

合物を、Negative Control、Template DNA、Positive Control の順に、5 μ L ずつそれぞれ添加した。増幅器にセットし 63°C 30 分反応させ、濁度を経時的にモニタリングした。*K. thyrssites* 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ドア 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ンプを作成した。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、エ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. thyrssites 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. 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。

- 大分県農林水産研究指導センター 水産研究部
- (独) 水産総合研究センター 増養殖研究所
- 国立医薬品食品衛生研究所
- (一般財団法人) 東京顕微鏡院
- 麻布大学

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 匹ヒラメの筋肉を均等に採取して作成したプール検体とした。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) で作成した。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。

7. サルを用いた喫食実験

クドアセプテンpunkタタ 4×10^8 /head 胞子含有ヒラメ筋肉濾過液 (100 μ m mesh) を 10mL PBS 溶液として調整後、カニクイザル (体重 3.45 - 5.75 kg、♂) に食餌 30 分後それぞれ胃カテーテルにて投与して 24 時間観察した。その間に採取した糞のクドア胞子をリアルタイム PCR で測定した。

C. 結果

1. ザルコシスティスフェイヤーに感染した馬肉を用いたイムノクロマトグラフィ

抗 15kDa ポリクロの A を判定紙、B を金コロイド標識抗体に使用した場合に、喫食者が発症するレベルの馬肉 (横隔膜) で陽性ラインが得られることが確認された (図 2 ③)。判定はイムノクロマトリーダーの値で、15 分後: 25.8、30 分後 32.5:10 以上で目視可能とした。これらの結果から、イムノクロマト法によりザルコシスティスフェイヤーは測定が可能であることが分かった。

2. クドアセプテンpunkタタの迅速簡便法

クドア胞子を用いて IgY 抗体を作成し、ELISA の系を構築した¹⁾。しかし同じ抗体でイムノクロマト法を開発し

でも良好な結果は得られなかった。そのため、クドア孢子全体またはクドア孢子表面タンパクを用いてウサギ抗体の作成を試みたが、抗体価が期待したほど上がらなかった。

抗体作成と同時に遺伝子情報を用いる迅速法も検討した。核酸クロマト法はクドアセプトンクタタの 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℃ の保温下で計 31 分反応したのち、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。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することも分かった

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。濁度は自動的に機器に表示される。プライマーを変えることにより、検出感度が上がることが確かめられた。

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表 1 に挙げた。両者とも時間短縮、コストの低減が可能であり、クドアセプトンクタタに特異的な反応であること利点であることが分かった。

本研究で開発した 2 つの方法を妥当性試験により評価した。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。

表 2 に示したように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、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った。両者とも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。

3. クドアセプトンクタタ喫食のサルへの影響

Kudoa 孢子 8×10^8 /head 含有ヒラメ筋肉濾過液を摂食させた 2 匹とも陰性であった。これらの結果から、クドアセプトンクタタはサルに対しては感受性が低いことが示された。

D. 考察

抗ザルコシスティス抗体はウサギで作成した抗体を用いて、イムノクロマト法への応用が可能であることが確認された。本研究での抗ザルコシスティス抗体はザルコシスティス内のブラディゾイド(感染子虫)をソニケートして作成したため、被検体馬肉においてもソニケートする必要があることがある。もっと簡便化を図るため、今後は検体をソニケートしなくてもよい反応抗体

を作成する必要がある。

一方クドアセプテンpunkタタでは、抗体価の高い抗体は得られなかった。これは宿主から認識されにくい構造物を表面に有しているためと考えられる。そのため、抗体を用いる免疫測定法ではなく、より短時間で開発可能な遺伝子情報を用いる迅速簡便検査法を開発した。クドアセプテンpunkタタが感染しているヒラメは、他種のクドアも感染している可能性が高いし、新しい寄生虫の感染も報告されてきている。このような背景からクドアセプテンpunkタタに特異性の高い試験法を短時間で開発するには、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とLAMP法は、PCR法のように電気泳動をする必要が無い利点がある。また、高価な増幅器も必要なく、野外でも測定出来る利点がある。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。検疫所または養殖場から出荷するときには、多くの検体を扱うため、一定量の検体を採取してプールして、一度に検査するスクリーニング法を考慮した。両者とも迅速簡便法とも、プール検体に対応が可能で有ることが示された。

