究分担者 鎌田 洋一（岩手大学）  
研究分担者 野崎 智義（国立感染症研究所）

全国で一過性の下痢や嘔吐をおもな症状とする有症苦情事例で既知の病因物質が患者の喫食残品から検出されない事例が相次いで発生している。こういった事例の中で、ヒラメの生食による事例の原因微生物を *Kudoa septempunctata*、馬肉の生食による原因微生物を *Sarcocystis fayeri* と同定した。本研究ではこれらの食中毒の発生を防止するために、食中毒発症機序を明らかにするとともに、疫学調査、ゲノム解析、簡易迅速検査法の作成、分類など多角的に *K. septempunctata* および *S. fayeri* の解析をおこなった。これらについて 3 か年にわたり以下の課題を実施した。

1. *K. septempunctata* の食中毒発症機序の解析
2. *K. septempunctata* に対するヒト免疫応答の解析
3. *K. septempunctata* による食中毒の疫学的解析
4. *K. septempunctata* のゲノム解析
5. *K. septempunctata* の簡易迅速検査法の確立
6. 糞便からの *K. septempunctata* 検査法の確立
7. ヒラメの肉質に影響を与えないクドア不活化法の検討
8. *Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定の拡充
9. *S. fayeri* の病原性タンパク質の解析
10. *S. fayeri* のゲノム解析
11. シカ肉を喫食しての有症苦情事例の解析

## A. 研究目的

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒が全国的に増加しており、現在では年間 50 件を超える報告が厚生労働省に寄せられている。我々のこれまでの研究からヒラメの生食と馬肉の生食による原因物質不明の食中毒が *Kudoa septempunctata* (以下、クドア) と *Sarcocystis fayeri* (以下、サルコシスティス) によって引き起こされることを明らかにしている。しかし、本食中毒の発症機構が完全に明らかになっていないため予防法を構築できず、本質的な予防策を策定できないのが現状である。しかも、これらの原因微生物はこれまで公衆衛生学的には無害であると考えられてきたため、ヒトへの病原性についてはほとんど研究がなされていない。また、魚介類や獣肉を生食する習慣はわが国に特有の物であるため、これらの寄生虫のヒトへの病原性に関する研究は海外においてもあまり例がない。そこで実験動物や培養細胞を用いた感染モデルを作成し、これらの寄生虫の食中毒発症機序を解明を試みた。また、クドアに対するヒトの免疫応答を解析することによって、クドアの排除機構を考察した。

本研究で対象としたクドアおよびサルコシスティスによる食中毒、特にクドアによる食中毒では疫学的解析があまりなされていない。そのため、クドアによる食中毒でどのような因子が食中毒発症と

関連しているのか明らかになっていない。そこで、疫学的解析を進め、食中毒発症の危害因子の解析を行った。

近年の遺伝子解析技術の進歩により、微生物のゲノム解析が容易になった。微生物の遺伝情報を取得することは、微生物の病原性を解析していく上で必須のものである。また、遺伝情報をもとに分類や株間のタイピングに応用できる可能性もある。そこで、クドアとサルコシスティスのゲノム解析を試みた。さらに、腸管におけるクドアのふるまいを解析するために、ヒト腸管培養細胞と接種したクドアの遺伝子発現も解析した。

厚生労働省および農林水産省よりクドアに関する検査法が通知されている。しかし、これらの検査法は特別な機器を必要とし、検査結果を得られるまでに長い時間を必要とする。しかし、漁業の現場では高価な実験機器を購入することは現実的ではなく、また、検査結果が迅速に得られる必要がある。これらの要望に応えるために、免疫学的もしくは分子遺伝学的な簡易迅速検査法の作成を試みた。

ヒラメは高級食材であるため、食中毒が発生しても患者の食べ残しが出ない場合が多く、その後の検査に支障をきたす場合が多い。そのため以前から患者の糞便からクドアを検出する方法が求められてきた。そこで、遺伝子検査法を用いた糞便からのクドア検出法を検討した。

クドアは凍結すると不活化されること

が我々のこれまでの研究から明らかになっているが、凍結するとヒラメの肉質が劣化するため、通常の凍結法をクドアの不活化に使用することはできない。しかし、これまでのように養殖場におけるクドアのスクリーニングにだけに頼っていると、クドア寄生ヒラメが流通経路に混入した場合に対応することができない。そこで、ヒラメの肉質に影響を及ぼさないクドア不活化方法の検討を行った。

