

従来の手法(例)	開発した手法
シークエンスデータをFASTA形式で出力 ↓ 検索対象株および遺伝子型参照株と合わせてFASTAファイルを作成 ↓ ClustalXでアライメントを実施 ↓ NJ法およびBootstrap検定で、phbファイルを作成 ↓ MEGAでphbファイルを開き、系統樹を描画 ↓ 系統樹を整形後、保存 ↓ 遺伝子型、株間の相同性を調べる ↓ シークエンスデータ、遺伝子型等の分析結果を表計算ソフトで保存	シークエンスデータをFASTA形式で出力 ↓ FASTAデータをエクセルファイルに変換 ↓ 検索対象株(遺伝子型判明)を対象にローカルBLAST検索を実行 ↓ 得られた解析結果を、解析済データに追加保存

図7 検出株の遺伝子相同性解析における従来の手法と開発した手法の比較

クドア食中毒様の症状を示す原因不明食中毒に関する研究

研究分担者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 都丸亜希子（国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 小西 良子（麻布大学）

研究協力者 緒方喜久代（大分県衛生環境研究センター）

研究協力者 堀川 和美（福岡県保健環境研究所）

研究協力者 江藤 良樹（福岡県保健環境研究所）

研究協力者 奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所）

研究協力者 森 英人（神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター）

研究協力者 峯岸 恭孝（ニッポンジーン）

#### 研究要旨

ヒラメの生食による原因物質不明の有症苦情事例は *Kudoa septempunctata* が原因であることをこれまでの研究で明らかにしてきた。しかし、ヒラメ以外の食材を原因食とする有症苦情では明らかになっていない点が多く残っている。本研究ではこれらの点に着目して研究を行った。

- 1) ヒラメ以外の魚による原因物質不明有症苦情の原因を明らかにするために Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 法を用いて検体中の微生物 DNA を網羅的に解析する系を作成した。シイラの喫食が原因と考えられる有症苦情事例の残品から *Kudoa thyrssites* と *Kudoa minithyrssites* の DNA が検出された。来年度はこの系を用いて事例検体に含まれる微生物 DNA の解析を行う。
- 2) *K. septempunctata* に対する LAMP 法を作成し、複数の研究機関によるコラボラティブスタディを行った。その結果、通知法の代換法としてこれらの検査法を使用するには感度の調節が必要であることが明らかになった。今後、感度を調整し改めて試験を行う予定である。
- 3) これまでの研究からウマヅラハギに *K. septempunctata* が寄生していることが明らかになった。寄生実態を明らかにするために市場より 31 尾のウマヅラハギを購入し、*K. septempunctata* の寄生を確認したところ、2 尾で *K. septempunctata* に対する PCR の結果が陽性となった。今後さらに継続して監視を行う予定である。
- 4) ヒラメを原因食とする有症苦情事例で、検体からクドア孢子が検出されない事例が報告されている。これらの事例検体の組織切片を作成し、抗クドア抗体で免疫染色を行ったところ、抗体で染色される微細な細胞が検出された。孢子に成熟していく過程のクドア細胞と思われた。今後これらの細胞の病原性について検討していきたい。

## A. 研究目的

近年、生鮮食品を共通食とする原因物質不明の有症苦情事例の報告が全国的に増加している。これらの事例における患者の症状は一過性の下痢や嘔吐であり、重症例はない。これらの事例では患者の喫食残品から既知の食中毒微生物や化学物質などが検出されず、検出されたとしても症状と一致しないことが特徴となっている。このような事例の中でヒラメを原因食とする事例では新種の粘液胞子虫の *Kudoa septempunctata* が原因微生物であることがすでに明らかになっている。また、馬肉の生食に起因する事例ではその原因微生物が *Sarcocystis fayeri* であることが明らかにされている。*K. septempunctata* や *S. fayeri* に関してはこれまでの厚生労働科学研究でその病原性やゲノム解析、疫学研究などを行ってきた。しかしながら、ヒラメや馬肉以外の食品、特に生鮮魚介類による原因物質不明の有症苦情事例が多く報告されており対応が望まれている。これらの事例では散発的な事例がほとんどで、ヒラメの事例のように頻発するものではないため、検体の入手が非常に困難である。そのため、原因物質を同定するのに必要な毒性実験を行えず、原因物質の同定が進まないのが現状である。しかし、毒性実験を行えない場合でも、残品中にどのような物質が含まれているのかを調査しておけば、事例を重ねるごとに喫食残品に共通している物質が明らかになり、原因物質の推定が可能になると思われる。そこで本研究では原因物質が微生物であるとの仮定の下、これらの事例の喫食残品中にどのような微

生物が存在するのかをメタゲノム解析によって明らかにし、そこから原因微生物の推定を行う。メタゲノム解析にはいわゆる次世代シーケンサーが汎用されるが、一回当たりのコストが非常にかかり、またその結果の解析に時間を要するなどスクリーニング検査には不向きであると考えられる。そこで本研究では Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 法 (DGGE 法) を用いて、解析を行う。DGGE 法は変性剤の濃度勾配を付けたポリアクリルアミドゲル中で二本鎖 DNA を泳動するもので、変性剤の働きによって二本鎖が解離し、ゲル中での移動度が遅くなることを応用して、DNA バンドを分離する方法である。変性剤濃度と二本鎖 DNA の解離のしやすさは塩基配列に依存するため、同じ長さの DNA 断片でも分離することが可能になる。DGGE 法による解析はしばしばリボゾーム DNA に対するユニバーサルプライマーを用いた PCR と組み合わせて用いられる。まず検体から DNA を抽出し、リボゾーム DNA に対するユニバーサルプライマーを用いて PCR を行い、増幅産物を DGGE 法を用いて分離する。PCR の増幅産物のような長さが同じ DNA 断片は通常の電気泳動では分離できないが、DGGE 法を用いることによって分離することが出来る。さらに分離した DNA バンドをシーケンスすることによって微生物種を特定できる。DGGE 法はその分離能の高さから、環境中の培養不可能な微生物の網羅的検出などに応用されている。本年度は DGGE 法を用いたメタゲノム解析の基礎的な条件の検討を行った。

