

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

検討の結果、我々が開発した QPCR 法は感度、定量性、特異性、繰り返し精度および再現性においてすべて良好であることがわかった。顕微鏡法による孢子数の検出限界が約 10^4 個/g であるのに対し、QPCR 法は 18S rRNA 遺伝子で約 10 コピー/反応であった。さらに、本検出方法は、現在ヒトに対して病原性を示すことが明らかになっている唯一の *Kudoa* 属粘液胞子虫である *K. septempunctata* を特異的に検出できることも明らかとなった。

QPCR 法の定量性に大きく影響すると考えられる要因の一つが、検体からの DNA 抽出法である。4 種類の抽出法を検討した結果、DNeasy® Blood&issue Kit が相対的に最も DNA 抽出効率が良く、定量試験にはこの方法を用いるのがよいと考えられた。しかし、本キットは、他の 3 種類の抽出法と比較して抽出に時間を要するという短所もある。迅速な定性的確認に QPCR 法を用いる場合は、他の抽出法を使用することも考慮すべきであると考えられた。

10^6 個/g 以上の孢子感染ヒラメでは、QPCR 法の定量性は、検体採取部位によって影

響をほとんど受けなかった。これまで報告された有症事例由来のヒラメ検体の多くは、 10^6 個/g 以上の *K. septempunctata* 孢子感染が確認されていることから、開発した QPCR 法を用いることで、わずかな喫食残品からも高感度で種特異的な定量試験が可能になると考えられた。

また、推測値ではあるが 1 孢子あたりの 18S rRNA 遺伝子のコピー数が決定できた。これにより、QPCR 法の結果を孢子数に換算できるため、顕微鏡法の結果との比較が可能になり、双方の試験法を用いることでより精度の高い食中毒検査の実施が可能になると考えられた。データは示さなかったが、*K. septempunctata* による食中毒が疑われた数事例において、QPCR 法を用いることにより、ヒラメのみならず、ヒラメとともに提供された別の食品や調理包丁の拭き取り検体から陽性結果が得られた。これらの結果は、*K. septempunctata* が食中毒病因物質であることを示唆するものであった。このように、開発した QPCR 法は感度と特異性が高く、様々な検体について検査の実施が可能であり、喫食残品の入手が困難な場合にも食中毒事例を検証する為の一つの有効な手段になると考えられた。さらに、

このQPCR法を用いることで、いまだ解明されていない交互宿主など *K. septempunctata* の生活環を調べるのが可能となり、感染予防につながることを期待できる。

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

孢子添加糞便を用いて検討した結果、市販3キットの中でFastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) が最も抽出効率が高く、検出下限値は糞便 1g あたり孢子 1.6×10^4 個であった。食中毒患者糞便検体を用いた場合、*K. septempunctata* による食中毒患者糞便 93 検体中 53 検体が陽性となり、ヒラメの喫食と関連のない下痢症患者糞便 41 検体はすべて偽陽性を示さなかった。以上の結果、我々が開発したQPCR法は、FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) によりDNA抽出を行うことで、食中毒患者便からも高感度かつ特異的に *K. septempunctata* DNA を検出できることがわかった。

大阪府では、平成24年度に発生した食中毒事例にQPCR法を適用し、*K. septempunctata* による食中毒として13事例を確定した。

QPCR法で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 *K. septempunctata* 孢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 *K. septempunctata* のDNAは極微量であると推察された。

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割に低下したとの結果は、本研究の成果の一つである。我々は、患者に経口摂取された大量の *K. septempunctata* 孢子が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と考えている。

なお、今回開発した患者糞便からの *K. septempunctata* 試験法については、「患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法」として、大阪府立公衆衛生研究所ホームページに掲載した (<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik.html>)。

E. 結論

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

1) *K. sempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性は、pH4~pH9 の pH 域では失活せず、加熱処理、凍結処理、超音波処理により失活した。

2) *K. sempunctata* 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」胞子が必要であると考えられた。

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

1) *K. sempunctata* 胞子の腸管内液体貯留活性は、一過性であることがわかった。

2) 抗 *K. sempunctata* 胞子抗体を用いた免疫染色の結果、*K. sempunctata* 胞子は腸上皮に観察されたが、凍結処理した胞子では腸上皮に胞子が観察されなかった。これらの結果より、「生きた」*K. sempunctata* 胞子が腸上皮に作用することにより、腸管内に液体貯留が起きると考えられた。