現在、ヒトに対して病原性を示す粘液胞子中は *K. septempunctata* だけである。しかし、粘液胞子虫は非常に多くの種が知られており、*Kudoa* 属だけでも 80 種以上が存在すると考えられている。しかしこれらの種の鑑別に必要な遺伝子情報はまだ部分的に知られているにとどまっている状態である。今後、*K. septempunctata* 以外の粘液胞子中がヒトに対する病原性を示した場合に対応できるように、粘液胞子虫の鑑別に必要な遺伝子情報の拡充を行った。

馬だけでなく野生のシカについてもサルコシスティス属の寄生が確認されている。最近では、シカなどの野生動物を食肉として有効活用する取り組みがある。ジビエ料理と称し、積極的なシカ肉の利用を産業化に結びつける試みが一部の自治体で、推進されている。そのような状況の中、シカ肉を喫食して食中毒症状を発生した事例に遭遇した。患者喫食シカ肉中に住肉胞子虫が認められたため、有症苦情

事例として解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. *K. septempunctata* の食中毒発症機序の解析

独立行政法人 水産総合研究センター・増養殖研究所より分与していただいたクドア寄生ヒラメからクドア胞子を精製した。クドアによる下痢発症機序を解析するために、胞子を乳飲みマウスに経口投与し、腸管における病変を電子顕微鏡を用いて観察した。同時に培養ヒト腸管細胞を用いた感染モデルを作成し、このモデルにクドア胞子を接種し、腸管細胞に対する毒性および病変形成を観察した。

クドアによる下痢発症メカニズムはスinks、培養ヒト腸管細胞、Enterochromaffin 様細胞を細胞を用いたモデルを使い、クドアによるセロトニン産生機構を中心に解析した。

### 2. *K. septempunctata* に対するヒト免疫応答の解析

マウスマクロファージを用いたモデルを作成した。このモデルにクドア胞子を接種し、マクロファージからのサイトカイン産生を測定した。また、各種 Toll-like receptors を発現させた細胞系を利用し、クドアがマクロファージ上のどのレセプターによって認識されるのかを解析した。

### 3. *K. septempunctata* による食中毒の

## 疫学的解析

発生状況の把握として原因不明食中毒として自治体から厚生労働省へ報告された食中毒速報の情報を収集し、発生の分布を検討した。臨床像の検討はヒラメを喫食しクドアの寄生が確認された事例について標準的な調査票を作成し、自治体で発症に至るクドアの摂取量は2011年6月から12月までに発生したクドアに関連する食中毒事例を基に算出した。

### 4. *K. septempunctata* のゲノム解析

検体からDNAを精製しDNA配列を解析した。タンパク遺伝子の候補を網羅的に抽出し、SSEARCHプログラムにより既知遺伝子と配列比較することにより、タンパク遺伝子を決定した。リボソームRNA遺伝子については、解読したRNAのマッピングと配列比較により決定した。転移RNA遺伝子は、tRNAscan-SE, DOGMA, Rfam, BLASTプログラムで検索した。また全ゲノムの制限酵素地図をArgusシステムを用いて作成した。また、ヒト腸管培養細胞にクドアを接種し、クドアのRNA発現を時間を追って解析した。さらにミトコンドリアの *coxI* 遺伝子と *1-rRNA* 遺伝子の多型を解析することによって、クドア株間の系統を分類するのに利用できるか検討した。

### 5. *K. septempunctata* の簡易迅速検査法の確立

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リボソーム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。

### 6. 糞便からの *K. septempunctata* 検査法の確立

クドア胞子を添加したヒト糞便からDNA抽出を行い、定量的PCR法を用いた検出法を作成した。さらに、クドア食中毒患者の糞便およびクドア以外の食中毒患者の糞便を用いて、作成した検査法の有用性を確認した。

### 7. ヒラメの肉質に影響を与えない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。クドア寄生ヒラメを $-30^{\circ}\text{C}$ のエアースラストフリーザー(MDF-U338、三洋)、 $-80^{\circ}\text{C}$ のエアースラストフリーザー(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、クドア胞子を精製し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。

### 8. *Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定の拡充

国内外の海産魚から粘液胞子虫の採取を行った。採取され粘液胞子虫の形態学および分子系統的情報を収集した。ま

た、海外研究機関(フィリピン、ベトナム等)との共同研究を通して、日本で消費される生鮮海産魚の生産地での感染状況把握についても検討を進めた。

#### 9. *S. fayeri* の病原性タンパク質の解析

馬肉よりサルコシスティスのシストを50 収集し、タンパク質を抽出した。ゲル濾過法により分子量分画を行った。従来の研究からわかっていた、分子量 15 KDa 付近の病原性タンパク質タンパク質を回収し、内部アミノ酸配列を調べた。それをもとに DNA のクローニングを行い、大腸菌で組み換えタンパク質を作成し、各種性状分析に用いた。