これまでの厚生労働科学研究のなかで、*K.*

*sempunctata* がヒラメ以外の魚、特にウマヅラハギに寄生している可能性を示してきた<sup>1</sup>。これまでにウマヅラハギによる原因物質不明有症苦情事例の報告は我々が知る限りないと思われるが、ハギ類は現在、養殖化が進んでおり、今後消費が伸びるものと考えられる。そこで今後、ウマヅラハギが健康被害を引き越す可能性を考慮して、現時点でのウマヅラハギにおける *K. sempunctata* の寄生状況を調査した。

最近、ヒラメが原因食と想定される事例で、食中毒残品から *K. sempunctata* の DNA は検出されるが、*K. sempunctata* の胞子は検出されない事例が報告されている。つまり胞子に成熟する前の段階の *K. sempunctata* 細胞にも毒性がある可能性がある。本研究ではこのような事例での原因究明も行っていく。初年度はこのような事例検体中にどのような *K. sempunctata* 細胞が存在するのか解析を行った。

農水省ではヒラメを養殖場から出荷する前に *K. sempunctata* の検査を行うように指導している。また稚魚を養殖場に導入する際にも検査を行い、養殖場が汚染されるのを未然に防ぐように指導している。また厚生労働省では *K. sempunctata* 胞子が  $10^6/\text{g}$  を超えて含むヒラメに対して食品衛生法第 6 条違反を適用している。このように *K. sempunctata* 検査を行う機会が増加しているが、現在行われている検査法では試験法が煩雑で、作業時間も多く要するため、養殖場や検疫などの現場では、安価で迅速な検査法が求められている。そこでこれまでの厚生労働科学研究では、免疫学的検査

法と遺伝学的検査法を確立し、迅速簡便なクドア試験法の開発を目指してきた。昨年度の厚生労働科学研究では、LAMP 法および核酸クロマト法を作成し、スクリーニング目的に 30 尾のヒラメをプールして作成したプール検体から検出できるかどうか従来の PCR 法と比較、また、5 機関で妥当性を評価した。その結果、核酸クロマト法は 1 グラム当たり  $10^3$  胞子のクドアを検出出来、農水省が養殖場における出荷検査のために開発した PCR 法と同等の感度を示した。一方、LAMP 法は、厚労省が定める食品衛生法違反 ( $1$  グラム当たり  $10^6$  胞子) 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。よってこれらの方法がスクリーニング目的に使用できることが明らかになった。一方で、食中毒検査にもこれらの手法を利用できるようにしてほしいとの要望を受けている。そこで、今年度は 1 個体のヒラメを対象として定性下限が 1 グラム当たり  $10^5$  胞子という暫定検査法に準じた感度になるように検査法の改良を行う。

## B. 研究方法

### 1. 有症苦情事例残品中の微生物 DNA の網羅的解析法の作成

シイラの喫食による有症苦情事例検体は沖縄県衛生環境研究所より分与いただいた。参考品は市場より購入した。魚肉からの DNA 抽出は QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて行った。まず、得られた DNA を用いて、真核生物の 18S リボゾーム DNA に特異的な二組のプライマーセット (EU、EU SetB) および原核生物の 16S リボゾーム DNA に特異的なプライマーセット

(Pro) を用いて PCR を行った<sup>2,3</sup> (表 1)。PCR 反応液 (50  $\mu$ l) の組成は Ex Taq (TAKARA) 0.25  $\mu$ l、プライマーはそれぞれ 0.5  $\mu$ M、dNTP MIX (それぞれ 2.5 mM) を 4  $\mu$ l、Taq に添付のバッファーである。PCR 反応プログラムは表 2 に示す<sup>2,3</sup>。DGGE は DGGE ミニ電気泳動システム NB-1490 (日本エイドー) を用いて行った。電気泳動は 35% から 65% に変性剤濃度を付けたポリアクリルアミドゲルを 60°C に保温した TBE バッファー中で 50V の条件で行った (変性剤濃度 100% は 7M 尿素、40% ホルミルアミドとする)。泳動後のゲルは SYBR Safe DNA gel stain (Life Technologies) で染色した。必要な DNA バンドは切り出して、ミリ Q 水に 4°C で一晩浸漬し DNA を抽出し、シーケンス解析を行った。得られた塩基配列の由来は NCBI の遺伝情報データベースで BLAST 検索を行い決定した。

## 2. ウマヅラハギにおける *K. septempunctata* 寄生状況の調査

ウマヅラハギは全国の市場から天然のものを購入した。*K. septempunctata* の暫定検査法に従い 1 尾当たり 2 か所から 25 mg ずつ採材し、QIAamp DNA Mini kit を用いて DNA 抽出を行った。*K. septempunctata* DNA の検出は水産庁 栽培養殖課「ヒラメに寄生した *Kudoa septempunctata* の検査方法について」(2012 年 5 月) に従って定性 PCR を行った。PCR で陽性になった場合、厚生労働省の暫定検査法に従い *Kudoa* 胞子数と定量 RT-PCR による *Kudoa* DNA のコピー数を測定した。

## 3. *Kudoa* 胞子が検出されないヒラメ有症苦情事例の原因究明

福岡県で発生したヒラメが原因食材と疑われる有症苦情事例の検体を用い組織切片を作成した。検体は福岡県保健環境研究所より分与していただいた。この事例では暫定通知法による定量的 PCR 法で 1 グラム当たり  $10^6 \sim 10^7$  コピーの *K. septempunctata* DNA が検出されているが、胞子を検出ができなかった。これらの検体をホルマリンもしくはパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋を行った。組織をマイクロトームで薄切後、脱パラフィンを行った。Proteinase K (DAKO) で抗原の不活化を行った後、Biotin-Blocking System (DAKO) および Protein Block Serum free (DAKO) でブロッキングを行った。その後、抗クドア抗体と 4°C、1 時間反応させた後、Alexa Fluor 594 Goat anti-chicken IgG (Invitrogen) と室温で 1 時間反応させた。SlowFade Gold antifade reagent with DAPI で封入後、蛍光顕微鏡で観察した。

## 4. *K. septempunctata* に対する LAMP 法の作成

*K. septempunctata* の LAMP 法は精製クドア胞子の TritonX 可溶化抗原のアミノ酸配列をもとに LAMP 法プライマーを作成した<sup>4</sup>。これまで研究成果から本 LAMP 法がスクリーニング目的に適応できることが明らかになっている。今回の研究では本 LAMP 法を食中毒検査に使用できるように 1 個体のヒラメを対象に通知法の規準である 1 グラム当たり  $10^5$  胞子を定性下限となるように感度の調整を行った。さらに複数