一方、馬肉中のサルコシステイスフェイヤーの検出のために、昨年度作成した抗体3種を用いて、実際の感染馬肉を用いてのイムノクロマト法を行った。

E. 結論

クドア食中毒およびザルコシステイスの検出法は、リアルタイムPCR法またはPCR法および顕微鏡検査を組み合わせた方法が通知法としている。しかし、通知法には高価な器材が必要であり、顕微鏡検査もサルコシステイスの場合には熟練が必要である。そのため、簡便で迅速な方法が切望されていた。

本研究は、サルコシステイスおよびクドア食中毒の衛生管理に適した迅速簡便試験法を開発することを目的として行った。サルコシステイスは、特異性の高い抗体の作成が成功したことから、イムノクロマト法を開発した。クドア食中毒ではクドアセプテンpunkタタ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。

参考文献

- 1) 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
- F. 研究発表
論文発表
1) 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

口頭発表

1. Sugita-Konishi, Y., Irikura, D., Saito,
M, Yahata, Y, Kamata, Y. : A parasite
toxin of *sarcocystis* in raw horse meat
causes a new food borne disease.

International Association for Food
Protection European Symposium

2. 小西良子ら、「ヒラメに寄生する
クドア セプトテンブクタタの新しい
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

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 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9)	核酸クロマト 法	LAMP 法	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	5 時間	1時間以内	1時間以内	3 時間
必要器材	PCR 電気泳動	なし	なし	リアルタイム PCR

表 2. クドア試験法の妥当性試験

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	LAMP 法	リアルタイム PCR
Blank	Blank	0%	0%	0%	5.01E+03
1.0x10 ⁴	3.3 x 10 ²	100%	100%	0%	5.91E+04
4.0 x10 ⁴	1.3 x 10 ³	100%	100%	0%	5.61E+05
5.8 x10 ⁵	1.9 x 10 ⁴	100%	100%	100%	1.77E+06
3.4. x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁵	100%	100%	100%	3.03E+07

