

としたエルシニア エンテロコリチカ(血清型 O8)による食中毒事例が起きている。野菜等が原因とされる食中毒は、食材が直接の原因となる場合もあるが、調理・加工従事者からの二次汚染の可能性もある。厚生労働省の平成 26 年度食品の食中毒菌汚染実態調査では、生食用等野菜、肉類、浅漬を対象に EHEC、サルモネラ、大腸菌 (*E.coli*)、カンピロバクター(生食用の鶏肉等)の検索が全国の 24 自治体で実施されている。生食用等野菜から *E.coli*、食肉からサルモネラ、生食用鶏肉からはカンピロバクターが恒常的に検出されている。

こうした背景から、地域に流通する食材の細菌の汚染状況を調査し、取扱う業者への指導、関係機関へ情報提供することは、食中毒の未然防止に繋がるばかりでなく、食中毒事件の疫学調査においても有用な情報となる。

今年度は、昨年に続き、地域の複数の店舗から購入した野菜や肉等について、食中毒原因菌の汚染状況調査を実施する。

A-3. 感染症・食中毒業務担当者を対象とした疫学研修とその効果

近年の食中毒事例は、食材・食品の流通網の発達により、広域化、複雑化する傾向にある。また、原因物質としては、ノロウイルス、カンピロバクターによる発生が突出している。また、広域食中毒事例対策では、「広域食中毒疫学調査ガイドライン」が示され、疫学調査における調査手法としての活用が期待されている。食中毒発生時の疫学調査の実態は、各自治体の組織体系や担当者の経験によって差異が生じる。各自治体において、専門研修や疫学調査時の情報共有は行われているが、異動職場等では担当者の調査レベルの格差がより大きくなる。従って、担当者の食中毒に係わる疫学研修は、定期的に行うことがより効果的であると考えられる。

今年度は、講演の他、地域レベルにおける広域食中毒事例のケーススタディを中心に研修会を開催し、研修によって得られる効果などを検討す

る。

B. 研究方法

B-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知システムの構築

平成 27 年 4 月から県内の 1 基幹保健所と中核市の 2 保健所及びその管内の協力医療機関との連携で、本システムの構築に向けた検討を開始した。腹痛、嘔吐、下痢等の消化器症状を伴った患者が医療機関を受診し、診察した医師が血便等を伴う EHEC 感染を疑った際には、管轄する保健所の担当者に連絡するとともに患者等の同意を得て、医療機関で実施する検査と平行し、本研究用に検体を採取し検査依頼した。次に保健所から当研究所へ事案の概要と検体搬入について連絡した。EHEC の検査手順を図 2 に示した。保健所からの FAX 連絡票は、個人情報保護のため、事案概要と年齢、性別のみとした。搬入された検体(便)は、STEC、CT-SMAC 等の選択分離培地、BHI 増菌培地に塗布し、37℃ 16 時間培養した。TSI /LIM 寒天培地等で生化学的性状を確認し、大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型別(O 群)を実施した。ベロ毒素(VT)産生性は VTEC-RPLA(デンカ生研)、VT 遺伝子の保有は PCR(タカラバイオ)で確認した。検体搬入から、概ね 2 日で EHEC(VT 産生性、VT 遺伝子保有)であるかを判定し、保健所を通じ医療機関へ結果を報告した。また、EHEC が分離できず、HUS 発症の兆候がみられ、EHEC 感染が強く疑われる場合には、血清学的診断法を用いて、血清中の O 抗原凝集抗体の検出によって抗体価を確認した。広域事例が疑われた場合には、菌株の相同性を MLVA(Multilocus variable-number tandem-repeat analysis)法で解析することにした。これら検査情報は主管課に報告し、同時に県内各保健所の担当者へも情報提供した。