機関による妥当性評価を行った。妥当性試験には大分県衛生環境研究センター、福岡県保健環境研究所、神戸市環境保健研究所、神戸検疫所輸入食品・検疫検査センターの4機関が参加した。5濃度の検体を用意し、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配布した。試験は以下の手順で行った。まず、1.5 ml Tube にヒラメ試料 50 mg を採取し、EasyPrep Reagent for LAMP (簡易 DNA 抽出液) を 100 ml 添加し Vortex にて良く攪拌した。95-100°C、10 分間保温した後、1 分間氷冷した。その後、遠心分離 (15,000×g, 5 min) を行い、新たな 1.5 ml マイクロチューブに上清 10 ml を回収し、DW40 ml (5 倍希釈) を加え、Template DNA とした。LAMP 反応後、結果は蛍光測定器 (GenieII、ニッポンジーン) で測定、解析した。

### C. 研究結果

#### 1. 有症苦情事例残品中の微生物 DNA の網羅的解析法の作成

原因物質不明有症苦情事例の原因物質を特定するために、DGGE 法を用いたメタゲノム解析の応用を試みた。まず最初に文献調査を行い、検体中の DNA を PCR で増幅するためにリボゾーム DNA をターゲットとしたユニバーサル PCR プライマーの作成を行った<sup>2,3</sup>。原核生物は 16S リボゾーム DNA を、真核生物は 18S リボゾーム DNA を対象とした。また、真核生物の場合、そのプライマーによって検出できる生物に偏りがあることが知られている。そこで、今回の研究では真核生物に対して 2 組のプライマーセ

ットを用意した (表 1)。まず最初に予備実験として *Kudoa* 属が寄生していることがわかっているヒラメおよびマグロから DNA 抽出を行い、原核生物 1 組、真核生物 2 組のプライマーセットでそれぞれで PCR を行い、DGGE 法で解析を行った。その結果、真核生物のプライマー (Eu) を用いると *K. septemountata* とヒラメの DNA を検出することが出来た (図 1)。今回の例ではヒラメと *K. septempunctata* 以外の真核生物の DNA は検出できなかった。しかし、プライマー Eu SetB では魚の DNA のみで、*Kudoa* の DNA は検出できなかった。一方、原核生物のプライマーを用いると *Flavobacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Rhodococcus* 属、*Brochothrix* 属などの細菌を検出することが出来た (図 2)。そこで、この系の検出感度を調べるために *K. septempunctata* のコピー数が既知のサンプルを用いて、解析を行ったところ、PCR 反応液中に  $10^2$  コピーの *K. septempunctata* DNA が含まれていると検出できることが明らかになった (図 3)。現在のところ *K. septempunctata* 孢子 1 個当たり 100~1000 コピーのリボゾーム DNA が含まれていると考えられている。そこから計算するとヒラメ 1 グラム当たり 100~1000 個のクドア孢子が含まれていれば、この系で検出できることが明らかになった。そこで、原因物質不明有症苦情事例の内、シイラが原因食と疑われる 2 事例に関して、その残品を DGGE 法で解析した (図 4、5)。事例の概要を表 3 に示す。その結果、事例 2 の検体から *K. minithyrsites* と *K. thyrsites* が検出された。これらの *Kudoa* 属は事例 1 および参考品か

らは検出されなかった。一方、原核生物は事例 1、2 から *Brochothrix* 属、*Pseudomonas* 属などの腐敗細菌が共通して検出された。また、事例 1 からは *Serratia* 属も検出された。一方、参考品からは *Chryseobacterium* 属、*Burkholderia* 属、*Listeria* 属、*Clostridium* 属などが分離された。

## 2. ウマヅラハギにおける *K. septempunctata* 寄生状況の調査

ウマヅラハギにおける *K. septempunctata* の寄生状況をスクリーニングするために国内 6 地域より 31 尾を購入した。1 尾当たり 2 か所から DNA を抽出し、*K. septempunctata* 特異的 PCR を行ったところ、2 地域からそれぞれ 1 尾ずつ、計 2 尾が PCR 陽性となった。シークエンスを行い確認したところ、1 尾から *K. thyrssites* の寄生が確認された。もう 1 尾に関しては現在、*K. septempunctata* であるかどうか最終的な確認を行っている。これらの個体の *Kudoa* 孢子数の確認を行ったが検出限界以下であった ( $10^5/\text{g}$  未満)。またこれらの個体から DNA を抽出し、*Kudoa* DNA のコピー数を測定したところ  $10^3\sim 10^4$  コピー/g だった。

## 3. *Kudoa* 孢子が検出されないヒラメ有症苦情事例の原因究明

ヒラメの喫食による有症苦情事例で、*K. septempunctata* の DNA は検出されるが孢子は検出できない事例が報告されている。今回こういった事例のヒラメ組織を *K. septempunctata* 特異的抗体で染色し、ヒラメ組織中の *K.*

*septempunctata* 細胞の検出を試みた。その結果、特異的抗体と DAPI で染色される約 5~10  $\mu\text{m}$  の細胞が組織中に認められた (図 6)。細胞は組織全体に認められたが、局所的に集中して存在している個所もあった。しかし、孢子や多核体と思われる細胞は認められなかった。

## 4. *K. septempunctata* に対する LAMP 法の作成

これまで厚生労働科学研究で開発を行ってきた *K. septempunctata* に対する LAMP 法を食中毒検査に使用できるように感度の調整を行った。そこで、今回改良した LAMP 法が食中毒検査に準じた感度を有しているかどうかを確認するために、4 機関で評価した。その結果、今回の検査法は 1 グラム当たり  $1.8\times 10^4$  孢子のクドアを検出できることが明らかになった (表 4)。

## D. 考察

### 1. 有症苦情事例残品中の微生物 DNA の網羅的解析法の作成

ヒラメを原因食材とする原因物質不明の有症苦情事例は *K. septempunctata* によって引き起こされることが明らかにされたが、他の多くの魚肉の生食に起因する有症苦情事例の原因は不明のまま残されている。これまでに報告されているものはマグロ、カンパチ、シイラ、ブリ、サワラなどの事例である。これらの事例は散発的に発生し、残された検体も多くはないため、原因の究明は非常に困難である。そこで現時点では、まずこういった有症苦情事例の検体収集を行い、その検体に含まれる物質 (微生物、