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) *K. sempunctata* 胞子が接着した腸管上皮細胞内に、極糸や胞子原形質が認められた。*K. sempunctata* 胞子の作用によって、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。

2) Caco-2 細胞を使用した *in vitro* 実験のように、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、観察されなかった。

3) 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. sempunctata* 胞子は、極糸、胞子原形質あるいは胞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。

4) 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. sempunctata* 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。

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) *K. septempunctata* を種特異的に検出できる QPCR 法を開発した。本法は、感度、定量性、特異性、繰り返し精度および再現性においてすべて良好であった。検出限界値は、18S rRNA 遺伝子約 10 コピー/反応であった。
 - 2) 10⁶ 個/g 以上の孢子感染ヒラメでは、検体採取部位による定量性への影響はほとんど認められなかった。
 - 3) 市販キットを含めた 4 種類の抽出法を検討したところ、DNA 抽出効率には DNeasy® Blood&Tissue Kit が相対的に最もよく、定量試験にはこの抽出法を用いるのがよいと考えられた。
2. QPCR 法によるヒト糞便からの *K. septempunctata* 検出法の確立
- 1) *K. septempunctata* による食中毒の患者糞便から、*K. septempunctata* を種特異的に検出できるリアルタイム PCR 法を開発した。
 - 2) 糞便からの孢子 DNA 抽出法について 3 種類の市販キットを検討した結果、FastDNA SPIN Kit for soil が最も抽出効率がよかった。開発した QPCR 法は、検出下限値が糞便 1g あたり孢子 1.6 × 10¹ 個で、高感度であった。
 - 3) 食中毒検体では、陽性検体の Ct 値の範囲は 32.13 から 40.85 で、75.5% の検体が Ct 値 35.0 以上を示した。QPCR 法の陽性率は、ヒラメの喫食から糞便

検体採取までの期間によって異なり、ヒラメの喫食から 3 日以内に採取された場合の陽性率は 67.7% であったのに対し、3 日を超えると 26.9% に低下した。

- 4) 開発した試験法は、「患者便からの *K. septempunctata* 遺伝子検出法」として、大阪府立公衆衛生研究所ホームページに掲載している (<http://www.iph.pref.osaka.jp/kansen/ik.html>)。

F. 研究発表

論文発表

1. Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y., Sugita-Konishi, Y., and Ohnishi, T. Identification of *Kudoa 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.
2. 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.

3. 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.

学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.

4. 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.
5. 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.
6. 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研究 (3), 第 33 回日本食品微生物学会学術総会, 2012, 福岡
7. 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

講演・シンポジウム

1. 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

2. 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
3. 久米田裕子. 最新食中毒事情 ー寄
生虫クドア・セプテンクタータによ
る食中毒の紹介ー, 食品の品質保証
懇話会, 2014, 大阪

総合研究（分担）報告書

生鮮食品中に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

黒田 誠

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（分担）研究報告書

生鮮食品に含まれる *Kudoa* 属の遺伝学的解析

研究分担者 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

研究協力者 竹内 史比古 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

研究協力者 関塚 剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

研究協力者 小笠原由美子 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

ナナホシクドアの寄生するヒラメの生食により嘔吐・下痢が起こることは、疫学的に明らかであり、細胞や動物の実験からも裏付けられている。しかし、ナナホシクドアが消化器のどこでどのように作用して食中毒を引き起こすかについての細胞生物学的な機序は未解明である。解明の基盤を整えるために、本研究ではクドアのゲノム解析を行う。また、遺伝子配列を用いた疫学調査や検出系開発のための基盤情報も提供する。

ナナホシクドア 2 検体と *Kudoa neothunni*, *Kudoa iwatai* について、次世代 DNA シーケンサを用いてミトコンドリアゲノムと核ゲノムの配列解読を行った。ナナホシ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。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。

ナナホシクドアについては、ゲノム配列解読に加えて、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。その結果、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。

腸内でのナナホシクドアの振る舞いを解明するために、ヒト腸管培養細胞との接触により、ナナホシ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、ナナホシクドアが 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。

研究目的

ナナホシクドアの寄生するヒラメの生食により嘔吐・下痢が起こることは、疫学的に明らかであり、細胞や動物の実験からも裏付けられている。しかし、ナナホシクドアが消化器のどこでどのように作用して食中毒を引き起こすかについての細胞生物学的な機序は未解明である。解明の基盤を整えるために、本研究ではクドアのゲノム解析を行う。また、遺伝子配列を用いた疫学調査や検出系開発のための基盤情報も提供する。