#### 10. *S. fayeri* のゲノム解析

サルコシスティスが含まれる馬肉試料として、熊本県の馬肉生産事業者より生鮮馬肉を取得した。そこから核酸の抽出を行い、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。また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考えられているアピコプラストゲノムの解析も合わせて行った。

#### 11. シカ肉を喫食しての有症苦情事例の解析

平成 23 年 2 月、滋賀県で発生した事例を解析した。シカ肉の、住肉孢子虫検査を実施した。顕微鏡検査、遺伝子検査に引き続き、顕微鏡下での種の同定、また、サルコシスティスが持つ毒性タンパク質に対しての抗体も用いての検査を実施した。

## B. 研究結果

### 1. *K. septempunctata* の食中毒発症機序の解析

マウスにクドア孢子を経口投与後 1.5 時間では、腸管上皮細胞にクドア孢子が接着し、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。

孢子をヒト腸管培養細胞に接種すると、孢子から孢子原形質が放出されることが明らかになった。この孢子原形質はアメーバ状の細胞で非常に運動性に富んでいた。感染が進むと、孢子原形質はヒト腸管培養細胞に侵入を開始し、感染後、約 1 時間でヒト腸管培養細胞の基底膜にまで到達した。この時腸管上皮細胞層の透過性は著しく更新した。また、孢子原形質の細胞侵入を抑制すると、クドアによる腸管上皮細胞層の透過性の亢進は阻害された。

スunksに孢子を経口投与したところ、嘔吐の引き金となるセロトニンの産生が腸管で増加した。培養細胞を用いた結果から、クドアが直接、腸管の Enterochromaffin 細胞 (EC 細胞) を刺激し、セロトニン産生を引き起こすことが明らかになった。また、クドア刺激を受けた腸管細胞は MIP-3 $\alpha$  を細胞外に分泌



し、この MIP-3 $\alpha$  が EC 細胞を刺激し、EC 細胞からのセロトニン産生を引き起こすことが明らかになった。

## 2. *K. septempunctata* に対するヒト免疫応答の解析

クドア胞子をマクロファージに接種すると、IP-10、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、TNF- $\alpha$  などの種々のサイトカインが産生されることが明らかになった。TNF- $\alpha$  はクドア胞子濃度に依存して産生量が増加した。クドアを認識する受容体を検索したところ、マクロファージ上の TLR2 がクドアを認識し、転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することが明らかになった。

## 3. *K. septempunctata* による食中毒の疫学的解析

*K. septempunctata* に汚染されたヒラメは9月を中心にピークとなり流通している可能性が考えられた。性別、年齢、治療中の疾患の有無、アレルギーの有無での症例発生に差はなかった。ホスト側の要因による発症は考えられなかった。症例定義に合致した症例からの潜伏期は中央値が5.0時間で、範囲が1.8-8.0時間であった。従来 of 食中毒調査では、症例が何らかの症状が出た場合を発症時間と定義しており、この方法で算出した潜伏期は中央値が5.0時間で範囲が1.8-15.0時間であった。このうち、潜伏期が15.0時間であった症例の症状は発熱のみであり、本研究で設定した症例定義に合致しなかった。このような者を除くと潜伏期は正規分布が仮定できた。本研究で採用した症例定義を採用した消化器疾患を呈した時刻を発症時刻とするこ

とが妥当であると考えられた。

喫食量と潜伏期を検討したところ、相関係数が-0.531で、喫食量が多いと潜伏期間が短くなっていた。

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。胞子の摂取量は中央値が $2.4 \times 10^8$ 個（範囲： $4.9 \times 10^7$ - $3.1 \times 10^9$ 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 $7.2 \times 10^7$ と同程度のオーダーであることが考えられた。

## 4. *K. septempunctata* のゲノム解析

クドアの全ミトコンドリア・ゲノム配列を解読した結果、最も近縁の真核生物と比べてゲノムが退化していることが示唆され、5つのタンパク遺伝子と2つのリボソームRNA遺伝子しかなかった。ミトコンドリアゲノムについては、ナナホシクドアの種内では塩基配列の96~99%が同一であった。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。また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ところ、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。

ヒト腸管培養細胞との接触により、クドアの遺伝子発現がどう変化するかも解析した。17の遺伝子グループで発現変動が観察され、heat shock proteinなどが経時的に増加していた。

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ることを明らかにした。韓国産成魚の殆どがST1であった。二系統の間で、