化学物質など)を解析し、その中で特定の魚種に共通して存在する物質を特定していくことが、原因究明の近道であると考えられる。本研究ではまず微生物を原因物質と想定し、検体中にどのような微生物が存在するのかを DNA を網羅的に解析することによって明らかにしていく。DNA の網羅的解析にはいわゆる次世代シーケンサーが汎用されている。しかし、次世代シーケンサーは 1 検体の解析にかかる費用が高く、結果の解析に多くの労力が必要であるなどルーチンのスクリーニング業務には使いづらい面がある。そこで本研究では環境中の培養不能な微生物の網羅的検出に利用されている DGGE 法が有症苦情事例の検体の解析に応用できないか検討を行った。DGGE 法は変性剤の濃度勾配を付けたポリアクリルアミドゲル中で DNA を泳動する方法である。変性剤の働きによって二本鎖が解離していき、ゲル中の移動度が変化することを利用し DNA を分離する方法である。変性剤濃度と二本鎖の解離のしやすさは塩基配列に依存するため同じ長さの DNA 断片でも分離することが可能になる。検出感度に関しては次世代シーケンサーが有利であるが、食中毒の原因微生物を同定するという目的を考えた場合、極端な高感度は必要ではなく、検体中の主要な微生物を検出できればよいと思われる。また DGGE 法を利用した場合、PCR に数時間、電気泳動に 1 日、DNA シークエンスに半日程度と 16 検体の結果を 2~3 日程度で得ることが出来るため、多検体処理が必要なスクリーニング検査に向いていると思われる。本研究ではリボゾーム DNA のユニバーサルプライマーを

用いて検体中の DNA を PCR で増幅した後、DGGE 法で DNA 断片を分離し、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定した。まず最初に *Kudoa* 属が寄生しているヒラメおよびマグロから DNA 抽出を行い、予備実験を行った。その結果、真核生物を対象とするプライマー (Eu) で PCR を行い DGGE 法で解析すると、ヒラメおよび *K. septempunctata* の DNA を検出することが出来た。しかし、同じく真核生物を検出するための別プライマー (Eu setB) では検出できなかった。また今回示していない他の検体を対象とした実験でも Eu と Eu setB との間で検出できる生物種が異なることが明らかになった。今後は 2 種類のプライマーを併用して研究を進めると同時に、よりユニバーサルなプライマーの検討をさらに行う。一方、原核生物を対象としたプライマーで PCR を行い、DGGE 法で解析を行ったところ、*Flavobacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Rhodococcus* 属、*Brochothrix* 属などの腐敗細菌を主に検出することが出来た。次にこの系の検出限界を測定した。その結果、PCR 反応液中に  $10^2$  コピーの *K. septempunctata* DNA が含まれているとこの系で検出できることが明らかになった。これを孢子数に換算するとヒラメ 1 グラム当たり 100~1000 個の孢子が含まれていれば、この系で検出できることになる。*K. septempunctata* が食中毒を引き起こすためには少なくとも 1 グラム当たり  $10^5$  以上の孢子が検体に含まれている必要がある。よって、今回作成した系の感度は十分な感度を有していると考えられた。そこでシイラが原因食と想定される有症苦情事例由来の 2



検体と参考品 2 検体とを、今回作成した系を用いて解析した。その結果、*K. minithyrsites* と *K. thyrsites* が事例 2 から検出された。しかし、事例 1 および参考品からこれらの寄生虫は検出されなかった。またこれらの寄生虫とシイラを除いた他の真核生物は検出されなかった。*K. thyrsites* は宿主域が非常に広く、シイラにも寄生することが報告されている。ジェリーミートを引き起こす原因として知られている。一方、*K. minithyrsites* はハタンポに寄生することが確認されているが、シイラから分離された報告はない。いずれの種も人への危害性は確認されていない。今後、さらに事例検体の収集を行い、これらの寄生虫がシイラによる有症苦情事例検体から検出されるか検討を行う必要がある。次に検体中の原核生物の解析を行った。その結果、事例検体から *Brochothrix* 属、*Pseudomonas* 属、*Serratia* 属などいわゆる腐敗細菌が主に検出された。しかし、参考品からは検出されなかった。これらの細菌は低温でも増殖可能であることから、検体の保管中に増殖した可能性が高いと思われる。しかし、*Pseudomonas* 属、*Serratia* 属は特定の条件では人への病原性を示すことが報告されている<sup>5,6</sup>。そのため、引き続きこれらの細菌に対しても検討していく必要があると思われる。今回は条件検討のための予備実験を中心に行ったが、国立医薬品食品衛生研究所には全国の自治体から分与いただいた原因不明有症苦情の検体を保管している。来年度以降、これらの検体も引き続き解析を行い、原因微生物の同定を行う予定である。

## 2. ウマヅラハギにおける *K. septempunctata* 寄生状況の調査

昨年度の厚生労働科学研究でウマヅラハギから *K. septempunctata* が検出された。そこで今年度からウマヅラハギでの *K. septempunctata* の寄生状況を継続して調査を行うことにした。まず初年度は全国 6 地域より 31 尾のウマヅラハギを購入し調査した。その結果、2 尾で *K. septempunctata* に対する PCR が陽性となったが、シークエンスで確認したところ 1 尾からは *K. thyrsites* の寄生が確認された。もう一尾に関しては現在最終確認中である。これらの検体の孢子数を測定したところ定量限界以下であった ( $10^5$ /g 未満)。また、暫定検査法による *K. septempunctata* DNA のコピー数は  $10^3 \sim 10^4$ /g と低い値を示した。以上の結果から、今回のウマヅラハギにおける *Kudoa* 属の寄生が *K. septempunctata* であったとしても、寄生は少量であると思われる。今後も引き続き監視を行い、食中毒を起こしうるだけの強度の *K. septempunctata* の寄生が見られる個体が存在するのか、また自然界における *K. septempunctata* とウマヅラハギの関係について検討していく必要が認められた。さらに、ウマヅラハギだけでなくハギ類全体に対しても同様の寄生が見られるのか検討していく必要があると思われる。特にカワハギは刺身用の食材として養殖に取り組む自治体が増えている。ヒラメのように種苗や養殖場の汚染が進む前に実態調査を行い、対策を講じていく必要があると思われる。