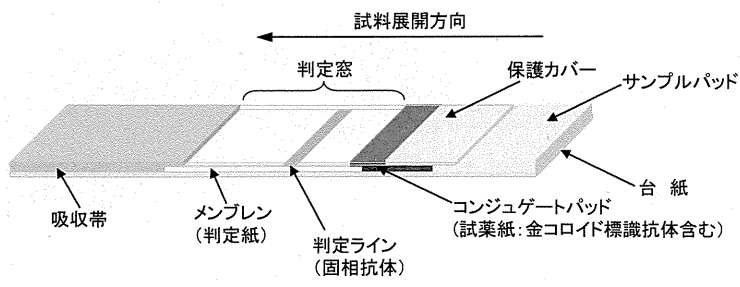
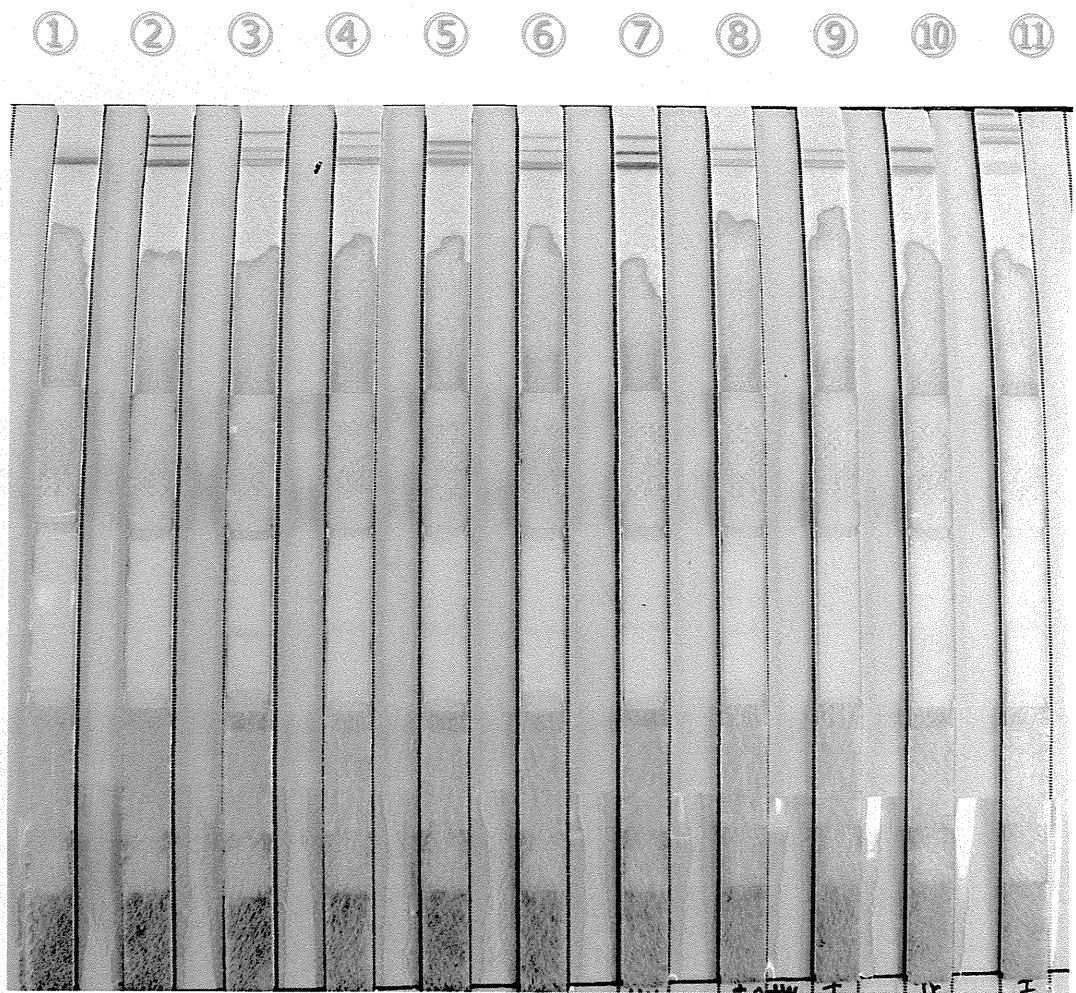


図 1. テストストリップ概略図



15min	7.6	5.7	25.8	16.8	15.8	13.3	17.2	11.1	9.5	5.7	10.8
30min	8.0	7.3	32.5	21.5	16.0	16.7	24.4	12.3	11.5	6.9	11.4

図2. サルコシステイス検出イムノクロマトグラフィーの結果

総合研究（分担）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

定量リアルタイム PCR (QPCR) 法による

K. septempunctata 検出法の開発

久米田 裕子

平成 23～25 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）

総合研究（分担）報告書

- I. 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
 - II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法による *K. septempunctata* 検出法の開発
- 分担研究者 久米田裕子（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）
協力研究者 河合 高生（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課）
協力研究者 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。そこで我々は、*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下痢発症機構の解明を目指すとともに、*K. septempunctata* による食中毒の診断および予防に資するための *K. septempunctata* 迅速検出法を開発することを目指し、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。

- I. 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
 - 1. *K. septempunctata* 孢子の腸管内液体貯留活性の発現に及ぼす要因について
 - 2. *K. septempunctata* 孢子投与後の乳のみマウスの腸管の光学顕微鏡解析
 - 3. *K. septempunctata* 孢子投与後の乳のみマウスの腸管の電子顕微鏡解析
- II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法による *K. septempunctata* 検出法の開発
 - 1. QPCR 法によるヒラメからの *K. septempunctata* 検出法の確立
 - 2. QPCR 法によるヒト糞便からの *K. septempunctata* 検出法の確立

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）。この *K. septempunctata* による食中毒では、患者はヒラメの喫食後短時間で下痢や嘔吐を発症するが、その発症機構については不明のままである。