食中毒病原性の違いは検出されなかった。

#### 5. *K. septempunctata* の簡易迅速検査法の確立

クドア特異的な 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、クドア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。5 機関でこれらの検査法の妥当性を評価したところ核酸クロマト法は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。

#### 6. 糞便からの *K. septempunctata* 検査法の確立

定量 PCR 法による糞便からのクドア検出法を確認した。患者糞便を用いて本試験法の有用性を評価したところ、クドアによる食中毒の患者糞便 93 検体のうち 53 検体が陽性となった。一方、クドアと関係のない食中毒患者便で疑陽性は検出されなかった。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。

#### 7. ヒラメの肉質に影響を与えない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孢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。

#### 8. *Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定の拡充

*K. septempunctata*、*K. thunni*、*K. trachuri*、*K. scomberi*、ウマヅラハギ寄生の *Kudoa* sp.、*Henneguya ogawai*、*H. yokoyamai*、*Myxobolus machidai*、*M. marumotoi*、*Cardimyxobolus japonensis*、マハゼ寄生の *Unicapsula* sp. 等を未記載種として検討し新種報告を行った。また、異なる海域や魚種から分離された *K. iwatai*、*K. neothonni*、*K. thyrsites*、*Unicapsula pyramidata*、*U. seriolae* 等について、孢子形態や 18S/28S rDNA に起こりうる変異について検討した。

#### 9. *S. fayeri* の病原性タンパク質の解析

サルコシステイスのブラディゾイト由来のタンパク質から、分子量 15 KDa タンパク質の内部アミノ酸配列を同定した。クローニングを行い解析したところ、コクシジウムおよびトキソプラズマの、アクチン脱重合因子と高い相同性があることが示された。このたんぱく質の組み換え体はウサギの腸管ループテストに毒性を示し、下痢原性が証明された。また、

組換え 15 kDa タンパク質に重合アクチンを単量体化させる活性があったことから、本タンパク質はアクチン脱重合因子であることが証明された。

#### 10. *S. fayeri* のゲノム解析

生鮮馬肉からサルコシストを得て、ChipSeq の変法を用いてライブラリを構築した。作成したライブラリをシーケンスした結果、1.67 億リード、16.7 Gbase の配列が得られた。de novo assemble を行った結果、N50 が 3,349bp、最大コンティグ長が 220,145bp、総塩基長が 126,606,435bp、コンティグ数 68,209 本が得られた。近縁の *S. neurona* の 124 Mbase に対して、同等のデータ量が取得できた。ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma gondii* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。アピコプラストゲノムの配列は 3 つのコンティグに分かれていたことから、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。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。

#### 11. シカ肉を喫食しての有症苦情事例の解析

患者喫食残品のシカ肉について、顕微鏡による虫体の検を試みた。紡錘形、三日月形のブラディゾイトを含んだシストが検出された。シストの形態から、*S.*

*wapici*、*S. sybillencis*、および未同定の大型シストが検出された。肉片の組織標本を作製し、毒性タンパク質に対する抗体を用いて観察したところ、毒性タンパク質と免疫学的交差性を示すシグナルが観察され、シカ肉中には、住肉胞子虫由来の食品危害性があることが確認された。

#### C. 考察

##### 1. *K. septempunctata* の食中毒発症機序の解析

胞子原形質の細胞内侵入、胞子の直接作用および極糸の細胞内貫通など様々な要因による腸管上皮細胞の傷害がクドアによる下痢発症メカニズムであることが示唆された。

クドアが直接 EC 細胞を刺激しセロトニン産生を引き起こすが明らかになった。また、クドアによって刺激を受けた腸管上皮細胞が MIP-3 $\alpha$  を産生し、MIP-3 $\alpha$  の働きによって EC 細胞がセロトニンを産生した。セロトニンは嘔吐を引き起こす生理活性物質である。クドアは直接的、あるいは MIP-3 $\alpha$  を介して間接的にセロトニン産生を引き起こすことによって、嘔吐を引き起こすことが示唆された。

##### 2. *K. septempunctata* に対するヒト免疫応答の解析

クドア刺激を受けたマクロファージは IP-10、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2、TNF- $\alpha$  を産生することが明らかになった。これらのサイトカインはいずれも初期免疫応答において非常に重要なものである。IP-10、MIP-1 $\beta$ 、MIP-2 などは細胞浸潤を引き起こすことが知られている。生体側はクドア感

染に際して、これらのサイトカインを産生することによって、クドアを排除しようとしていることが示唆された。また、クドアはマクロファージ上の TLR2 に認識されることが明らかになった。よって、クドアの感染防御には自然免疫系が重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 3. *K. septempunctata* による食中毒の疫学的解析