ナナホシクドアのゲノム配列解読に加えて、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。これにより、染色体構造やゲノムサイズを明らかにし、ゲノム配列決定の道標となる情報が得られた。

また、腸内でのナナホシクドアの振る舞いを解明するために、ヒト腸管培養細胞との接触により、ナナホシクドアの遺伝子発現がどう変化するかも解析した。具体的には、ヒト腸管培養細胞と未接触・接触後 1 時間・接触後 3 時間のナナホシクドアのサンプルを調製し、mRNA の配列を次世代シーケンサにより解読し、発現量に変化している遺伝子を探索した。

ナナホシクドアという種にどのような系統があるか、系統が地域ごとに異なるか、また系統ごとに食中毒性が異なるかを解明するために、ミトコンドリアゲノム配列を活用し、ミトコンドリア遺伝子の多型に基づく系統解析を行った。

研究方法

1. クドアのゲノム配列の解読

1) 核酸配列解読

食中毒残品のヒラメ刺身片、又は養殖ヒラメからナナホシクドア (*Kudoa septempunctata*) と *Kudoa neothunni* を抽出した。*Kudoa iwatai* については、キチヌのシスト由来の検体 KI-001 を横山博先生(東京大学)にご提供頂いた。検体から DNA を精製し、ペアエンドとメイトペアのライブラリを作成した。次世代シーケンサ GAIIX 及び MiSeq (Illumina) を用いて、DNA を配列解読した。ABYSS および Platanus プログラムを用いて、核およびミトコンドリアゲノムの配列をアセンブルした。BWA 及び samtools プログラムを用いて、解読した RNA をミトコンドリアゲノム配列に対してマッピングした。

2) 遺伝子解析

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。

3) 系統解析

ミトコンドリアゲノム上の遺伝子のそれぞれについて、他の後生動物の配列を

DDBJ/EMBL/NCBI から取得した。MAFFT プログラムによりアミノ酸配列を多重アライメントした後に、>90%の配列で欠失しているサイトを除外した。系統推定は、RAxML プログラムにより最尤推定を、PhyloBayes プログラムによりベイズ推定を行った。

2. 全ゲノム制限酵素地図の作成

1) ナナホシクダの染色体 DNA 調製

養殖ヒラメからパーコール遠心によりナナホシクダを抽出したもの（検体 201204・国内養殖場由来）を大西先生より頂いた。等量の低融点アガロースと混合し、ナナホシクダ 5×10^5 胞子を含む 0.5%アガロースの $100 \mu\text{l}$ プラグを作成した。1% N-lauroylsarcosine in EDTA (0.5M, pH8.0) 5ml に、プロテアーゼ K 10mg、TrypLE Express (Life Technologies) 1ml を添加したものにプラグを浸け、 37°C で 2 日間処理した。プラグを TE で 3 回洗浄した後に、Argus システム (OpGen) のプロトコルに従って DNA を調製した。

2) DNA 分子の制限酵素処理と光学的スキャン

Argus システムを用いて、DNA 分子を伸ばしてスライドガラスに接着した後に、制限酵素 *NcoI* で切断し、蛍光染色して断片をスキャンした。このようにして、各分子について、制限酵素断片の順番を保ったままで断片長を測定することができる。Low-density MapCard 7 枚、High-density MapCard 8 枚を用いてスキャンした。DNA

の品質の悪いレーンは目視で除外し、合計 762,752 分子を取得した。

3) 制限酵素地図のアセンブル

制限酵素地図のアセンブルは、OpGen 社のサーバ、および国立感染症研究所の Argus システムを用いて行った。前者は $\text{quality} \geq 0.2$ の 608,753 分子を用い、後者は $\text{quality} \geq 0.4$ かつ断片数 ≥ 12 かつ分子長 350~1400kb の 83,025 分子を用いた。アセンブルにより断片長のパターンが共通する分子はまとめられて contig となる。contig 中の特定の断片にマップされている分子の数(深さ)は 100 前後であった。深さが <30、あるいは他の箇所比べて <50%の断片については、アセンブルの間違いが無いか精査した。ただし、contig の端の断片、あるいは特に長い断片についてはこの限りではない。問題箇所の再アセンブルを行った結果、後述するヘテロな変異箇所を除けば、深さが小さくなっている断片は無くなった。

contig の端がテロメアに対応している場合は、分子の端が揃うことから判別できた。また、contig の端がセントロメアに対応している場合は、端から長く不揃いな断片がはみ出していることから分かった。contig の両端が各々テロメアとセントロメアになっている場合には、この contig は染色体腕全体に対応している。