我々は、平成 22 年度厚生労働科学特別研究事業「生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策」において、下痢発症モデル動物の 1 つである乳のみマウスを用いて、*K. septempunctata* 胞子が腸管内液体貯留活性、すなわち下痢原性を有することを証明するとともに、従来の乳のみマウス法を改良して *K. septempunctata* 胞子の下痢原性評価法を構築した。そこで本研究では、その評価法を使用し、乳のみマウスにおける *K. septempunctata* 胞子の下痢発症機構の機序について、組織学的解析によって調べることを試みた。

また、*K. septempunctata* による食中毒

が疑われる場合には、症状や発症時間などの疫学情報の収集に加え、原因物質を特定するために、喫食残品から *K. septempunctata* 胞子を検出することが必要となる。平成 23 年 7 月 11 日付食安発 0711 第 1 号において、顕微鏡による定量検査法に加え、18S rDNA を標的としたリアルタイム PCR 法による定量検査法（以下、暫定通知法）が示された。しかし、この暫定通知法で示されたプライマーおよびプローブの塩基配列を *Kudoa* 属粘液胞子虫 36 種の 18S rDNA 配列と比較したところ、これらが *K. septempunctata* に特異的でない可能性が示された。感染魚から抽出した 7 種類の *Kudoa* 属粘液胞子虫の DNA について暫定通知法のリアルタイム PCR 法を実施したところ、*K. thyrssites* と *K. neothunni* の DNA サンプルで PCR 産物の増幅が確認された。ヒラメには他種の *Kudoa* 属粘液胞子虫である *K. lateolabracis* や *K. thyrssites* が寄生することが知られており、*K. septempunctata* の同定にはこれらの種との鑑別が重要である。そこで、*K. septempunctata* を種特異的に検出できる定量リアルタイム PCR (QPCR) 法の開発を試みた。

さらに、我々は、疫学的に *K.*

sempunctata が疑われる食中毒では、喫食残品の入手が困難な事例が多いことを経験した。このような事例では、他の食中毒事例と同様に患者便の検査が要求されるが、これまでに *K. sempunctata* の検出に有用な患者便試験法は報告されていなかった。そこでヒラメからの検出法として開発した QPCR 法を応用し、食中毒患者便からの *K. sempunctata* 遺伝子検出法を確立することを試みた。

B. 研究方法

I. 乳のみマウスを用いた *K. sempunctata* 胞子の下痢原性に関する研究

1. *K. sempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性の発現に及ぼす要因について
胞子自体が下痢原性を担っているかどうかを調べるため、*K. sempunctata* 感染ヒラメから胞子を抽出し、パーコール処理によって胞子液を精製した。この精製胞子液を使って pH 処理、加熱処理、凍結処理および超音波破碎処理を行った後に乳のみマウス試験を行い、腸管内の液体貯留の指標である FA 値を測定した。また、様々な処理を行った胞子はトリパンブルー染色を行い、微分干渉顕微鏡で観

察した。

2. *K. sempunctata* 胞子投与後の乳のみマウスの腸管の光学顕微鏡解析

胞子投与後の乳のみマウスを経時的にと殺し、FA 値を測定した。その時の腸管を中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従い腸管をパラフィン包埋した。薄切した切片を、国立医薬品食品衛生研究所・菊池裕先生より分与を受けたニワトリ抗 *K. sempunctata* 胞子抗体を用いて免疫染色し、光学顕微鏡にて観察を行った。

3. *K. sempunctata* 胞子投与後の乳のみマウスの腸管の電子顕微鏡解析

1) 透過型顕微鏡解析

胞子投与後の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、免疫電子顕微鏡解析のために、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で固定した後に洗浄し、脱水後に LR-White 樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、ニワトリ抗 *K.*

sempunctata 孢子抗体と反応させ、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と順次反応させ、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。

2) 走査型顕微鏡解析

2%パラフォルムアルデヒド、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た試料を脱水後、n-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。

II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法による

K. sempunctata 検出法の開発

1. QPCR 法によるヒラメからの *K. sempunctata* 検出法の確立

1) QPCR 法の開発

K. sempunctata を含む 36 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫の 18S rRNA 遺伝子配列を比較し、QPCR 法の標的配列候補を決定した後、6 つの Forward プライマーと 4 つの Reverse プライマーを設計した。

