

- 液胞子虫、住肉胞子虫、アニサキスを中心として一。岡崎市保健所開設 10 周年記念事業(食品衛生月間)特別講演会, 愛知県岡崎市(岡崎市福祉会館), (2012.08.06).
31. 佐藤 宏: 生鮮海産魚の生食を原因とするクドア食中毒. 平成 24 年度獣医学術学会北海道地区学会シンポジウム, 江別市(酪農学園大学), (2012.09.06).
 32. 大西貴弘: クドアセプテンプクタタを原因とする新しい食中毒, 第 61 回九州地区獣医師大会・獣医学術九州地区学会, (2012.10)
 33. 李迎春, 佐藤宏, 鎌田洋一, 大西貴弘, 小西良子: 日本近海産クロダイとイシガキダイにみられた *Henneguya* 属-*Myxobolus* 属粘液胞子虫 3 種について, 第 154 回日本獣医学会学術集会, (2012.9)
 34. 佐藤宏, 李迎春, Lea A. Jimene, 都築秀明, 大西貴弘, 小西良子: 日本国内で消費されるマグロに寄生する *Kudoa neothunni* の 2 系統について, 第 154 回日本獣医学会学術集会, (2012.9)
 35. 原田哲也, 河合高生, 陳内理生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子: 食中毒患者糞便からのナナホシクドア試験法, 第 33 回食品微生物学会学術総会, (2012.10)
 36. 河合高生, 原田哲也, 陳内理生, 菊池裕, 大西貴弘, 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 (3), 第 33 回食品微生物学会学術総会, (2012.10)
 37. 佐藤 宏: 生活環境と寄生虫症. 山口県獣医師会平成 24 年度公衆衛生講習会, 山口市(山口県獣医師会館), (2012.11.17).
 38. 佐藤 宏: 身近な寄生虫と食品-粘液胞子虫、住肉胞子虫、アニサキスを中心として一. 岐阜市保健所: 食の安全に関する講演会, 岐阜市(岐阜市福祉健康センター), (2012.11.22).
 39. 竹内史比古, 関塚剛史, 野崎智義, 大西真, 小西良子, 大西貴弘, 黒田誠: ナナホシクドアの退化したミトコンドリアゲノムが明らかにする, ミクソゾアの左右相称動物起源. 日本進化学会第 14 回大会. (2012)
 40. 河合高生. クドアの下痢原性の解析, 第 81 回日本寄生虫学会大会, 2012, 兵庫.
 41. 原田哲也, 河合高生, 陳内理生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子. 食中毒患者糞便からの *K. septempunctata* 試験法, 第 33 回日本食品微生物学会学術総会, 2012, 福岡.
 42. 河合高生, 原田哲也, 陳内理生, 菊池裕, 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

- る研究 (3), 第 33 回日本食品微生物学会学術総会, 2012, 福岡
43. 大西貴弘:クドアセプトンククタによる食中毒について, 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術講演会, (2013. 2)
 44. 大西貴弘:クドアセプトンククタを原因とする食中毒について, 平成 24 年度大分県食品衛生監視員・と畜食鳥検査員・狂犬病予防員研究発表会, (2013. 2)
 45. 大西貴弘:クドアセプトンククタとザルコシステイスによる新しい食中毒, 徳島県公衆衛生獣医師協議会, (2013. 2)
 46. 大西貴弘:クドアを原因とする食中毒について, 平成 25 年度日本魚病学会春季大会, (2013. 3)
 47. 大西貴弘:クドアを原因微生物とする新しい寄生虫性食中毒, 第 86 回日本細菌学会総会, (2013. 3)
 48. 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)
 49. 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)
 50. 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, 岐阜市(岐阜大学), (2013. 09. 20-22).
 51. 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, 岐阜市(岐阜大学), (2013. 09. 20-22).
 52. 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, 岐阜市(岐阜大学), (2013. 09. 20-22).
 53. 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)
 54. 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, 高松市(香川大学), (2013. 10. 19-20).
 55. 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)
56. 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)
57. 八木田健司、内田雄治. 国産重種馬肉における *Sarcocystis fayeri* 汚染実態調査. 第 82 回日本寄生虫学会大会、(2013. 3)
58. 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
59. 原田哲也. クドア検出法の開発と食中毒事例への応用, 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2013, 大阪
60. 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
61. 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
62. 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 pyramidata* について. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 松山市 (愛媛大学), (2014. 03. 27-28).
63. 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, 松山市 (愛媛大学), (2014. 03. 27-28).