B-2. 流通食材における食中毒原因菌の汚染状況調査

平成 27 年 10 月から県内で肉・野菜類等の生鮮

食料品を販売する 11 店舗を選び、肉類（牛、豚、鶏）、野菜類、魚介類、鶏卵等の計 54 品目を購入し、検査材料とした。検査法は当研究所で食中毒検査に使用する GLP 標準作業書（SOP）に基づき実施した。検査対象とした食中毒原因物質は、病原大腸菌、EHEC、赤痢菌、サルモネラ、コレラ、腸炎ビブリオ、エロモナス、プレジオモナス、カンピロバクター、エルシニア、リステリア、ブドウ球菌、セレウス菌、ウエルシュ菌の 14 菌種で、検体によっては、対象（原因物質）を一部除外した。また、食中毒原因物質以外では、環境細菌（枯草菌）の分離も試みた。購入食材から食材原液（食材 10g に滅菌 PBS を 90ml 加えストマッキングした乳剤）を調製し、食中毒原因菌検出用の各選択分離培地と各増菌液体培地へ移植した。直接塗抹、増菌培養後に原因菌と疑われるコロニーは、生化学的性状試験、血清型別試験、遺伝子検査等を実施した。

B-3. 感染症・食中毒業務担当者を対象とした疫学研修とその効果

平成 27 年 7 月 3 日に開催した「群馬県感染症食中毒担当者疫学研修会」に参加した業務担当者（県内の保健所・中核市保健所）及び研修会に参加しなかった業務担当者を対象に研修効果をみるため質問票による調査を実施した（図 3、図 4）。質問票は、参加した担当者及び未参加の担当者あてに直接メールで送付し、返信メールにて回答を依頼した。質問事項は、回答者の基本情報を把握するために（設問 1）感染症・食中毒関連業務の延担当年数、（設問 2）現在の主な業務、（設問 3）「広域食中毒ガイドライン」（今回の研修で一部使用）の把握。また、今回の研修の実施方法については、（設問 4）場所、時間、内容について、（設問 5）今回の研修会の効果について（参加者）、（設問 5）研修会に参加しなかった理由について（未参加者）、（設問 6）研修会は毎年実施すべき。今後の研修会の実施方法については、（設問 7）研修会テーマの希望、（設問 8）追加希望するテーマ、（設問 9）開催方法の希望、（設問 10）追加希望する

開催テーマ、（設問 11）研修会の時間について、（設問 12）研修会に対する感想・要望、（設問 13）今後開催する感染症研修会への要望等を設定した。設問は研修テーマや形式を詳細に定め、今後の疫学研修に反映できるよう配慮した。

（倫理面への配慮）

本研究では個人が特定されること、また、不利益を被る情報は用いていない。

C. 研究結果

C-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知システムの構築

平成 27 年 4 月以降、県内の協力医療機関 8 施設から各保健所を通じ検体が 11 件搬入された。男女別では男 4 人、女 7 人で、年齢は 2 歳から 90 歳で年少者と高齢者が著名であった。11 例中の 1 例（27 年 7 月受付）は、67 歳の女性で、腹痛、水溶性下痢を伴って医療機関を受診した。診察した医師は EHEC 感染を疑い、管轄の保健所を介して検体が搬入された。搬入から 2 日後、カンピロバクターは分離されたが、EHEC は確認できなかった。検査結果は保健所を通じ医療機関へ報告された。他 1 例は、血便、水溶性下痢、意識混濁で医療機関へ入院となった 4 歳男児である。主治医は EHEC 感染を強く疑い、保護者の同意を得て検体を採取（血液を含む）、管轄の保健所を介して検体が搬入された。血便から EHEC の分離を試みたが困難であった。しかし、感染症法の届出基準である O 抗原凝集抗体の検出により、患者血清から O157 抗体が確認できた。家族の 2 歳男児（血便、水溶性下痢）からは、O157（VT2 産生）が分離された。同様に検査結果は保健所を通じ医療機関へ報告された。他 8 事例は、EHEC の分離には至らなかった。保健所、協力医療機関及び当研究所との連携による本システムの構築に問題はなかった。