K. sempunctata 孢子より調製した DNA 溶液を陽性コントロールとし、各プライマーペアについて Sybr® Gold による QPCR

反応を行い、良好な増幅および検量線が得られるプライマーペアを 5 組選んだ。

5 組のプライマーペア間の塩基配列の中に見出した *K. sempunctata* 特異的配列を認識するプローブを 3 つ作製し、これらのプローブと 5 組のプライマーペアを用いて QPCR 反応を行い、陽性コントロールで良好な増幅曲線が得られ、かつ陰性コントロールで非特異増幅のない組合せを決定した。

良好な反応性を示したプライマーについては、10 倍段階希釈した陽性コントロールを用いて検量線を作成し、定量性を確認した。

2) 組換えプラスミドによる QPCR 法の定量性、繰返し精度、再現性の確認

QPCR 標的領域を含む組換えプラスミドを作製し、検量線の確認および検出下限値の算出に用いた。また、10 週間内で異なる 3 実験日に検量線を作成し、再現性を確認した。

3) 特異性の確認

K. lateolabracis 感染ヒラメ、*K. thyrsites* 感染ヒラメ、*K. iwatai* 感染クロダイ、*K. iwatai* 感染スズキ、*K. trachuri* 感染マアジ、*K. thunni* 感染ビンチョウマグロおよび *K. neothunni* 感染クロマグロ

より DNA を抽出し、QPCR 法の特異性を確認した。

4) ヒラメを使用した検出実験

国立医薬品食品衛生研究所より入手した *K. septempunctata* の感染が疑われるヒラメ 76 検体を供試した。このうち感染が確認されたヒラメ 10 検体を、DNA 抽出法の検討および検体採取部位の定量性への影響評価に用いた。また、*K. septempunctata* 1 孢子あたりに含まれる 18S rRNA 遺伝子のコピー数の算出に 5 検体を用いた。

5) ヒラメからの DNA 抽出法の検討

K. septempunctata 感染ヒラメ 10 検体を用い、加熱法、アルカリ法、FastDNA SPIN Kit (Bio101) および DNeasy® Blood&Tissue Kit (QIAGEN) による DNA の抽出を行い、QPCR 法の cycle threshold (Ct) 値を用いて抽出効率を相対的に比較した。

6) 検体採取部位の定量性への影響評価

K. septempunctata 感染ヒラメ 10 検体を用い、有眼側および無眼側の各 2 か所からヒラメ筋肉をサンプリングし、DNeasy® Blood&Tissue Kit による DNA の抽出を行い、QPCR 法の Ct 値を用いて検体採取部位の定量性への影響を評価した。

7) *K. septempunctata* 1 孢子に含まれる

18S rRNA 遺伝子コピー数の算出

K. septempunctata 感染ヒラメ 5 検体からそれぞれ抽出・パーコール精製した胞子を用い、DNeasy® Blood&Tissue Kit (Blood プロトコール) を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 抽出液に含まれる 18S rRNA 遺伝子コピー数を QPCR 法で測定し、1 孢子に含まれる遺伝子コピー数を算出した。

8) QPCR 法と顕微鏡法との定量性の相関評価

ヒラメ 76 検体を用いて、QPCR 法での Ct 値と顕微鏡法による孢子数との相関性を、Pearson の積率相関係数を用いた重回帰分析により評価した。ヒラメ検体からの DNA 抽出は DNeasy® Blood&Tissue Kit で行った。

2. QPCR 法によるヒト糞便からの *K. septempunctata* 検出法の確立

1) ヒト糞便からの DNA 抽出法の検討

精製 *K. septempunctata* 孢子液を 1.6×10^4 個/g あるいは 1.6×10^6 個/g の濃度になるように添加したヒト糞便を用い、3 つの市販キット、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)、FastDNA SPIN Kit for soil (MP-biomedicals)、UltraClean Fecal DNA Kit (MO BIO) の DNA 抽出効率を、Ct 値に

より相対的に比較した。最も高い効率を示した DNA 抽出キットについては、 $1.6 \times 10^1 \sim 1.6 \times 10^3$ 個/g の孢子添加ヒト糞便を用い、検出下限値を測定した。なお、FastDNA SPIN Kit for soil では、取扱説明書の一部を改良し、DNA 抽出を実施した。