### 3. *Kudoa* 孢子が検出されないヒラメ有症苦情事例の原因究明

ヒラメが原因食材として想定される原因物質不明有症苦情事例の内、高いコピー数の *K. septempunctata* DNA がヒラメから検出されるが孢子は検出されないという事例の報告がある。*K. septempunctata* はヒラメの組織内に侵入後、多核体の形成による無性生殖を繰り返し増殖していく。やがてこれらの細胞が分化し、孢子を形成していくと考えられている。前述のような DNA は検出されるが孢子は検出されない検体には、孢子になる前の *K. septempunctata* 細胞が存在していると思われるが、どのような分化段階の *K. septempunctata* 細胞が存在しているのか不明である。そこで今回の研究では、高コピー数の *K. septempunctata* DNA が検出されるが孢子は検出されないヒラメが原因食材として疑われる事例のヒラメ組織中のクドア細胞を *K. septempunctata* 特異的抗体で免疫染色し観察した。その結果、特異的抗体と DAPI で染色される約 5~10  $\mu$ m の細胞が観察された。しかし、孢子や多核体などの細胞は認められなかった。今回、抗体で染色された細胞が *K. septempunctata* の生活環の中でどの段階の物か特定できなかつたが、もし、今回の事例の原因食がこのヒラメであるとすると、この細胞がヒトへの健康被害を引き起こしている可能性がある。今後、孢子に分化する前の段階の *K. septempunctata* 細胞の毒性についても検討を行っていく必要が認められた。

### 4. *K. septempunctata* に対する LAMP 法の作成

これまでの厚生労働科学研究で *K. septempunctata* に対する LAMP 法と核酸クロマト法の開発を行ってきた。これらの方法は養殖場などでのスクリーニング検査に最適化して開発を行ってきた。今回は *K. septempunctata* に対する食中毒検査に LAMP 法が使用できるように定性下限が 1 グラム当たり  $10^5$  孢子になるように改良を試みた。この改良品を用いて 4 機関によるコラボラティブスタディを行った。その結果、今回の検査法は 1 グラム当たり  $1.8 \times 10^4$  孢子の検体を陽性と判定してしまうことが明らかになった。今後さらに改良を行い、食中毒検査に本試験法が利用できるようにしたい。

### E. 結論

有症苦情事例検体中の微生物 DNA を網羅的に解析する系を DGGE 法を用いて構築した。今後この系を用いて有症苦情事例検体に含まれる微生物 DNA の解析を行い、原因微生物の推定を行う。

昨年、ウマヅラハギにおける *K. septempunctata* の寄生が確認された。今年度の研究からもウマヅラハギに *K. septempunctata* が寄生している可能性が示された。今後も継続して調査を行い、ヒトへの危害要因としてのウマヅラハギの危険性を検討する。

有症苦情事例検体の原因食材として疑いのある *K. septempunctata* DNA は検出されるが孢子は検出されないヒラメ組織を抗クドア抗体で免疫染色したところ、孢子に分化する前の *K. septempunctata* と思われる細胞が検出された。今後、孢子に分化する前の段階の *K.*

*sempunctata* の毒性についても検討する。

これまでに開発した *K. sempunctata* に対する LAMP 法の感度を食中毒検査に利用できるように感度の調節を行ったが、感度が高すぎたため今後さらに感度の調節を行い、食中毒検査で使用を目指す。

## F. 参考文献

1. 厚生労働省科学研究 「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」総合研究報告書
2. Diez B, Pedros-Alio C, Marsh TL, Massana R: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 67:2942-2951,2001
3. Sanchez O, Gasol JM, Massana R, Mas J, Pedros-Alio C: Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities.. *Appl Environ Microbiol* 73:5962-5967, 2007
4. 厚生労働省科学研究 「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 25 年度 総括・分担研究報告書
5. Adlard PA, Kirov SM, Sanderson K, Cox GE: *Pseudomonas aeruginosa* as a cause of infectious diarrhoea.. *Epidemiol Infect* 121:237-241, 1998
6. Ochieng JB, Boisen N, Lindsay B, Santiago A, Ouma C, Ombok M, Fields B, Stine OC,

Nataro JP: *Serratia marcescens* is injurious to intestinal epithelial cells.. *Gut Microbes* 5:729-736, 2014

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Yoichi Kamata, Morihiro Saito, Daisuke Irikura, Yuichiro Yahata, Takahiro Ohnishi, Tomoaki Bessho, Takashi Inui, Maiko Watanabe and Yoshiko Sugita-Konishi: A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning, *Journal of Food Protection*. 2014 May;77(5):814-9.
2. OHNISHI, T., AKUZAWA, S., FURUSAWA, H., YOSHINARI, T., KAMAT, Y., SUGITA-KONISHI, Y.: Inactivation of *Kudoa sempunctata* in Olive Flounder, *Biocontrol Science*. 19, 135-138 (2014)
3. Yoshiko Sugita-konishi, Hiroshi Sato, Takahiro Ohnishi: Novel Foodborne Disease Associated with Consumption of Raw Fish, Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Food safety*, 2(4), 141-150, 2014
4. Takahiro Ohnishi, Hiroko Furusawa, Rie Oyama, Saki Koike, Tomoya Yoshinari, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi: Molecular epidemiological analysis of *Kudoa sempunctata* by random amplified polymorphic DNA analysis, *JJID* (in press)
5. Yoshiko Sugita Konishi, Yutaka Fukuda,

- Koh ichiro Mori, Toru Mekata, Toyohiko Namba, Makoto Kuroda, Akiko Yamazaki, Takahiro Ohnishi: New Validated Rapid Screening Methods for Identifying *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*), JJID (in press)
6. Yahata Yuichiro, Sugita-Konishi Yoshiko, Ohnishi Takahiro, Toyokawa Takao Nakamura Naomi, Taniguchi Kiyosu, Okabe Nobuhiko: *Kudoa septempunctata* induced gastroenteritis in humans after flounder consumption in Japan: A case-control study, JJID (in press)
7. 大西貴弘: 新しい寄生虫食中毒とその制御にかかわる最新の話, 日本防菌防黴学会誌, 2014 vol.42 p625-630