C-2. 流通食材における食中毒原因菌の汚染状況

調査

購入食材における食中毒原因菌検索では、11店舗の計54検体のうち、4店舗の5検体(9.3%)から原因菌が検出された(表1)。店舗Aでは鶏ウイング(手羽元)1検体からカンピロバクター(ジェジュニ)が検出された。店舗Bでは唐揚げ用の鶏モモ1検体からカンピロバクター(ジェジュニ)とリステリア(モノサイトゲネス)が同時に検出された。また、店舗Cの鶏ももの小間1検体からサルモネラ04群(シユワルツェングランド)が検出された。野菜類では店舗Eのもやし1検体からセレウス菌が検出され、他2店舗(F、G)のもやし各1検体からは、枯草菌が検出された。店舗Eのもやしから検出されたセレウス菌は、嘔吐毒(セレウリド)及び下痢毒(エンテロトキシン)が陰性であった。

C-3. 感染症・食中毒業務担当者を対象とした疫学研修とその効果

疫学研修についての質問票によるアンケートは、参加者及び未参加者の設定で、参加者は34名中18名(53%)、非参加者は59名中34名(58%)から回答を得た。

設問1の担当者の延担当年数では、1年未満から最長20年以上(参加者、未参加者)で、参加者は平均4年、未参加者は平均で6年の業務経験があった。設問2の現在の主な業務では、感染症・食中毒担当者が71%を占めた(表2)。設問3の「広域食中毒ガイドライン」(今回の研修で一部使用)を把握していたかでは、研修に参加して知ったが61%(表3-1)、未参加者では知らなかったが65%(表3-2)であった。設問4の本研修会の実施方法(場所、時期、内容)では、殆どが適切との回答をした(表4)。また、改善案では開催場所を県庁、複数回の開催に希望があった。設問5の研修の効果(参加者)については、役に立ったが89%であった(表5)。未参加者の設問5の不参加だった理由では、業務の都合と設定日時が68%であった(表6)。設問6の研修会の実施については、毎年実施すべきは89%であった(表7)。設問7の今後の研修会テーマの希望については、

積極的疫学調査が22%であった。その他として、感染症・食中毒の流行状況など多岐であった(表8)。設問8の研修への追加希望テーマでは、疫学調査に関する統計学的方法論、初動調査手法などがあった。設問9の研修会の開催方法では、講義とグループワーク形式を希望する割合が65%と最多であった(表9)。設問10の研修会に追加希望する開催方法としては、インターネット・ビデオ講習、Web研修などの回答であった。設問11の研修時間については、半日が69%、1日が29%で、殆どの者が短時間研修を希望していた(表10)。

D. 考察

D-1. 腸管出血性大腸菌感染症の早期探知システムの構築

EHECは食中毒の原因菌として、散发例、集団例あるいはdiffuse outbreakなどに深く関与し、夏季に増加し、冬期に減少傾向がみられる。加熱用食肉等からの被害や食材の取扱い(加工・調理)からの二次汚染も少なくない。2011年4月下旬、関東地方と富山県の焼肉チェーン店で発生した広域食中毒事件では、患者数181名、うちHUS発症者32名、死者4名となった。EHECに汚染されたユッケが原因と特定され、厚生労働省は2011年10月、生食用食肉の規格基準を見直した(告示第321号)。O157等を原因とした食中毒では、HUSや脳症など重症化を伴う事案が多く、汚染された食材、食品の流通によって広域化する傾向がある。従って、EHEC感染を早期に察知して、広域発生の関連を関係機関で共有することは、患者の治療や二次汚染の防止になり、広域事例への迅速な対応に有用な手段となる。今年度のシステムの構築に向けた検討は、12月までに11例となり、うち2例はEHEC感染の早期探知に繋がった。広域事例への関与はなかったが、当初の研究目的であった早期探知に向けた地域の保健所と医療機関など関係機関による迅速な連携は達成できたと考えられる。