2) 患者糞便を用いた QPCR 法の有用性の検討

2011年5月～2012年7月に近畿地方で発生した28件の *K. septempunctata* による食中毒事例（疑い事例を含む）に由来する患者糞便93検体を用いて、本試験法の有用性を評価した。さらに、ヒラメの喫食と関連がなく他の病因物質が特定された下痢症患者糞便41検体（サルモネラ検出7検体、カンピロバクター検出7検体、ノロウイルス検出17検体）についても本試験法を実施し、非特異反応の有無を確認した。

C. 研究結果

I. 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

1. *K. septempunctata* 孢子の腸管内液体貯留活性の発現に及ぼす要因について

パーコール精製後の *K. septempunctata* 孢子は、パーコール精製前の孢子抽出液と同様に、PBS 投与群と比較して有意に FA 値を上昇させた。この FA 値の上昇は、精製孢子の投与数に依存し、 10^5 個以下の投与数では認められなかった。pH4、pH7、pH9 で1時間反応させた後の精製孢子は、反応前の精製孢子と同様に、PBS 投与群と比較して有意に FA 値を上昇させた。しかし、 75°C 5分以上の加熱処理や -80°C で1時間以上あるいは -30°C で1日間の凍結処理を行った孢子は、FA 値を上昇させることができなかった。さらに、超音波処理を行った精製孢子やその遠心上清、遠心沈渣も FA 値を上昇させなかった。

不活化処理前後の精製孢子をトリパンブルー染色後に微分干渉顕微鏡で観察した結果、FA 値を上昇させた精製孢子はトリパンブルーで染色されなかったが、FA 値を上昇させなかった加熱および凍結処理後の精製孢子は、トリパンブルーで染色された。

2. *K. septempunctata* 孢子投与後の乳のみ

マウスの腸管の光学顕微鏡解析

K. septempunctata 孢子の腸管内液体貯留活性の経時変化を調べたところ、FA 値は投与後 0.5 時間で上昇し始め、1.5 時間で最大となり、以後徐々に低下し、投与後 5～6 時間には投与後 0 時間の値まで

低下した。

投与後 1.5 時間の腸管組織を、抗 *K. septempunctata* 孢子抗体による免疫染色にて染色し、光学顕微鏡下で観察した。陰性対照として凍結処理を施した *K. septempunctata* 孢子を投与した場合、腸上皮に免疫染色像はほとんど観察されなかったのに対し、無処置の「生きた」*K. septempunctata* 孢子を投与したマウスでは、腸上皮に免疫染色像が観察された。

3. *K. septempunctata* 孢子投与後の乳のみマウスの腸管の電子顕微鏡解析

1) 透過型電子顕微鏡解析

K. septempunctata 孢子が乳のみマウスの腸上皮に接着する像、および腸管上皮細胞に孢子が接着し、その極囊から極糸が腸管上皮細胞に貫入する像が、それぞれ投与後 0 時間、1.5 時間に観察された。極糸であることの確認は、孢子殻、孢子原形質および極糸に反応するニワトリ抗 *K. septempunctata* 孢子抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析でも行った。

また、*K. septempunctata* 孢子が作用した腸管上皮細胞では、微絨毛の変性・消失、小胞体の膨化および細胞崩壊が起こり、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、孢子によって崩壊した細胞に隣接する細胞にも、ミトコンドリアの膨化といった障害が起きるこ

とも確認された。さらに、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。加えて、*K. septempunctata* 孢子は、上皮細胞の一部を隆起させることもあった。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。

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。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。

2) 走査型電子顕微鏡解析

投与後 1.5 時間および 3 時間の十二指腸では、腸上皮に接着した *K. septempunctata* 孢子が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。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。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。