#### 学会発表

1. Takahiro Ohnishi, Sayuri Akuzawa, Hiroko Furusawa, Tomoya Yoshinari, Yoichi Kamata and Yoshiko Sugita-Konishi : Application of Liquid Freezing Method to Inactivation of *Kudoa septempunctata* in Olive Flounder Meat, IAFP European Symposium (2014.5) (Hungary・Budapest)
2. 大西貴弘, 阿久澤さゆり, 古沢博子, 吉成知也, 鎌田洋一, 小西良子: リキッドフリーザーを用いたヒラメ筋肉中の *Kudoa septempunctata* 不活化の試み, 第35回日本食品微生物学会学術総会 (2014.9)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

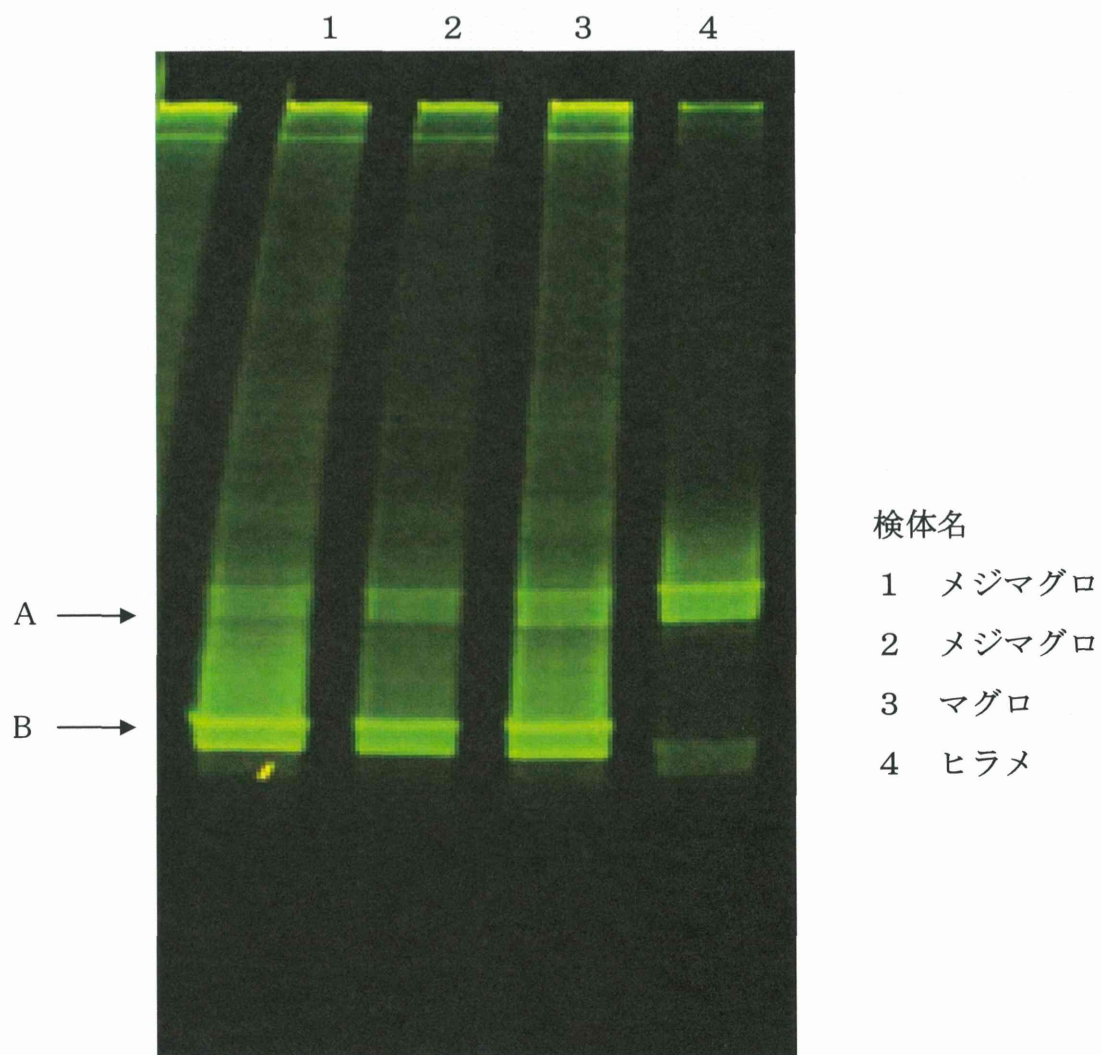
なし

表 1 リボゾーム DNA に対するユニバーサル PCR プライマー

	プライマー名	配列
真核生物	EU-U	CTGGTTGATCCTGCCAG
	EU-L	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGACCAGACTTG CCCTCC
	EU SetB-U	CGCGCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGAGGTCTGTG ATGCCC
	EU SetB-L	ACGGGCGGTGTGTRC
原核生物	PRO-U	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCCCGCCCCCTACGGGAG GCAGCAG
	PRO-L	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT

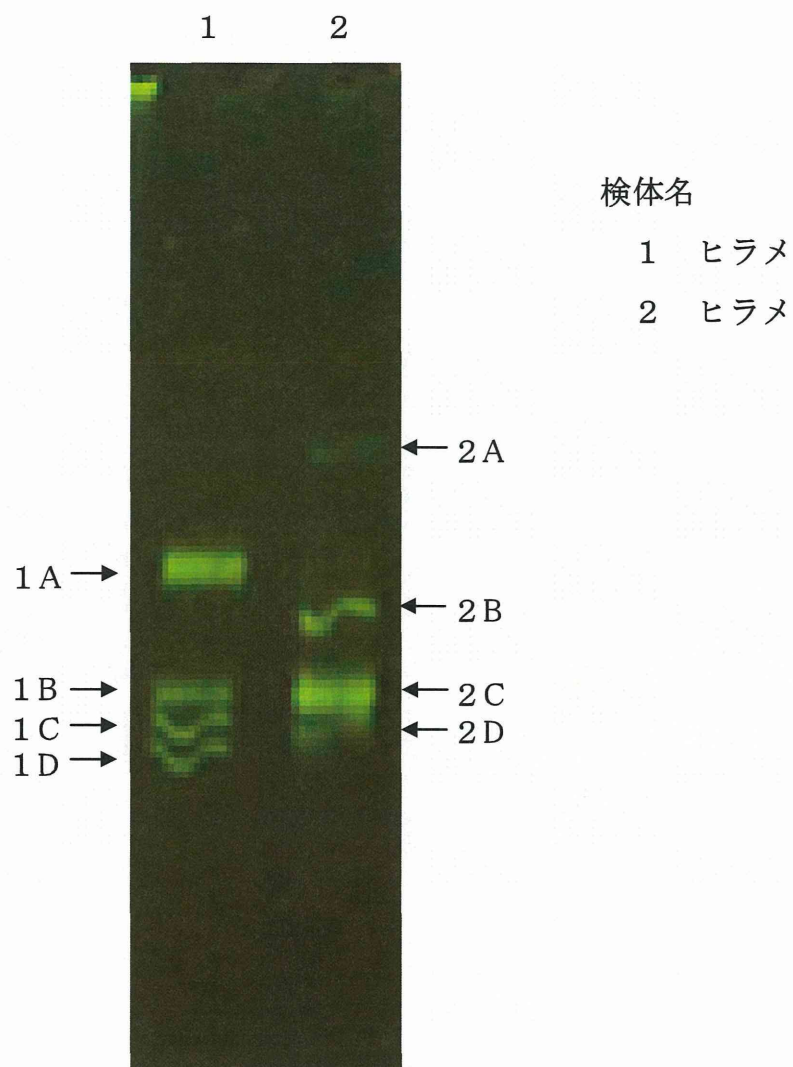
表2 PCR プログラム

EU	94°C	130 sec	
	94°C	30 sec	
	56°C	45 sec	
	72°C	2 min 10 sec	35 cycles
EU SetB	94 °C	1 min	
	94°C	1 min	
	65°C	1 min	with the temperature decreasing 1° C each cycle
	72°C	3 min	10 cycles
	94°C	1 min	
	55°C	1 min	
	72°C	3 min	20 cycles
Pro	94°C	5 min	
	94°C	1 min	
	65°C	1 min	with the temperature decreasing 1° C each cycle
	72°C	3 min	10 cycles
	94°C	1 min	
	55°C	1 min	
	72°C	3 min	20 cycles



バンド	生物種
1 A	<i>Kudoa neothunni</i> or <i>K. hexapunctata</i>
2 A	<i>K. neothunni</i> or <i>K. hexapunctata</i>
3 A	<i>K. neothunni</i> or <i>K. hexapunctata</i>
4 A	<i>K. septempunctata</i>
B	それぞれの魚

図1 既知の寄生虫が存在している検体中の真核生物検出例



バンド	生物種
1A	<i>Flavobacterium</i> sp.
1B	<i>Pseudomonas</i> sp.
1C	<i>Alcaligenes</i> sp. or <i>Achromobacter</i> sp.
1D	<i>Rhodococcus</i> sp.
2A	<i>Brochothrix</i> sp.
2B	<i>Pseudomonas</i> sp.
2C	<i>Pseudomonas</i> sp.
2D	<i>Pseudomonas</i> sp.

図2 既知の寄生虫が存在している検体中の原核生物検出例



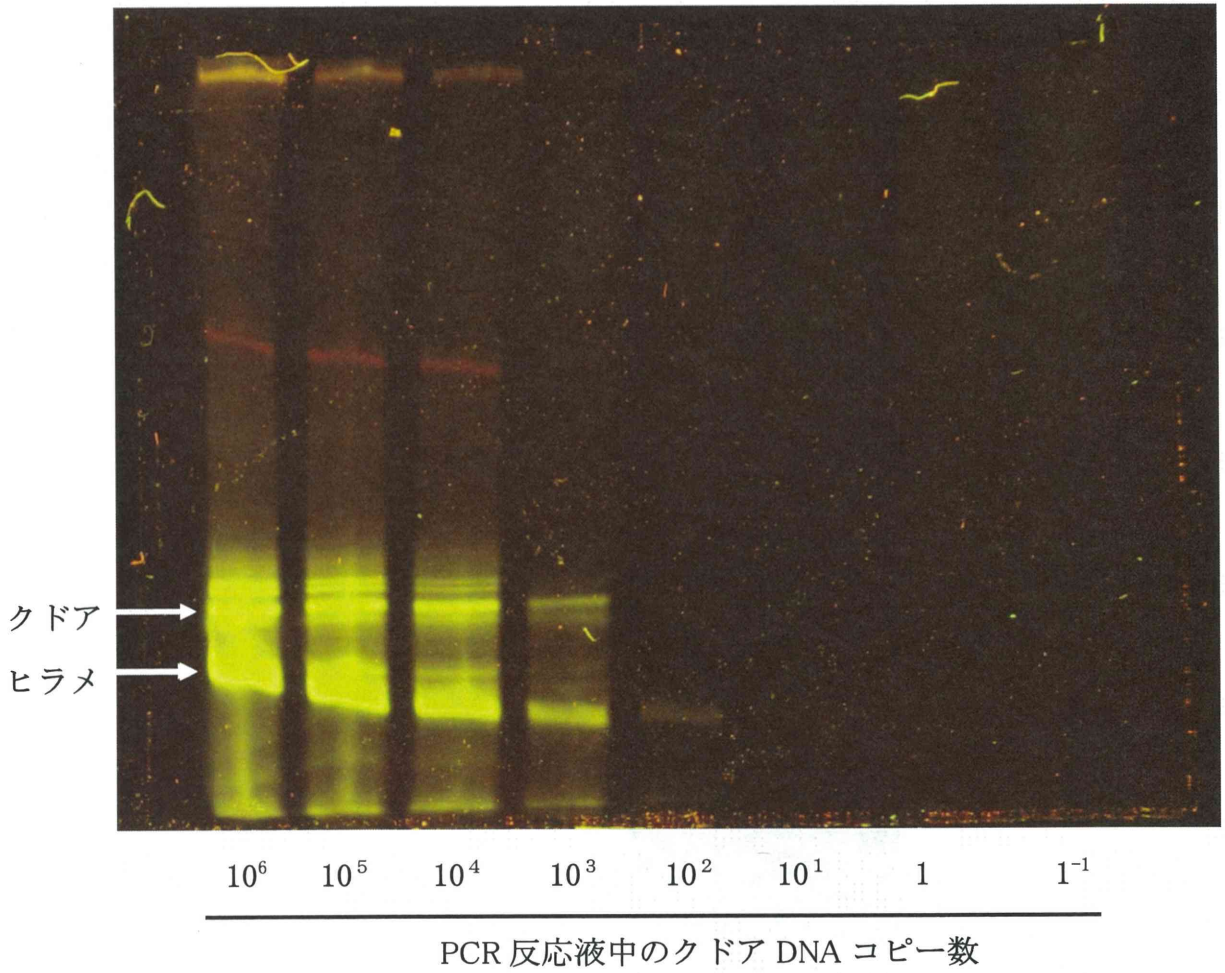
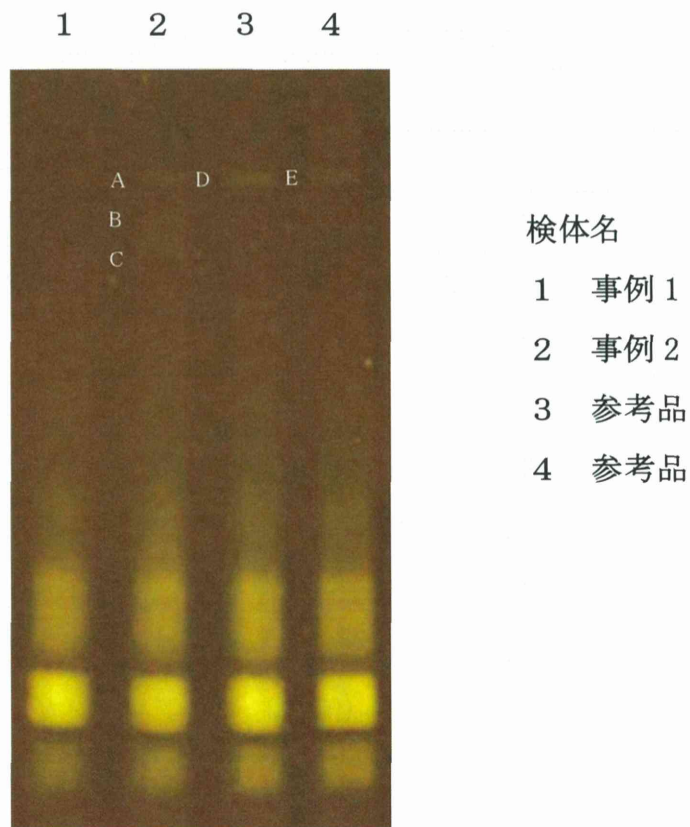