今後、行政が中心となり地域の保健所と医療機

関との情報共有や発生事案に対しての連携を深めていくことは、食中毒や感染症の早期探知、早期対策に極めて有効な取り組みであると思われる。

D-2. 流通食材における食中毒原因菌の汚染状況調査

食中毒は原因物質に汚染された肉類や環境細菌が付着した野菜類などの不適切な加工・調理、又は調理従事者等からの二次汚染によって引き起こされている。食中毒原因物質として、ノロウイルスを除くとカンピロバクター、サルモネラ、黄色ブドウ球菌などが高率に分離されるが、ウェルシュ菌、セレウス菌など環境細菌も原因菌として検出されている。厚生労働省が各自治体を介して実施している食中毒菌汚染実態調査では、野菜類、肉類は *E.coli* (大腸菌)、サルモネラ、O157、O26、O111、さらに肉類はカンピロバクターの項目を追加している。この調査では生食・加熱不十分な鶏肉からカンピロバクターが検出されている。

今回は地域の市販食材における食中毒原因菌(14菌種)による汚染状況を調査した。鶏肉類からはカンピロバクター、リステリア、サルモネラ04群、野菜類のもやしからはセレウス菌が検出されている。これら鶏肉、野菜類は加熱用なので、適切な調理であれば問題ないが、調理器具等による二次汚染の可能性は否定できない。現在、牛と豚の生肉は規格基準により、飲食店などで提供が困難になっているが、鶏生肉についての提供は規制がないので、用途に応じた注意が必要と思われる。

今後も市販食材について、汚染状況を調査し情報を周知していくことは、広域食中毒対策に有効な手段と考えられた。

D-3. 感染症・食中毒業務担当者を対象とした疫学研修とその効果

広域食中毒対策として、保健所の業務担当者の疫学調査の向上を図るため、研修会を開催して、

担当者の調査意識や現状を把握するため研修効果を調査した。研修会への参加者及び未参加者へほぼ同様な設問のアンケートを実施し、広く意見を求めた。「広域食中毒ガイドライン」の存在については、あまり知られておらず、疫学調査の標準となるものなので、今後の研修会への積極的な採用が必要であると思われる。研修会の開催場所、時期、内容については、「適切」との回答が多く、また、研修会の効果も「役に立った」の回答が約9割を占め、担当者は定期的な開催を必要としていることが確認できた。今後の研修会のテーマでは、「積極的疫学調査」が最も多く、担当者は各事例の多様化に対する調査に不安があり、より実践に即した研修を望んでいると推察された。近年は組織のスリム化から担当者が減員になっているので、研修会を通じての調査手法の習得に期待していることが伺える。また、開催時間の設問では、「半日」が69%と最も多く、担当業務への配慮が現れている。そして、今後の研修会の開催方法では、「講義とグループワーク方式」の回答が65%であったが、疫学調査の基本となる情報や担当者間のコミュニケーションが図れることで、自らの疫学調査の評価や情報から得られる標準的な業務のビジョンが築かれるものと思われる。

今回の研修では、疫学調査における業務担当者の現状や意識、さらには疫学研修の効果も把握できた。今後、アンケート調査の結果から、広域食中毒対策方法の導入に向け、担当者のニーズに合った研修会を開催することが、疫学調査の向上に寄与するものと考えられた。

E. 結論

EHECを原因とした食中毒事例は、食材流通のグローバル化や輸送網の発達などにより広域化する傾向にある。食環境の社会的背景から食品の規格基準等も適宜更新されているが、加工時の二次汚染が重なった複雑な事例が発生している。特にEHECが関与する事例は、死亡例や重症例が多く見受けられるので、広域的発生を早期に探知し

て対策を講じることは、感染の拡大防止に極めて有効である。

市販食材の食中毒原因菌による汚染状況調査は、調査情報が広く共有されることで、疫学調査時の原因究明に向けた有用な手がかりとなるばかりでなく、販売者や消費者の食材に対するリスクの啓発にも効果があり、食中毒防止や二次汚染対策に大変有効な方法である。今後も継続的に実施し広報していくことで、市販食材の適切な取扱いや安全な利用にも寄与できると思われる。