II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法に

よる *K. septempunctata* 検出法の開発

1. QPCR 法によるヒラメからの *K. septempunctata* 検出法の確立

1) QPCR 法の開発

K. septempunctata 特異的塩基配列を認識する 3 つのプローブと 5 組のプライマーペアについて、15 通りの PCR 反応性と定量性の確認を行い、最も良好な検量線が得られた 1 つの組合せを、以下の検討に供試した。

2) 組換えプラスミドによる QPCR の定量性、繰返し精度、再現性の確認

組換えプラスミドを用いた定量性の検討では、 2.2×10^1 から 2.2×10^7 コピー/反応の範囲で良好な直線性を示す検量線が得られ、増幅効率₀は 99.91%を示した。本法の検出下限は 1.1×10^1 コピー/反応であり、良好な繰返し精度および高い日間再現性も確認された。

3) 特異性の確認

K. septempunctata 以外の 6 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫 DNA では、開発した QPCR 法で PCR 産物は増幅されなかった。

4) DNA 抽出法の検討

感染ヒラメ 10 検体を用いて 4 種類の抽出法を QPCR 法で相対的に比較した結果、DNeasy® Blood&Tissue Kit を用いた場合に、

10 検体中 7 検体で Ct 値が他と比べて有意に小さくなり、抽出効率が最も高かった。その他の 1 検体では本キットの使用でのみ陽性結果が得られ、残り 2 検体でも他の方法と同等の Ct 値を示した。以上の結果、DNeasy® Blood&Tissue Kit はヒラメからの *K. septempunctata* DNA 抽出に最も適していると考えられた。

5) 検体採取部位の定量性への影響評価

同一ヒラメの 4 部位から採取した筋肉より DNA を抽出し、QPCR 法を実施して Ct 値を比較した結果、胞子数が 10^5 個/g 以下のオーダーでは、6 検体中 5 検体で採取部位による Ct 値のバラツキが確認された。一方、 10^6 個/g 以上のオーダーでは、使用した 4 検体で採取部位による Ct 値のバラツキは確認されなかった。

6) QPCR 法と顕微鏡法との定量性の相関評価

ヒラメ 76 検体を用いて比較したところ、顕微鏡法で胞子が確認された 49 検体に加え、8 検体計 57 検体 (75%) が QPCR 法で陽性となった。2 つの方法で陽性となった 49 検体について胞子数と Ct 値の重回帰分析を行ったところ、QPCR 法と顕微鏡法の定量性には高い相関性が確認された。

7) *K. septempunctata* 1 胞子に含まれる

18S rRNA 遺伝子コピー数の算出

精製 *K. septempunctata* 胞子液 5 検体について、胞子数と 18S rRNA 遺伝子コピー数を測定した結果、1 胞子あたり 300 ± 21 ~ 1400 ± 140 コピーの 18S rRNA 遺伝子が含まれることが推測された。

2. QPCR 法によるヒト糞便からの *K. septempunctata* 検出法の確立

1) ヒト糞便からの DNA 抽出効率の検討

1.6×10^4 個/g の胞子添加糞便 3 検体を用いた DNA 抽出法の検討では、3 つの市販キットのうち FastDNA SPIN Kit for Soil が最も高い抽出効率を示した。また、 1.6×10^6 個/g の胞子添加糞便では、3 検体中 2 検体で本キットが有意に高い抽出効率を示した。

FastDNA SPIN Kit for soil を用いた場合の検出下限値は、糞便 1g あたり胞子 1.6×10^4 個で、高感度に胞子 DNA を検出することが可能であった。なお、この結果より、本試験法では $\Delta Rn=0.35$ で Ct 値 41 以下を陽性とする判定基準を設定した。

2) 患者糞便を用いた QPCR 法の有用性の検討

K. septempunctata による食中毒の患者糞便 93 検体のうち 53 検体が、本試験法

で陽性となった。陽性検体の Ct 値の範囲は 32.13 ~ 40.85 で、75.5% の検体が 35.0 cycles 以上の Ct 値を示した。陽性となったすべての検体では、リアルタイム PCR 産物の電気泳動で 159bp の増幅産物が確認され、nested-PCR 法でも特異的増幅産物を確認した。以上の結果、リアルタイム PCR 法により得られた結果は、特異的反応によって増幅されたことがわかった。