4) 二倍体としての再アセンブル

上記の制限酵素地図のアセンブルにおいて、ヘテロな染色体領域が見つかり、二倍体であることが推測されたため、二倍体と

してアセンブルし直した。ヘテロな変異箇所は、二倍体の相同染色体間で異なる領域と推測された。そこで、各染色体ごと（父方、母方の各々）についてアセンブルをし直した。具体的には、変異箇所において、着目している染色体とは異なるタイプの分子を除外してから、アセンブルを行った。

最後に、制限酵素地図の精度をさらに上げるために、分子をマッピングして再アセンブルした。Argus システムの処理能力が限られているため、三回に分け、1) quality \geq 0.4 かつ断片数 \geq 12 かつ分子長 350~1400kb の 82,025 分子、2) quality \geq 0.2 かつ断片数 \geq 12 かつ分子長 370~1400kb の 85,318 分子、3) quality \geq 0.6 かつ断片数 \geq 12 かつ分子長 240~1400kb の 81,864 分子、について行った。

3. ヒト腸管培養細胞との接触によるナナホシクドアの遺伝子発現変化

1) ナナホシクドアと Caco-2 細胞の調製

養殖ヒラメからパーコール遠心によりナナホシクドアを抽出した(ロット 2012.04)。ナナホシクドア単体、および Caco-2 細胞(ヒト結腸癌由来の培養細胞)に掛けて 1 時間ないしは 3 時間放置したものの三種類のサンプルを調製した。以下では、Kudoa-0h, Kudoa-1h, Kudoa-3h とする。

2) RNA からのライブラリ作成と次世代シーケンサによる配列解読

FastTrack™ MAG Micro mRNA Isolation Kit (Invitrogen) にて mRNA を精製した。

ScriptSeq™ mRNA-Seq Library Preparation Kit ver2 (Epicentre) にてライブラリを製作した。次世代シーケンサ GAIIX (Illumina) にて 81 塩基の paired-end を解読した。解読配列数は、Kudoa-0h, 1h, 3h の各々について 16,273,130 対, 15,679,530 対, 15,804,159 対であった。

3) 解読配列の品質管理とヒト由来配列の除外

アダプター配列は SeqPrep プログラムにより除去し、また解読した 81 塩基の最初と最後の 1 塩基ずつを除去した。次に、PoPoolation パッケージにより信頼度の低い塩基を除去した。ヒトの参照ゲノム配列 (GRCh37.p2) に相同性のある配列を除外するために、BWA プログラムと MEGABLAST プログラム (E-value \leq 1e-8) を用いた。残った配列対の割合は、Kudoa-0h, 1h, 3h の各々について 58%, 2.1%, 1.8% であった。これらの配列中には、ナナホシクドアの配列以外に、ヒラメの配列及び除去し切れなかったヒト配列が少しずつ含まれている。

4) 解読配列のアセンブルと検証

ヒト由来配列除去後の三つのライブラリの配列をまとめ、Trinity プログラム (r2013-02-25) によりアセンブルした。このプログラムの長所は、参照となるゲノム配列がなくても、RNA の解読データのみから転写物をアセンブルできることである。アセンブルの結果、18,524 個の遺伝子について 38,353 個の転写物が得られた。

アセンブル結果を検証するために、ナナ

ホシクドアのドラフトゲノム(別途解析中)との相同性を MEGABLAST で調べた。ドラフトゲノムは、ナナホシクドアを冗長度>100 で解読しており、ナナホシクドアのゲノムをほぼ網羅している。ドラフトゲノムには、ナナホシクドアに加えてヒラメの配列も混入しているが、ヒトの配列は含まれていない。38,353 個の転写物のうち、ドラフトゲノムに相同性が無いもの(E-value > 1e-20) は 173 個 (0.5%) のみであり、残存しているヒト由来配列の割合は小さいことが確認できた。