*K. septempunctata* が寄生したヒラメの流通は9月前後がピークである可能性が考えられた。*K. septempunctata* に汚染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し、*K. septempunctata* の摂取量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。このことから10の7乗オーダーでの摂取が *K. septempunctata* による下痢あるいは嘔吐の少なくともいずれかの消化器症状を呈することが示唆された。

### 4. *K. septempunctata* のゲノム解析

クドアのゲノム解析を行った。その結果、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考えられた。また、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。クドアと同様にミクソゾアに属する *Zschokkella nova* については、3対で合計6本の染色体があることが報告されており [Tyutyaev (2008) *Tsitologiya* 50:907; ロシア語]、染色体の数としては本研究と合致していること

が明らかになった。

ヒト腸管培養細胞と接触したクドアの遺伝子発現解析を行ったところ、16の遺伝子グループで発現変動が観察できた。heat shock protein が経時的に増加しており、外部からの刺激に対するクドアの防御と解釈できた。一方で、他の遺伝子グループについては、配列からは機能が明確には推定できなかった。また、タンパク分解酵素は見当たらなかった。発現変動を示した遺伝子の殆どが機能未知であった。

ミトコンドリア遺伝子多型により、クドアを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。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に有用であると考えられた。

### 5. *K. septempunctata* の簡易迅速検査法の確立

本研究で開発した核酸クロマト法は、高価な機器をや専門技術を必要としない簡便な検査法である。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。また、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あり、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。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。今回開発した検査法は従来の通知法を補完する検査法として有用であることが示唆された。

#### 6. 糞便からの *K. septempunctata* 検査法の確立

今回作成した検査法は食中毒患者便からも高感度かつ特異的にクドア DNA を検出できることが明らかになった。陽性となったすべての患者糞便検体で、Ct 値が 30 cycles 以上であったことは興味深い結果であった。経口摂取されたクドア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クドアの DNA は極微量であると推察された。また、ヒラメの喫食から糞便検体採取までの期間が 3 日以内なら、陽性率が約 7 割であったのに対し、3 日を超えると陽性率が約 3 割に低下した。このことから、経口摂取された胞子は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ことが示唆された。本検査法は、喫食残品が残らないような事例の検査において非常に有用な手法になると考えられた。

#### 7. ヒラメの肉質に影響を与えないクドア不活化法の検討

今回の結果から、リキッドフリーザーは 5 分という短時間でクドアを不活化することが明らかになった。さらに、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。今回は限られた条件での実験で

あったが、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。

#### 8. *Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定

本研究を通して集積された形態学的・分子遺伝学的変異に関するデータは、信頼性のある種鑑別に今後大いに活用が期待される。特に *K. septempunctata* 以外の粘液胞子虫による食中毒が示唆される中で、本研究によって集積されたデータは、これまで不連続的な情報に基づくしかなかった種同定の精度を向上させ、食中毒発生時に現場での原因究明に大いに役立つものであると考えられた。

#### 9. *S. fayeri* の病原性タンパク質の解析

サルコシスティスのシスト（ブラディゾイト）抽出タンパク質中から毒性タンパク質を分離した。アミノ酸配列と塩基配列の相同性を利用し、同毒性タンパク質の cDNA をクローニングした。同タンパク質の組換え体には下痢原性が認められた。同タンパク質は、住肉胞子虫が属するアピコンプレックス門原虫が保有するアクチン脱重合因子と相同性を示した。組換え毒性タンパク質は、脱重合活性を示した。以上から、馬肉を共通食とする食中毒は、フェイヤー住肉胞子虫のアクチン脱重合因子によって、その下痢症状が引き起こされることが示唆された。

#### 10. *S. fayeri* のゲノム解析

ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質

の配列や、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。アピコプラストは生存に必須と考えられていることから、アピコプラストに着目し、その構造配列を決定したところ、薬剤の標的となる遺伝子が残っており、近縁種で有効な薬剤はサルコシスティスでも有効ではないかと期待された。

#### 11. シカ肉を喫食しての有症苦情事例の解析

住肉胞子虫は、草食動物を中間宿主とする原虫で、ウマだけでなく、ブタ、ヤギ、めん羊といった家畜、さらには、シカ、イノシシなどの野生動物にも寄生する。増えすぎた野生動物や、人里へ降りてきた野生動物の駆除と利用を両立させる試みが、我が国のいろいろな自治体で進んでいる。今回の事例ではウマに寄生する *S. fayeri* とは異なるが、*S. fayeri* の毒性タンパク質であるアクチン脱重合因子と抗原性が一致する種であることが確認された。これらの事実は、野生動物肉に住肉胞子虫の危害があることを実証するもので、シカ、イノシシ等、食用に転用される動物肉の安全性確保を考える際、寄生虫性食中毒も、重要な検討項目となることを示唆している。