総合研究（分担）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 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（分担）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 福田 穰（大分県農林水産研究指導センター）
研究協力者 乙竹 充（(独) 水産総合研究センター）
研究協力者 森広一郎（(独) 水産総合研究センター）
研究協力者 米加田 徹（(独) 水産総合研究センター）
研究協力者 阿久澤 さゆり（東京農業大学 応用生物科学科）

我々はヒラメを原因食材とする有症事例の原因微生物が新種の粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* によって引き起こされることをこれまでに明らかにした。本研究では *K. septempunctata* による発症機構を解明するために研究を行った。そこで平成 23 年度から平成 25 年度にかけて以下の研究課題を実施した。

1. *K. septempunctata* による下痢発症メカニズムの解明
2. *K. septempunctata* による嘔吐発症メカニズムの解明
3. *K. septempunctata* に対するヒト免疫応答の解析
4. *K. septempunctata* による食中毒予防法の構築

A. 研究目的

Kudoa septempunctata（以下、クドア）による食中毒の主な症状は一過性の下痢と嘔吐である。クドア胞子を乳のみマウスに経口的に投与すると下痢を引き起こし、ヒトの培養腸管上皮細胞である Caco-2 細胞に接種すると、接種後 1 時間で、腸管細胞層の透過性が急速に上昇することが明らかになって

いる。このようなクドアによる下痢毒性がどのようなメカニズムによって引き起こされるのか、明らかになっていない。そのため、クドアによる下痢発症メカニズムを Caco-2 細胞を用いたクドア感染モデルで解析した。

クドアはヒトに対して嘔吐を引き起こす。クドアの下痢毒性はunks を用いた嘔吐実験でも証明されている。しかし、クドアの嘔吐毒性も下痢毒性

同様にその作用機序は明らかになっていない。そこで、スunksを用いた動物実験と、培養細胞を用いた実験系でクドアの下痢メカニズムを解析した。

クドアはヒトの腸管細胞に侵入した後、速やかに死滅し、長期間生残することはないと考えられている。このようなヒトからのクドア排除機構として、ヒトの免疫系が働いているのではないかと考えられている。特にクドアによる食中毒症状は 24 時間以内に治癒し、予後が良好であるため、成立に時間のかかる適応免疫ではなく、自然免疫がクドアの排除の中心になっているのではないかと考えられている。クドアに対する自然免疫系、特にマクロファージの反応に着目して研究を行った。

クドア食中毒の一番の問題点は、冷凍以外にクドアの効果的な失活方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。近年、冷気を直接食品に吹き付ける従来のエアースラストフリーザーに代わり、食品を直接液体の冷媒に浸漬するリキッドフリーザーが普及しつつある。リキッドフリーザーは熱の伝導効率が

良いため、食品の食感、鮮度を維持しながら冷凍することができると考えられている。そこで、このリキッドフリーザーをクドアの不活化およびヒラメの冷凍に使用できるかどうか検討した。

B. 研究方法

1. クドアの下痢毒性メカニズムの解析

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を用いたクドア感染モデルを作成した。このモデルにヒラメから精製したクドア胞子を接種し、Caco-2 の経上皮電気抵抗を指標として、クドアの下痢毒性を測定した。また、クドアの腸管上皮細胞に対する感染様式を調べるために、電子顕微鏡観察も合わせて行った。

2. クドアの嘔吐メカニズムの解析

クドアによって引き起こされる嘔吐にセロトニンが関与しているかどうかを調べるために、クドアに精製クドア胞子を経口投与し 20 分後、スunksの腸管を取り出し腸管の切片を作成した。抗セロトニン抗体で腸管のセロトニン陽性細胞を染色し、セロトニン陽性細胞を検出した。