広域食中毒事例は、初期探知における適切な判断に基づいた調査が必要であるが、散発事例に端をなす情報でも疫学的背景が異なることが多いので、担当者の知識や経験に委ねられるところが多い。疫学調査を向上させるには、事例の原因究明に関与する情報が多様化していることから、平常時からの疫学研修が不可欠である。今回の研修会のアンケート結果に示されるように、毎年の研修会の開催、疫学情報等の講義及びグループワーク方式といった実践に即した形での開催が、広域食中毒対策方法の導入と改善策に向けた効率的かつ有用な取り組みとなる。

F. 謝辞

本研究のEHEC感染症の早期探知システムの構築に向け、医療機関ならびに患者との調整及び検体収集にご協力いただいた前橋市及び高崎市保健所、渋川保健福祉事務所の担当者、また、感染症・食中毒業務担当者研修会のアンケート調査に御協力いただいた前橋市及び高崎市保健所、群馬県各保健福祉事務所の関係者、群馬県保健予防課、衛生食品課担当者の皆様に深謝いたします。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ウイルスを主とした広域事例調査手法の検討

研究分担者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	武差 愛美	青森県環境保健センター
	坂 恭平	青森県環境保健センター
	佐藤 直人	岩手県環境保健研究センター
	関根 雅夫	仙台市衛生研究所
	北川 和寛	福島県衛生研究所
	富田 望	福島県衛生研究所
	金成 篤子	福島県衛生研究所
	丹羽 祥一	群馬県衛生環境研究所
	堀田 千恵美	千葉県衛生研究所
	秋田 真美子	千葉県衛生研究所
	西川 和佳子	千葉市環境保健研究所
	坂本 美砂子	千葉市環境保健研究所
	森 功次	東京都健康安全研究センター
	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
	秋場 哲哉	東京都健康安全研究センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	広川 智香	新潟県保健環境科学研究所
	山本 一成	新潟市衛生環境研究所
	南波 裕太	新潟市衛生環境研究所
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
	小和田 和誠	福井県衛生環境研究センター
	大沼 正行	山梨県衛生環境研究所
	中沢 春幸	長野県環境保全研究所
	粕尾 しず子	長野県環境保全研究所
	水澤 哲也	長野県環境保全研究所
	楠原 一	三重県保健環境研究所

米谷 僚子	滋賀県衛生科学センター
入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
山元 誠司	大阪市立環境科学研究所
三好 龍也	堺市衛生研究所
飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
辰巳 智香	島根県保健環境科学研究所
藤井 慶樹	広島市衛生研究所
吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
芦塚 由紀	福岡県保健環境研究所
宮代 守	福岡市保健環境研究所
古川 英臣	福岡市保健環境研究所
松藤 貴久	福岡市保健環境研究所
加藤 聖紀	大分県衛生環境研究センター
喜屋 武向子	沖縄県衛生環境研究所
上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
三元 昌美	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ウイルスによる食中毒が疑われる場合、調査において、食中毒か否かの判断や調理従事者からの二次汚染の有無の判断などを行うためには、患者、食品あるいは調理従事者から検出されたウイルスの遺伝子型や検出株間の相同性を調べるのが重要である。しかしながら、その判断を行う際にそれらの解析を実施している自治体は多くないのが現状である。そこで、本研究では迅速な遺伝子型別や系統樹解析を行うために、遺伝子のアライメントや近隣結合法による系統樹解析のプログラムとして広く利用されている ClustalW を基本プログラムとした自動遺伝子型別システムを開発した。開発したシステムは、昨年度構築したローカル Blast 検索システムと同様にエクセルファイルをデータソースとして用いる。本システムは、①各種ウイルスの遺伝子型別検査のみならず、シーケンス検査による菌種鑑別や魚種鑑別等の検査や広域事例調査における検出株間の同一性確認等にも適応できる、②エクセルファイルで管理するので、推定原因食品、発生時期等の疫学情報等と合わせて解析・管理することができる、③系統樹も簡便に作成できる、などの特徴を持つ。現在、使用を希望する研究協力地方衛生研究所にシステムを配布し、その有用性を検証している。本システムは食中毒調査等における迅速な遺伝子型別や系統樹解析の実施に寄与するものと思われる。