#### D. 結論

本研究の結果からクドアとサルコシスティスの食中毒発症機序をほぼ明らかにすることができた。また、生体の免疫応答に関するデータや疫学情報も集積することができた。これらの情報は今後、予防法を構築するうえで重要な情報になるとと思われる。

本研究ではクドアとサルコシスティスに対するゲノム解析を行い、両寄生虫のゲノム情報をほぼ取得することに成功した。残念ながら寄生虫は、ゲノム解析の進んでいる哺乳動物や細菌などとは違い、リファレンスとなる遺伝子情報が不足している。そのためゲノム解析を行っても、ゲノム上の各遺伝子の役割についてまで明らかにできない場合が多い。本研究でもゲノム情報の取得には成功したが、遺伝子の機能解析についてはこれからさらに進めなければいけない。しかし今後、クドアやサルコシスティス、また他の寄生虫に関する情報が集積されるにつれ、本研究で得られたゲノム配列はリファレンス情報として重要な価値を持ち、クドアやサルコシスティスだけでなく他の寄生虫の病原性解析や予防法の確立に有用であると思われる。

漁業の現場や一般の検査所などではリアルタイム PCR 装置などの高価な機器を所有していなかったり、専門的な技術が不足している場合がある。また、漁業の現場や検査所などでは大量の検体の処理を求められており、結果も迅速に得られることが望まれている。こういった声にこたえるために本研究では、核酸クロマト法と LAMP 法を用いた簡易迅速検査法および患者便からのクドア検出法を作成した。

現在行われているクドア対策の主なものとは養殖場における防除を中心としたものである。このためクドア寄生ヒラメが流通経路に混入した場合の対策が必要である。そこでキッドフリーザーを利用したクドア不活化法の検討を行ったところ、ヒラメの肉質の変化を最小限にとどめク

ドアを不活化することができた。今後、さらに条件を検討することによって、クドア食中毒予防法として利用できると思われる。

現在、ヒトへの病原性が確認されている *Kudoa* 属、*Sarcocystis* 属は *K. septempunctata* と *S. fayeri* である。しかしながらヒラメや馬以外の海産魚や動物にも多くの種の粘液胞子虫や住肉胞子虫が寄生していることが確認されている。現時点ではこれらの種の病原性は確認されていないが、一部の粘液胞子虫の病原性を示唆する事例も報告されている。本研究では今後、*K. septempunctata* 以外の粘液胞子虫が食中毒を引き起した場合に備え、粘液胞子虫の分類の整理および分類に必要な形態学的、分子遺伝的な情報の集積を行った。またシカ肉を原因とする食中毒事例の残品から *S. fayeri* の病原性タンパク質と同じものを産生する住肉胞子虫が検出された。本研究の研究成果によって、*K. septempunctata* や *S. fayeri* 以外の寄生虫への対策の基盤が整えられたと考えられる。今後さらにこれらの寄生虫に対する調査、情報収集を進めていく必要があると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. Kawaia, T., Sekizuka, T., Yahatac, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishie, Y., Ohnishi, T. (2012): Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw. *Clinical Infectious Diseases*. 54, 1046-1052
2. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2011) *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. *Parasitol Res* 108: 913-926
3. Iijima, Y., Nakanishi, N., Furusawa, H., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y. (2012): Inter-Laboratory Validation and Applications of Quantitative Real-Time PCR for the Detection of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 436-438.
4. Li, Y.C., Sato, H., Kamata, Y., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y. (2012) : Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. *Parasitol. Res.*, 111, 819-826.
5. Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Kumeda, Y. (2012) : Detection of *Kudoa septempunctata* 18S ribo-