さらに、ヒラメ由来配列の割合を推定するために、既知配列データベースに対して相同性検索を行った。各転写物について、核酸配列データベース nt(2012年10月26日版)に対して BLAST 検索し、相同なデータベース配列に基づいて MEGAN (ver. 4.62.3) を用いて由来する種を推定した (match score ≥ 70 , top match 10%, taxon support ≥ 1)。真正後生動物に割り当てられた 816 の転写物配列のうち、真骨魚類 (Teleostei) は 122 配列、霊長目 (Primates) は 110 配列、前口動物が 191 配列、刺胞動物が 153 配列だった。従って、ヒラメ由来配列の割合も小さいと推測された。

同様の検索をタンパク質配列のデータベース nr(2012年10月26日版)に対しても行った。全転写物について、正のストランド上で ≥ 50 アミノ酸からなる配列を抽出することにより便宜的に翻訳して 79,535 個のタンパク質配列を得た。BLAST 検索し、

MEGAN を用いて由来する種を推定したところ (match score ≥ 50 , top match 10%, taxon support ≥ 1)、真正後生動物に割り当てられた 7133 配列のうち、真骨魚類は 247 配列、霊長目は 21 配列、前口動物が 1056 配列、刺胞動物が 559 配列だった。核酸配列による検索と同様に、ヒラメ由来配列の割合は小さいと推測された。

後の解析で遺伝子発現量に変化した遺伝子を抽出するためには、発現量に変化していない大多数の転写物を基準にして正規化する必要がある。基準とする転写物の中に、ナナホシクドア以外の生物由来のものが多いと問題になる。上記の解析から、ヒト及びヒラメ由来の転写物が少しは混じっているものの、割合が小さいことが分かったので、発現量の正規化を行うに当たっては問題にならない。しかし、後に抽出する発現変動した転写物の一覧からは、ヒト及びヒラメ由来のものを個別に確認して除外する必要がある。

5) 遺伝子発現量の推定

Kudoa-0h, 1h, 3h での各遺伝子の発現量は、RSEM プログラムを用いて解析した。前節でアセンブルした転写物の参照配列に対して、Kudoa-0h, 1h, 3h のライブラリの各々についてマッピングを行った。マップされた配列対の総数 (RSEM プログラムの expected_count の和) は、各ライブラリで 7 154 666, 230 022, 200 928 だった。

最も転写量の多かった遺伝子はナナホシクドアの核 rRNA であり、各ライブラリにお

いて、18Sは 60 884, 118 482, 96 212 FPKM, 28S が 31 534, 111 382, 106 876 FPKM であった。FPKM は Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped (paired) reads という単位であり、これらのサンプルにおいては fragments per transcript per million mapped (paired) reads と値はほぼ同じであった。従って、18S (或いは 28S) rRNA がライブラリに占める割合は、Kudoa-0h では 5%程度、1h と 3h では 10%程度であった。

6) 発現変動遺伝子の抽出と機能推定

Kudoa-0h, 1h, 3h で発現量が変化している遺伝子は、Bioconductor プログラムの edgeR パッケージを用いて抽出した。各ライブラリの大きさ (総リード数) については、trimmed mean of M-values を用いて補正し、極端に発現量の大きい遺伝子に影響されないようにした。いずれかの 2 サンプルの比較で、統計的に有意 (FDR<0.001) に発現量が変化 (>4 倍あるいは<0.25 倍) している遺伝子を抽出したところ、33 個が該当した。

上述したように、発現量が変化した遺伝子のリストから、ヒト及びヒラメ由来のものを除外する必要がある。これは、ナナホシクドアゲノムのドラフト配列との照合、及び既知配列データベース (核酸については nt、タンパク質については nr) との相同性検索により行った。ナナホシクドアのゲノムドラフト配列については、ヒラメ由来の配列が混じっているが、ヒトの配列は含

まれていない。33 遺伝子のうちの 5 つは、ナナホシクドアのゲノムドラフト配列に相同性が無く、既知配列データベース中の霊長目の配列と相同だったので、ヒト由来のものと判定された。また、1 遺伝子については、既知配列データベース中の魚類の配列と相同性を示したので、ヒラメ由来のものと判定された。1h と 3h で同程度に発現が高くなっていたものに reverse transcriptase family protein があつた (遺伝子グループ comp21007) が、RNA-seq キット由来と思われるので除外した。残る 25 遺伝子がナナホシクドアで発現変動を示した遺伝子である。これらについて、機能を推定するために、既知配列データベース (核酸については nt、タンパク質については nr) との相同性検索を行った。

4. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクドアの系統分類

ミトコンドリアの *cox1* 遺伝子内のプライマ (mtDNA_cox1-F, mtDNA_cox1-R) および *1-rRNA* 遺伝子内のプライマ (mtDNA_1-rRNA-F, mtDNA_1-rRNA-R) を設計し、PCR を行い、サンガー法で核酸配列を解読した。上記で解読ができなかった検体については、さらに外側に設計したプライマ (*cox1* については mtDNA_cox1-F2, mtDNA_cox1-R2、*1-rRNA* については mtDNA_1-rRNA-F2, mtDNA_1-rRNA-R2) で事前に PCR しておいてから、上記の PCR を行った。プライマの配列を表 2 に示す。

3730xl キャピラリー型シーケンサ (Life Technologies) で核酸配列を解読した。両向きから解読したリードのベースコールとアセンブルには、Phred, Phrap, Consed を用いた。MAFFT を用いて複数検体の配列をアライメントした後に、MEGA5 で多型を確認した。

検体は、食中毒検体、韓国産、養殖場由来のナナホシクドア DNA を大西貴弘先生 (国立医薬品食品衛生研究所) にご提供頂いた。

研究結果

1. クドアのゲノム配列の解読

ナナホシクドア検体 0904 は、19425 bp の環状ミトコンドリア DNA を持っていた。タンパク遺伝子としては、cytochrome c oxidase subunits I, II (COX1, COX2), cytochrome b (CYTB), NADH dehydrogenase subunits 1, 5 (ND1, ND5) の5つが存在した (図1)。大小のリボソーム RNA 遺伝子は高い RNA 転写量から明確に識別できた。転移 RNA 遺伝子は検出できなかった。

ナナホシクドア検体 201204 については全配列 19,350bp を決定できた。検体 0904 と比較すると、塩基配列の 96~99% が一致していることが分かった (図2)。

ナナホシクドアと *K. neothunni* の種間比較では、遺伝子の領域 (細胞呼吸に関する COX1, COX2, CYTB, ND1, ND5、及びリボソーム RNA の大小サブユニット) のみが保存

されていることが分かった (図3)。

ミトコンドリアの5つのタンパク質のアミノ酸配列について、系統解析を行ったところ、後生動物は大きく二つ、左右相称動物とそれ以外 (刺胞動物・板形動物・海綿動物) に分類できた (図4)。左右相称動物は、さらに新口動物と旧口動物に分類でき、ナナホシクドアは後者に属した。従って、粘液胞子虫の起源については、刺胞動物説ではなく、左右相称動物説を支持する結果となった。

K. iwatai については、まだ複数のコンテイングに分かれたドラフト配列であるが、細胞呼吸に関する COX1, COX2, CYTB, ND1, ND5、及びリボソーム RNA の大サブユニットは全て存在していた。5つの遺伝子のアミノ酸配列を用いて系統解析を行ったところ、*K. iwatai* に比べるとナナホシクドア (*K. septempunctata*) と *K. neothunni* が近縁になっており、これは核の rDNA に基づく既知の系統関係と合致している (図5)。

核ゲノム配列については、ナナホシクドア (検体 201204) について、scaffold N50=71kb でありアセンブルはまだ完成には至っていない。

2. 全ゲノム制限酵素地図の作成

図6に *NcoI* によるナナホシクドアの制限酵素地図を示す。左端のテロメアから右端のセントロメアに至る染色体腕6本がアセンブルされた。3本の染色体が存在すると推測されるが、セントロメア部分での染

染色体腕の対応はまだ分かっていない。合計した 83mb がゲノムサイズである。染色体腕 A~D については、相同染色体の数カ所で 100kb 程度の挿入・欠失が起きていた(ピンクの斜め線で繋がれている箇所)。変異箇所では、マップされた分子の深さが約半分になっていた。従って、83mb の二倍体であることが推測される。染色体腕の E,F については相同染色体の当該腕同士が同一と思われる。