腸管においては Enterochromaffin 細胞 (EC 細胞) によってセロトニンが産生されることが考えられている。そこで、EC 細胞のモデル細胞として利用され

ているヒト膵臓内分泌細胞 QGP-1 にクドアを接種し、培養上清中のセロトニン量をセロトニン特異的 ELISA によって検出した。

3. クドアに対するヒトの免疫応答の解析

マクロファージ様細胞 RAW264 にクドアを接種し、培養上清中のサイトカインをサイトカインアレイを用いて検出した。また、Toll-like receptor (TLR) 1 から 9 までをそれぞれ発現させた HEK293 細胞をクドア刺激し、NF- κ B 依存性のレポーター活性を測定し、クドアがどの TLR によって認識されるか、解析した。

4. リキッドフリーザーによるヒラメ筋肉中クドア不活化

ヒラメを 20g ずつプラスチックバックに入れ、 -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 のエアースラストフリーザー (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。冷凍したヒラメ筋肉中クドアの下痢毒性は前述のとおり Caco-2 の経上

皮電気抵抗を指標として決定した。解凍後のヒラメ筋肉のテクスチャーはレオメーターを用い、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。

C. 研究結果

1. クドアの下痢毒性メカニズムの解析

胞子を Caco-2 細胞に接種すると、胞子から胞子原形質が放出されることが明らかになった。この胞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、胞子原形質は Caco-2 細胞に侵入を開始し、感染後、約 1 時間で Caco-2 細胞の基底膜にまで到達した。また、この胞子原形質による細胞侵入が下痢の原因であるかどうかを調べるために、胞子を接種した Caco-2 細胞の経上皮電気抵抗を指標に腸管上皮細胞層の透過性の亢進を測定した。その結果、胞子を接種すると 1 時間で透過性が約 5 倍に上昇するのに対して、サイトカラシン D によって胞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。

2. クドアの嘔吐毒性メカニズムの

解析

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。そこで QGP-1 細胞にクドア胞子を接種すると、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。また、クドア胞子を接種した Caco-2 細胞の apical 側の培養上清を QGP-1 細胞に作用させると、QGP-1 細胞における強いセロトニン産生を促進した。以上のことから、クドアは直接 EC 細胞を刺激しセロトニン産生を促進させるだけでなく、クドアの刺激を受けた腸管細胞が何らかのメディエーターを産生し、これが EC 細胞に作用しセロトニン産生を引き起こす可能性が示唆された。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。

3. クドアに対するヒトの免疫応答の解析

クドア胞子を RAW264 細胞に接種すると、IP-10、MIP-1 β 、MIP-2、TNF- α 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- α 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、TLR2 がクドアを認識し、転写因子 NF- κ B を活性化することが明らかになった。

4. リキッドフリーザーによるヒラメ筋肉中クドア不活化

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。クドアが寄生しているヒラメ筋肉を一般的なエアブラストフリーザー (-30 $^{\circ}$ C, -80 $^{\circ}$ C) リキッドフリーザーで凍結し、Caco-2 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。エアブラストフリーザーで-30 $^{\circ}$ C, 4時間処理、-80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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、エアブラストフリーザー-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、エアブラストフリーザー-30°C、-80°C処理の切り身は白濁し、透明感が消失していた。

D. 考察

1. クドアの下痢毒性メカニズムの解析

我々はクドアがCaco-2細胞の経上皮電気抵抗を低下させることをこれまでに報告してきた。しかし、そのメカニズムについては長い間不明であった。本研究ではクドアがCaco-2細胞に接種されると、孢子から孢子原形質が放出され、この孢子原形質がCaco-2細胞に侵入することを明らかにした。また、この孢子原形質の侵入を阻害することによって、クドアによるCaco-2細胞の経上皮電気抵抗の低下を抑制することができた。さらに、電子顕微鏡による観察から孢子原形質がCaco-2細胞に侵入し、細胞障害を引き起こしていることが明らかになった。以上の結果から、クドア孢子原形質の腸管