- somal DNA in patient fecal samples from novel food-borne outbreaks caused by consumption of raw olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Clin. Microbiol., 50, 2964-2968.
6. Harada, T., Kawai, T., Sato, H., Yokoyama, H., and Kumeda, Y. Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int. J. Food Microbiol. 2012, 156: 161-167.
  7. Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., and Kumeda, Y. Detection of *K. 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.
  8. Ohnishi, T., Kikuchi, Y., Furusawa, H., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. (2013) : *Kudoa septempunctata* invasion increases the permeability of human intestinal epithelial monolayer. Foodborne. Pathog. Dis., 10, 137-142.
  9. Ohnishi, T., Oyama, R., Furusawa, H., Ohba, N., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. (2013): *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
  10. Ohnishi, T., Furusawa, H., Yoshinari, T., Yamazaki, A., Horikawa, K., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. (2013): Electron microscopic study of *Kudoa septempunctata* infecting *Paralichthys olivaceus* (olive flounder). Jpn J Infect Dis 66:348-350
  11. Kikuchi, Y., Ohnishi, T., Furusawa, H., Kawai, T., Fukuda, Y., Yokoyama, H., Sugita-Konishi, Y. (2013): ELISA Detection of *Kudoa septempunctata* in Raw *Paralichthys olivaceus* (Olive Flounder) using a Chicken Anti-*Kudoa* Antiserum. Biocontrol Sci 18:193-197
  12. Li, YC., Sato, H., Tanaka, S., Ohnishi, T., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y. (2013): Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa*



- scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol Res 112:1991-2003
13. 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)
  14. Kamata Y., Saito M., Irikura D., Yahata Y., Ohnishi T., BEsso T., Inui T., Watanabe M., Sugita-Konishi Y. A toxin isolated from *Sarcocystis feyeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. (in press), 2014
  15. Li Y-C, Sato H (2014) Two novel myxosporean species (Myxosporaea: 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/s00436-014-3776-1]
  16. 大西貴弘 : *Kudoa Septempunctata* を病因微生物とする食中毒, 食品衛生研究, 61(11), 13-20, 2011
  17. 大西 貴弘 : 食中毒原因物質としての”クドア”に関する最新の知見, モダンメディア, 58, 205-209, 2011
  18. 佐藤 宏 (2011) 食中毒の新たな寄生虫性病原体として注目される粘液胞子虫の生物学. 山口獣医誌 38: 1-26.
  19. 鎌田洋一 : 寄生虫毒素性食中毒—馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* の構成タンパク質が食中毒を誘発する—, 日本獣医師会雑誌, 65, 705-710, 2012
  20. 鎌田洋一: ザルコシステイスが含まれる馬肉による食中毒、日本食品微生物学雑誌、29、47-52、2012
  21. 佐藤 宏 (2012) 連載「動物病理学の今」第5回 最近話題の人獣共通寄生虫病. 病理と臨床 30(8): 2-6
  22. 佐藤 宏 (2012) 随伴侵入生物としての脊椎動物寄生蠕虫. 地球環境 17(2): 183-192
  23. 大西 真、黒田 誠、八幡 裕一郎 : ゲノムから見た感染症 網羅的ゲノム解析によるヒラメ喫食に関連する嘔吐下痢症の原因物質の探索, NEUROINFECTION, 17 : 35-41, 2012
  24. 大西 貴弘 : *Kudoa septempunctata* 感染症, 化学療法の領域, 29 巻 増刊号: 258-263, 2013
  25. 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
26. 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
  27. 青木佳代, 石川和彦, 林 賢一, 新井陽子, 斉藤守弘, 鎌田洋一, 小西良子: シカ肉の *Sarcosystis* が原因として疑われた有症苦情の事例について, 日本食品微生物学雑誌, 30, 28-32, 2013
  28. 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
  29. 佐藤 宏 (2013) 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.
- 学会発表
1. Ohnishi, T., Kawai, T., Sekizaki, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Kamata, Y., Irikura, D., Sugita-Konishi, Y. : New parasitic food borne diseases in Japan, IUMS 2011 (2011.9)
  2. Yokoyama, H., Grabner, D., Shirakashi, S., Kinami, R., Ohnishi, T. Kudoa septempunctata (Myxozoa: Multi-valvulida) from the trunk muscle of cultured olive flounder (*Paralichthys oli-vaceus*) causing food poisoning of human, 8th International Symposium of Fish Parasites. Vina del Mar, Valparaíso, (2011.9)
  3. Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T: Molecular characterization of *Kudoa* spp. found in commercially available marine fish: a possible cause of gastrointestinal symptoms of Japanese people taking raw fish slices. BIT' s 1<sup>st</sup> Annual World Congress of Microbes-2011, Beijing, China (Beijing International Convention Center), (2011.8.1).
  4. Ohnishi, T., Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, T., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y: *Kudoa septempunctata* causes the novel food-poisoning outbreaks in Japan by consumption of olive flounder in raw, IAFP European Symposium, (2012.5)
  5. Ohnishi, T. : Novel food poisoning outbreaks in Japan by