3. ヒト腸管培養細胞との接触によるナナホシクドアの遺伝子発現変化

表 1 の 25 遺伝子が、腸管細胞との接触によりナナホシクドアで発現変動を示した。いずれも接触前の 0h に比べ、1h ないし 3h で発現が増加している。発現が減少したものが見つからなかった理由は 1h と 3h の配列解読量が少なかったという方法論的なものであり、生物学的な理由ではない。25 遺伝子は、配列相同性から 16 の遺伝子グループにまとめられる。最も顕著に発現増加していたのは heat shock protein, Hsp-16 であった (遺伝子グループ comp17071, comp18162, comp19207)。既知配列と弱いながらも相同なものに、delta-1 and delta-2 crystallin genes (遺伝子グループ comp12448, $E=2e-5$) と hypothetical protein と (遺伝子グループ comp16083, $E=0.005$) がある。残りの 11 遺伝子グループについては、既知配列データベースには相同なものが無く ($E>0.01$)、機能は推定で

きていない。

4. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクドアの系統分類

cox1 の核酸配列については、二種類しか存在せず (*cox1-1*, *cox1-2* と名付けた)、それらは 5 箇所の一塩基多型で異なっていた。*l-rRNA* の配列についても、二種類しか存在せず (*l-rRNA -1*, *l-rRNA -2* と名付けた)、それらは 2 箇所の一塩基多型で異なっていた (図 7)。

食中毒事例、韓国産、養殖場由来の合計 117 検体 (少数の重複あり) を調べた結果を表 3~6 に示す。*cox1-1* かつ *l-rRNA -1* が 66 検体、*cox1-2* かつ *l-rRNA -2* が 49 検体あった。*cox1-1* かつ *l-rRNA -2*、あるいは *cox1-2* かつ *l-rRNA -1* の組み合わせについては、1 検体ずつしか検出されず、コンタミネーションなどの実験的な問題によるものと考えられる。従って、以降では *cox1-1* かつ *l-rRNA -1* のものを「ST1」、*cox1-2* かつ *l-rRNA -2* のものを「ST2」とよぶことにする (ST は sequence type の略)。

韓国産は全て ST1 であった (表 3, 5)。また、食中毒事例の韓国産成魚は、一例 (表 3 の検体 12) を除いて全て ST1 であった。従って、韓国産成魚のナナホシクドアの殆どは ST1 であることが推測された。

国内養殖所由来の検体は、ST1, ST2 の両型が入り交じっていた (表 3, 4)。

食中毒事例については、ST1 が多い傾向はあったが、両型が観察された (表 3)。

愛媛の大規模食中毒事例（表6）では、ST1, ST2 の両型が検出された。遺伝子型と食中毒症状（有症か無症か）には有意な関連がなかった（Fisher 正確検定 $P=1$ ）。また、遺伝子型とクドア量にも有意な関連はなかった（log クドア量の t 検定 $P=0.95$ ）。

考察

1. クドアのゲノム配列の解読

ミトコンドリアゲノムについては、ナナホシクドア 2 種、*Kudoa neothunni*、*Kudoa iwatai* の配列を解読した。ナナホシクドアの種内でも配列に多様性があるために、検出系を作るときには注意が必要である。この多様性を活かして、系統解析が行えた。異なる種のクドアのゲノム配列についても、今後の疫学解析のリソースとして利用できる。

核ゲノムについては、短い挿入長のライブラリに加えて中程度の挿入長のメイトペアライブラリを解読した。アセンブルはまだ完成には至っていない。

2. 全ゲノム制限酵素地図の作成

光学マッピングを用いてナナホシクドアの制限酵素地図を決定した結果、ゲノムサイズ 83mb で 3 本の染色体からなることが分かった。次世代シーケンサ解読によるゲノムのドラフト配列は、重複配列を除けば合計 83mb であり、ゲノムサイズについては同じ結果になっている。アセンブルの結

果、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。ナナホシ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 [Tyutyayev (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。

3. ヒト腸管培養細胞との接触によるナナホシクドアの遺伝子発現変化

ヒト腸管培養細胞と接触したナナホシ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ナナホシクドアの防御と解釈できる。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。クドアは培養さえもできない生物であるため、遺伝子の機能解析は難しい。しかし、食中毒の原因を探るという目的であれば、見つかった候補遺伝子について、タンパク質産生を質量分析などで確認し、さらに組換えタンパク質を作成して Caco-2 あるいはマウスに対する病原性を検討することもできる。

一方で、遺伝子発現の検討は、食中毒機序の解明には見当違いであることも考えられる。例えば、粘液胞子の表面に既にある

タンパク質が食中毒を起こしているとする
と、その遺伝子は腸管細胞との接触により
発現増強されるものではないからである。
喫食後の発症時間の中央値は5時間であり、
ナナホシクドアが腸管に到達してから転写
と翻訳を行うには時間が足りないとも考え
られる。