上皮細胞への侵入が、クドアによる下痢毒性メカニズムのひとつであることが明らかになった。

2. クドアの嘔吐毒性メカニズムの解析

スunksにクドア孢子を経口投与することによって、スunksの腸管内でセロトニンの産生が促進されることが明らかになった。このことから、クドアによる嘔吐発症にセロトニンが関与していることが示唆された。さらにQGP-1細胞をクドアで直接刺激した場合およびクドア孢子で刺激したCaco-2細胞の培養上清をQGP-1細胞に作用させた場合、いずれの場合もQGP-1細胞からセロトニンが産生された。これらの結果から、クドアはEC細胞を直接刺激し、セロトニンを産生させる系と、クドアによって刺激を受けた腸管上皮細胞が何らかのメディエーターを産生し、その働きによってEC細胞からセロトニンが産生されるという2つの系によって、クドアがセロトニン産生を引き起こしていることが示唆された。

クドア刺激によってCaco-2細胞の培養上清中にMIP-3 α が産生されることが明らかになった。また、リコンビ

ナントの MIP-3 α 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た。これらの結果から、クドア刺激によって Caco-2 が産生し QGP-1 細胞からセロトニン産生を引き起こすメディエーターは MIP-3 α であることが示唆された。MIP-3 α は白血球の遊走因子であるが、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も知られている。また、EC 細胞によるセロトニン分泌は、脱顆粒によって引き起こされることが知られている。こういったことから、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。

以上の結果から、経口摂取されたクドア胞子が腸管に到達すると、EC 細胞を直接刺激しセロトニン産生を引き起こすと同時に、腸管上皮細胞も刺激し MIP-3 α の産生を促進させ、この MIP-3 α の働きによって EC 細胞におけるセロトニン産生を引き起こすことが示唆された。このようにクドア刺激によって産生されたセロトニンが求心性迷走神経を介して脳の嘔吐中枢を刺激し、嘔吐が引き起こされることが示唆された。

3. クドアに対するヒトの免疫応答の

解析

クドア刺激を受けた RAW264 細胞は IP-10、MIP-1 β 、MIP-2、TNF- α 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。よってこれらのサイトカインがクドア感染に対する生体防御に関与している可能性が示唆された。また、クドアは TLR2 に認識され、転写因子 NF- κ B が活性化されることが今回の結果から明らかになった。TLR2 を介してのマクロファージの活性化は NF- κ B の働きによって TNF- α の産生につながることを知られている。今回の我々の結果でもクドア刺激によって、TNF- α が産生されることが明らかになった。これらの結果から、TLR2 によってクドアが認識され、TLR2 の情報伝達系によって NF- κ B が活性化され、TNF- α の産生が引き起こされていることが示唆された。

4. リキッドフリーザーによるヒラメ筋肉中クドア不活化

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。今回は切り身 20g という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。

E. 結論

本研究ではクドアによる嘔吐と下痢の発症メカニズムを明らかにすることができた。また、クドア感染に対する免疫応答を明らかにした。さらにリキッドフリーザーを用いたクドア食中毒予防の可能性を見出した。今後、本研究で得られた知見をもとに、クドア食中毒対策に取り組んでいきたい。

F. 研究発表

論文発表

1. Kawaia, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, 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. 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.
3. 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.
4. Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., Ohnishi, T., Sugita-Konishi, Y., Kumeda, Y. (2012) : 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., 50, 2964-2968.
5. 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.
 6. 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
 7. 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
 8. Kikuchi, Y., Ohnishi, T., Furusawa, H., Kawai, T., Fuskuda, 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
 9. 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
 10. 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)
 11. 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
12. 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
 13. 大西 貴弘 : *Kudoa septempunctata* 感染症, 化学療法の領域, 29 巻 増刊号: 258-263, 2013
 14. 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
 15. 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 olivaceus*) causing food poisoning of human, 8th International Symposium of Fish Parasites. Vina del Mar, Valparaíso, (2011.9)
 3. 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)
 4. 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)
 5. 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)
6. 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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. 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)
 16. 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)
 17. 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)
 18. 大西貴弘：クドアセプテンpun