- consumption of *Paralichthys olivaceus*, United State-Japan cooperative program on development & utilization of natural resources (2012.3)
6. 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)
  7. Yuichiro Yahata, Takahiro Ohnishi, Yoshiko Sugita-Konishi, Takao Toyokawa, Naomi Nakamura, Kiyosu Taniguchi, Nobuhiko Okabe. *Kudoa septempunctata* caused outbreak in humans with raw flounder ingestion. IMED 2013 (Vienna, 15-18 February, 2013)
  8. 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, Poster presentation [P2.061], Las Palmas, Gran Canaria, Spain, (2013.11.3-6).
  9. 大西 貴弘:新たに判明した寄生虫による食中毒の詳細とその検査法-生鮮魚肉を共通食とする食中毒-, NPO 法人 食の安全を確保するための微生物検査協議会 第1回総会・講演会 (2011.5)
  10. 大西 貴弘:ヒラメ毒-新たに判明した寄生虫による食中毒-, 第13回ジャパン・インターナショナル・シーフードショー、(2011.7)
  11. 大西 貴弘:クドアを原因微生物とする食中毒について, 平成23年度第4回食品衛生監視員研修会, 三重県・津市 (2011.11)
  12. 大西貴弘:粘液胞子虫とその毒性、及び検査法, 第32回日本食品微生物学会学術総会 (2011.10)
  13. 飯島義雄, 中西典子, 大西貴弘, 小西良子:ヒラメからのクドア・セプテンpunkタータの検出方法, 第32回日本食品微生物学会学術総会 (2011.10)
  14. 菊池 裕, 大西貴弘, 古沢博子, 福田 穰, 小西良子:ニワトリ抗体を用いたヒラメ筋肉寄生 *Kudoa septempunctata* の検出法, 第32回日本食品微生物学会学術総会 (2011.10)
  15. 佐藤 宏:お刺身文化の危機か?クドア粘液胞子虫症. 第33回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会, 札幌市(北海道大学獣医学部講堂), (2011.11.1).

16. 佐藤 宏：身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～平成 23 年度獣医公衆衛生講習会(山口県獣医師会), 山口市(山口県獣医師会会館), (2011. 11. 5).
17. 河合高生, 原田哲也, 横山博, 大西貴弘, 鎌田洋一, 小西良子, 久米田裕子. 乳のみマウスを使用した *Kudoa septempunctata* の下痢原性に関する研究 (1), 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, 2011, 東京.
18. 河合高生, 原田哲也, 横山博, 大西貴弘, 鎌田洋一, 小西良子, 久米田裕子. 乳のみマウスを使用した *Kudoa septempunctata* の下痢原性に関する研究 (2), 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, 2011, 東京.
19. 原田哲也, 河合高生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子. QPCR 法によるヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検出法の検討, 第 32 回日本食品微生物学会学術総会, 2011, 東京.
20. 佐藤 宏：身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～. 第 41 回全国市場食品衛生検査所協議会全国大会講演, 山口市(山口市翠山荘), (2012. 1. 20).
21. 大西 貴弘:粘液胞子中による新しい食中毒, 埼玉県衛生研究所セミナー, 埼玉県衛生研究所 (2012. 1)
22. 大西 貴弘:ヒラメの食中毒(クドア・セプテンpunkタータ), 平成 23 年度専門研修「食品衛生」, 東京都特別区研修所 (2012. 2)
23. 大西 貴弘:クドア・セプテンpunkタータの毒性と試験法, 第 24 回地研全国協議会関東信静支部細菌研究部会 (2012. 2)
24. 大西貴弘:生鮮食品(魚類・馬肉)の寄生虫による有症事例について, 平成 23 年度食品衛生監視員研修会 (2012. 3)
25. 大西貴弘:生鮮食品を共通食とする新しい寄生虫性食中毒, 平成 23 年度横浜市衛生研究所衛生技術研修会, (2012. 3)
26. 黒田誠:新下痢原性寄生虫クドアの発見. 第 81 回日本寄生虫学会大会シンポジウム講演 (2012. 3)
27. 大西貴弘:クドア検査法, 衛生微生物技術協議会 第 33 回研究会, 横浜市 (2012. 6)
28. 大西貴弘:クドアセプテンpunkタータによる新しい食中毒, 第 44 回東海北陸ブロック食品衛生監視員研修会, (2012. 8)
29. 佐藤 宏:身近な寄生虫と食中毒. 公益法人愛知県獣医師会公衆衛生部会学術勉強会, 愛知県蒲郡市三谷町(サンヒルズ三河湾), (2012. 08. 05).
30. 佐藤 宏:身近な寄生虫と食品-粘