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。

ヒラメの喫食と関連のない下痢症患者糞便 41 検体では、本試験法による偽陽性は確認されなかった。

D. 考察

I. 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

1. *K. septempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性の発現に及ぼす要因について
パーコール精製した *K. septempunctata* 胞子は、精製前の胞子抽出液と同様に、

乳のみマウス試験で腸管内液体貯留活性を示した。この精製胞子の液体貯留活性は投与胞子数に依存し、活性を示すには約 10^6 個の胞子数が必要であった。精製胞子の腸管内液体貯留活性は、pH4~pH9のpH域では失活しなかったが、75°C5分以上の加熱処理、-30°C1日、-80°C1時間以上の凍結処理、および超音波処理により失活した。活性を示した *K. septempunctata* 胞子はトリパンブルーで染色されなかったのに対し、加熱および凍結処理により失活した胞子はトリパンブルーで染色された。トリパンブルーは細胞の生死判定に使用される染色液で、トリパンブルー色素排除能を失った細胞は死細胞と判定される。以上のことから、*K. septempunctata* が腸管内液体貯留活性を示すには、トリパンブルー色素排除能を有する、いわゆる「生きた」胞子が必要と考えられた。

2. *K. septempunctata* 胞子投与後の乳のみマウスの腸管の光学顕微鏡解析

乳のみマウスにおける *K. septempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性を経時的に調べた結果、FA値は投与後0.5時間で上昇し始め、1.5時間で最大値を示し、その後徐々に低下した。大腸菌耐熱性エンテロトキシン (ST) の場合、投与後1時間から8時間にかけてFA値は0.09以上の高値を示すことから、*K.*

septempunctata 胞子の腸管内液体貯留活性は一過性で、STよりも弱いと考えられた。

K. septempunctata 胞子投与後のマウスの腸管組織を光学顕微鏡下で解析したところ、HE染色後の腸管組織標本では胞子の存在を確認することが困難であった。しかし、抗 *K. septempunctata* 胞子抗体を用いた免疫染色後の腸管組織標本では、腸上皮に免疫染色像が観察された。一方、凍結処理後の胞子を投与した場合には、腸上皮に免疫染色像が観察されなかった。以上の結果、生きた *K. septempunctata* 胞子が腸上皮に接着・侵入すると考えられた。また、腸管組織に顕著な炎症像が観察されなかったことから、この胞子の腸上皮への接着・侵入が、腸管内液体貯留活性を惹起する可能性が考えられた。*K. septempunctata* 胞子の下痢原性機序の解明には、胞子の接着・侵入像をより詳細に観察する必要があると考えられた。

3. *K. septempunctata* 胞子投与後の乳のみマウスの腸管の電子顕微鏡解析

K. septempunctata 胞子投与後のマウス十二指腸では、胞子が腸管上皮細胞に接着し、極糸や胞子原形質が腸管上皮細胞内に認められた。さらに、胞子あるいは胞子関連物質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

体の膨化が起こり、細胞崩壊も起きることがわかった。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、魚体外に出た胞子は、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、胞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。*K. septempunctata* をはじめ、ほとんどの粘液胞子虫類の生活環は、いまだ解明されていないが、*M. cerebralis* の生活環と同様であると考えられている。透過型電子顕微鏡解析で、胞子の極囊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、*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、腸管内に液体貯留が起きる可能性が考えられた。

光学顕微鏡解析では、腸上皮に接着した胞子や腸上皮内にある胞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。電子顕微鏡解析においても上皮細胞が広範にわたって障害を受けたような像は観察されなかったことから、*K. septempunctata* 胞子は、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。

免疫染色後の光学顕微鏡解析では、*K. septempunctata* 胞子は腸上皮に侵入すると考えられたが、胞子自体には運動性はないこと、および電子顕微鏡解析の結果より、光学顕微鏡解析では、崩壊した細胞の位置に存在した胞子を上皮内に存在する胞子と見誤った可能性が考えられた。

ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞を使用した実験で認められた、胞子より遊離した胞子原形質が単独で腸管上皮細胞に侵入する現象は認められなかったことから、*K. septempunctata* 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、*K. septempunctata* がマウスの腸管で細胞障害を起し、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。

II. 定量リアルタイム PCR (QPCR) 法による *K. septempunctata* 検出法の開発