本実験は、ナナホシクドアの生活環の解
明にも示唆を与え得る。ナナホシクドアを
含むミクソゾアは、魚と環形動物の二つの
ホストに相互に寄生していると考えられて
いる。ヒラメ肉中のナナホシクドアの粘液
胞子が、ヒトに食べられたときに、環形動
物の腸内に入ったものと勘違いして、原形
質を放出して（環形動物の代わりに）ヒト
の腸管に侵入しようとしているとも考えら
れる。即ち、本実験の遺伝子発現変動は、
ナナホシクドアが環形動物に侵入するステ
ージを捉えているのかもしれない。

本解析の感度と特異度を上げるためには、
以下の追加実験が考えられる。本解析では
1h, 3h の配列解読量が限定的だったため、
これを増やすことにより感度を上げられる。
また、食中毒実験系として用いられている
乳飲みマウスについても、腸管内から回収
したナナホシクドアに対して同様の実験が
できる。Caco-2 との接触及びマウス腸管内
の双方の条件で発現量が上がる遺伝子を絞
り込むことにより、食中毒発生要因の探索
という意味での特異度を上げることができ
る。

4. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナ ナホシクドアの系統分類

ミトコンドリア遺伝子多型により、ナナ
ホシクドアを ST1, ST2 の二つの系統に分
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。従って、ミトコ
ンドリア遺伝子多型はヒラメに寄生するナ
ナホシクドアの由来の追跡（トレーサビリテ
ィ）に応用できる。

ミトコンドリア遺伝子多型により区別さ
れたナナホシクドアの二系統については、
食中毒性の違いは検出されなかった。

研究発表

論文

1. T. Kawai *et al.*, Identification of Kudoa septempunctata as the Causative Agent of Novel Food Poisoning Outbreaks in Japan by Consumption of Paralichthys olivaceus in Raw Fish, *Clin Infect Dis* 54, 1046 (Apr, 2012)

講演

1. 第 81 回日本寄生虫学会大会シンポジウム講演「新下痢原性寄生虫クドアの発見」（平成 23 年 3 月 23 日）

学会発表

1. 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(2012)。「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

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

表 1. ヒト腸管培養細胞との接触による発現変動したナナホシクドア遺伝子

Gene group, gene ID	FPKM			Function
	0h	1h	3h	
comp12448_c0	0	0	236	delta-1 and delta-2 crystallin genes (E=2e-5)
comp14810_c0	0	17	158	unknown
comp16083_c1	0	6	489	unknown
comp16083_c3	0	8	238	hypothetical protein (E=0.005)
comp16083_c4	0	41	339	unknown
comp16083_c5	0	0	221	unknown
comp16531_c0	0	0	200	unknown
comp16531_c1	0	8	136	unknown
comp17071_c0	123	2350	2907	heat shock protein, Hsp-16
comp17558_c1	0	27	316	unknown
comp17755_c0	2	0	285	unknown
comp18002_c0	3	9	311	unknown
comp18002_c3	2	16	348	unknown
comp18162_c0	14	441	543	heat shock protein, Hsp-16
comp18401_c0	0	23	360	unknown
comp18817_c0	0	0	294	unknown
comp18817_c2	0	0	204	unknown
comp18817_c5	0	6	654	unknown
comp19207_c0	0	148	203	unknown
comp19207_c1	39	7948	11291	heat shock protein, Hsp-16
comp19927_c0	4	15	165	unknown
comp19927_c4	7	18	471	unknown
comp20271_c0	8	100	732	unknown
comp43275_c0	5	54	115	unknown
comp101440_c0	0	117	163	unknown

表 2. ミトコンドリア遺伝子多型を用いたナナホシクダアの系統分類のためのプライマ

Primer name	DNA sequence
mtDNA_cox1-F	tatggcaaagaaggtctgat
mtDNA_cox1-R	tctagggattccacaaagac
mtDNA_cox1-F2	ttygatccytcwggaggagg
mtDNA_cox1-R2	ggwayycktctwggkrttcc
mtDNA_l-rRNA-F	gttccaacaagtccatgaaa
mtDNA_l-rRNA-R	gactttatggacaactcagc
mtDNA_l-rRNA-F2	aagtcgaaacacggtaggag
mtDNA_l-rRNA-R2	cagtcaagatactgctgcca