- クタ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)
19. 大西貴弘: クドアセプテンプククタタを原因とする新しい食中毒, 第 61 回九州地区獣医師大会・獣医学術九州地区学会, (2012.10)
20. 李迎春, 佐藤宏, 鎌田洋一, 大西貴弘, 小西良子: 日本近海産クロダイとイシガキダイにみられた *Henneguya* 属-*Myxobolus* 属粘液胞子虫 3 種について, 第 154 回日本獣医学会学術集会, (2012.9)
21. 佐藤宏, 李迎春, Lea A. Jimene, 都築秀明, 大西貴弘, 小西良子: 日本国内で消費されるマグロに寄生する *Kudoa neothunni* の 2 系統について, 第 154 回日本獣医学会学術集会, (2012.9)
22. 原田哲也, 河合高生, 陳内理生, 大西貴弘, 小西良子, 久米田裕子: 食中毒患者糞便からのナナホシクドア試験法, 第 33 回食品微生物学会学術総会, (2012.10)
23. 河合高生, 原田哲也, 陳内理生, 菊池裕, 大西貴弘, 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 (3), 第 33 回食品微生物学会学術総会, (2012.10)
24. 大西貴弘: クドアセプテンプククタタによる食中毒について, 平成 24 年度日本獣医師会獣医学術講演会, (2013.2)
25. 大西貴弘: クドアセプテンプククタタを原因とする食中毒について, 平成 24 年度大分県食品衛生監視員・と畜食鳥検査員・狂犬病予防員研究発表会, (2013.2)
26. 大西貴弘: クドアセプテンプククタタとザルコシスティスによる新しい食中毒, 徳島県公衆衛生獣医師協議会, (2013.2)
27. 大西貴弘: クドアを原因とする食中毒について, 平成 25 年度日本魚病学会春季大会, (2013.3)
28. 大西貴弘: クドアを原因微生物とする新しい寄生虫性食中毒, 第 86 回日本細菌学会総会, (2013.3)
29. 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)
30. 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)

31. 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)
32. 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)
33. 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)

総合研究（分担）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

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
総合研究（分担）報告書

分担研究者 小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究

クドアセプトンクタタの迅速簡易測定法に関する研究

研究要旨

喫食後短時間で発症し下痢、嘔吐を主症状とする原因不明食中毒の原因物質がヒラメに寄生するクドアセプトンクタタおよび馬肉に寄生するザルコシスティスであることが解明され、食中毒事件票にクドア食中毒およびサルコシスティスとして加えられた。本研究では、これらの食中毒の迅速簡便測定法を確立することを目標とした。一年目は、クドアセプトンクタタおよびザルコシスティス フェイヤーの免疫検出法の開発のためのニワトリ IgY 抗体とウサギ IgG 抗体を作成した。

2年目は、前年度作成したサルコシスティスフェイヤーウサギ IgG 抗体を用いたイムノクロマトを開発し、実際の馬肉を用いて評価を行った結果、特異性が比較的低いことが明らかになった。そのため、より特異性の高い抗体を得るため 15K タンパク抗原を大腸菌リコンビナントタのシパク質として大量作成に成功し、これを抗原として免疫抗体を作成することとした。3年目は、クドアセプトンクタタの表面抗原に対する抗体は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を主に開発した。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、核酸クロマト法は、 10^3 孢子/g のクドアを検出でき、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切出来ることが示された。

協力研究者

黒田 誠 国立感染症研究所
ゲノムセンター

竹内 史比古 国立感染症研究所
ゲノムセンター

乙竹 充 (独) 水産総合研究センター
森 広一郎 独立行政法人
水産総合研究センター

米加田 徹 独立行政法人
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

難波 豊彦 一般財団法人東京顕微鏡院

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

菊池 裕 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

吉成 知也 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

山崎 朗子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

古沢 博子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部

石崎 直人 麻布大学 生命・環境科学部

峯岸恭孝 (株) ニッポンジーン

宇治家武史 (株) カイノス

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クタタは、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、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。また厚労省は、平成24年6月から輸入時検査において、クドアセプトンククタタを発症推定量と考えられる 10^6 孢子/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。

そのため、予防対策等において迅速で簡便な方法が求められるようになった。現在のところ、クドア食中毒の予防対策は農水省の出荷前検査と厚労省の通知法があるが、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。現在クドア食中毒およびサルコシス食中毒について通知されている検査法は、リアルタイムPCRまたはコンベンションPCR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、一定の専門技術が必要で汎用的ではない。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. サルコシス フェイヤーの迅速簡便法