図3 今回確立した系の検出感度

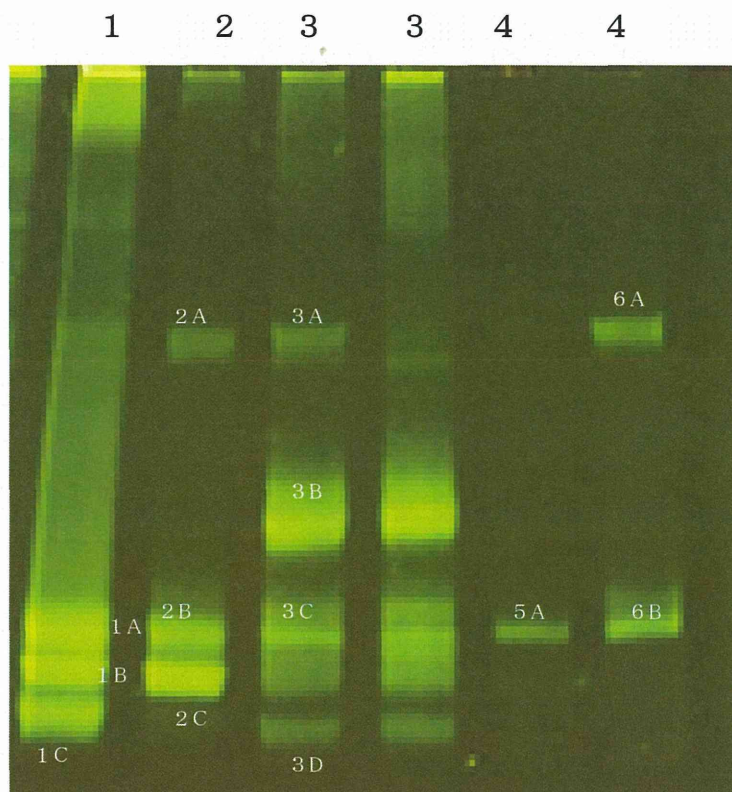
表3 今回使用した有症苦情事例残品の概要

	事例1	事例2
発生年月日	平成22年9月26日	平成12年9月23日
発生場所	沖縄県	沖縄県
原因食品	シイラ	シイラ
喫食者数	3	不明
有症者数	3	2
症状	腹痛、嘔吐、頭痛、吐き気、 発熱、下痢	悪寒、吐き気、嘔吐、水溶性 下痢
推定潜伏時間	7.5～14時間	11～12時間
検査結果	黄色ブドウ球菌（陰性） セレウス菌（陰性） その他食中毒菌（陰性） ウイルス検査（陰性）	黄色ブドウ球菌（陰性） シガトキシン（陰性） ヒスタミン 0.0045 mg/g



バンド	生物種
A	<i>Kudoa minithyrsites</i>
B	<i>Kudoa thyrsites</i>
C	<i>Kudoa</i> sp.
D	No hit
E	No hit

図4 シイラを原因食とする有症苦情事例残品からの真核生物 DNA の検出



検体名

- 1 事例 1
- 2 事例 2
- 3 参考品 1
- 4 参考品 2

バンド	生物種
1 A	<i>Pseudomonas</i> sp.
1 B	<i>Brochothrix</i> sp.
1 C	<i>Serratia</i> sp.
2 A	<i>Pseudomonas</i> sp. or <i>Brochothrix</i> sp.
2 B	<i>Pseudomonas</i> sp.
2 C	<i>Brochothrix</i> sp.
3 A	<i>Chryseobacterium</i> sp.
3 B	<i>Chryseobacterium</i> sp.
3 C	Uncultured bacterium
3 D	<i>Burkholderia</i> sp. or <i>Comamonas</i> sp.
4 A	Uncultured bacterium
6 A	<i>Listeria</i> sp.
6 B	<i>Clostridium</i> sp.

図5 シイラを原因食とする有症苦情事例残品からの原核生物 DNA の検出