1) 抗体作成

抗ザルコシスフェアリー抗体の作成

ザルコシスフェアリーのソニケート全物質を抗原にウサギを用いて作成した。得られたウサギ抗血清をHitrap Protein Gカラムで精製し、IgG精製画分を取得した。この精製画分をSDS-PAGEで確認したところIgGのバンドを確認した。

2) ザルコシスフェアリー抗体のイムノクロマト法の開発と評価

テストストリップタイプ(図1参照)金コロイド、イムノクロマト部材、添加試薬類はニッポンジーン社製品を使用した。

1で作成した抗ウサギザルコシスフェアリーIgG抗体を用いて、メンブレンへの固相化と金コロイドへの標識を行った。さらに必須となるイムノクロマト用の各部材を組み合わせ、テストストリップを作製した(図1)。

本研究で作成した家兎抗シストポリクローナル抗体と、家兎抗15kDaポリクローナル抗体2種(A,B)を用いた、ポリバレントによるイムノクロマトグラフィ法の評価を行った。ザルコシス感染馬肉サンプル(横隔膜)は、通知法によるPCRで陽性が確認されたものを使用した。PCR法の結果により喫食者が発症するレベルであると考えられた。使い捨てメスを用いてミンチにした馬肉0.3gに0.05%のTriton X-100を添加したPBS、600 μ lを添加し、良く攪拌した。軽くスピンドウンした後、150 μ lをイムノクロマトストリップへ添加した。

2. クドアセプトンククタタの迅速簡便法

1) クドア胞子の精製

クドア感染ヒラメの筋肉を定量採取し、200 μ mのメッシュで裁断、濾過した後、100 μ mのメッシュでさらに濾過し、

1500 rpm X 10 分 10 度の条件で遠心した。沈殿を 10-30%のグラジエントパーコールにより遠心し、クドア胞子を精製した。

2) 抗クドアセプテンpunkタタ IgY 抗体の作成

抗クドアセプテンpunkタタ抗体はクドア胞子ソニケート全物質を抗原としてニワトリを用いて作成した。作成した IgY 抗体は ニワトリ抗血清を Hitrap IgY カラムで精製した。

3) 家兎クドアセプテンpunkタタ抗体の作成

精製クドア胞子を 10%ホルムアルデヒド溶液で固定したものを免疫抗原とした。ウサギを免疫動物として用い、 10^7 /ml のホルマリン固定クドアセプテンpunkタタ抗原溶液をアジュバント (TiterMax:フナコシ)と混合し、3 回免疫を行った。抗体価の確認のため、免疫前、一回免疫後、三回免疫後に採血し、抗血清を得た。

抗体価の確認は、凝集試験を用いた。各抗血清については、市販の ProteinG カラムを用いて、アルブミン等の血清タンパクを除去することによって IgG を精製した。IgG の精製度の確認には SDS-PAGE を用いて、溶出分画に単離バンドが表れていることを確認した。

た。

4) クドアセプテンpunkタタ胞子の表面タンパクの電気泳動

クドア胞子 100 ug 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。

5) 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、遠心濃縮機を用いてろ液を 250 uL 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。抽出バンドの DNA の DNA シークエンス、アミノ酸シークエンス、アミノ酸シークエンス情報、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. 抗クドアセプテンpunkタタ抗体および抗ザルコシステイスフェアリー抗体のイムノクロマト法

テストストリップタイプ (図 1 参照)

金コロイド、イムノクロマト部材、添加試薬類はニッポンジーン社製品を使用した。

2)で精製した抗ニワトリクドアセプテンpunkタタ IgY ポリクローナル抗体および抗ウサギザルコシステイスフェイヤー IgG 抗体を用いて、メンブレンへの固相化と金コロイドへの標識を行った。さらに必須となるイムノクロマト用の各部材を組み合わせて、テストストリップを作製した。

4.LAMP 法の開発

クドアセプテンpunkタタ胞子の表面タンパク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。

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