A. 研究目的

ノロウイルス、A型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス等の食品媒介性ウイルスによる感染症は毎年発生し、国民に多くの健康被害をもたらしている。多くの食品媒介ウイルスは食品を介さない

ヒト-ヒト感染も起こすことから、ウイルスによる食中毒が疑われる集団事例が発生した場合、行政対応上、食中毒か感染症かの判断が求められる。また、調理従事者等からウイルスが検出された場合、汚染源としての調理従事者等の関与の有無に

についても判断する必要がある。これらの行政対応上の判断を行うためには、聞き取りによる疫学調査が重要であることは言うまでもないが、患者、食品あるいは調理従事者等から検出されたウイルスの遺伝子型や検出株間の相同性等に関する科学的根拠も重要な役割を担うと考えられる。しかしながら、実際の食中毒調査において、上記のような行政判断が求められる時点において、シーケンス検査およびその結果に基づくそれらの解析を実施している自治体は多くないのが現状である。この要因としては、人員数、業務量等いくつか理由が考えられるが、得られたシーケンスデータのアライメント、系統樹解析などを専用ソフトを用いて手作業で行う解析作業の煩雑さは重要な要因であると思われる。

昨年度の本研究において、ウイルスによる散在型集団食中毒事例の早期探知等の広域事例調査の精度向上に寄与することを目的として、ローカルデータベースを対象に迅速簡便に実施できるBLAST検索システムを開発した。今年度は、食中毒調査等の行政対応時に迅速な遺伝子型別や系統樹解析を行うために、遺伝子のアライメントや近隣結合法による系統樹解析のプログラムとして広く利用されているClustalWを基本プログラムとした自動遺伝子型別システムの開発を目的とした。

B. 研究方法 C.研究結果

1 システム開発のコンセプト

昨年開発したシステムである、①エクセルファイルとFASTAファイルの変換プログラム、②ローカルBLAST検索用プログラムとの互換性や操作性を維持し、さらにそれらを発展させ、統合的に使用できるものとする。また、昨年作成したBlast検索プログラムと今回作成した遺伝子型別システムを1度の操作で実行可能とする。さらに、ログを残し、得られたphbファイルを用いて系統樹を描画できるものとする。

2 開発したシステムによる遺伝子型別操作手順

① テンプレートとなるエクセルファイルの準備

FASTAファイルから、昨年度開発したプログラム(FastaConvert.exe)によりプログラムと同じディレクトリに保存されているnihs.xlsと同じフォーマットをもつエクセルファイルが作成される(図1)。ID番号(#SeqID)はプログラム実行時に自動的に振られる番号である。基本情報のうち、「株名」および「シーケンス」はFASTAファイルからの変換時に自動的に入力される。「ウイルス名」、「領域」、「遺伝子型」、「アクセションNo」には、必要に応じて手動でデータを入力する。ただし、エクセルファイルを本システムのローカルBlast検索やClustalWでの自動遺伝子型別の「参照株(Reference)」として使用する場合には、「株名」および「遺伝子型」のデータが、Blast検索ではそれぞれ「類似株名(Blst)」、「遺伝子型(B)」に、ClustalWでは「類似株名(CW)」、「遺伝子型(C)」に、それぞれ該当する株のデータが代入されるため、データの入力は必須である。Blast結果のその他の項目(Score, Expect, Identities, Strand, 件数)には、検索結果が自動入力される。ClustalW結果の「類似株との距離」には、参照株ファイルに登録された遺伝子型別参照株のうち、遺伝的距離が最も近いもの(=決定された遺伝子型の参照株)との遺伝的距離が自動入力される。以上の「#SeqID」から「類似株との距離」までの列名のうちプログラムの実行に必須なものについては名称変更ができない。それらの列名がない場合にはプログラムの実行において処理が無視される。

その他の列には、任意の列名を設定できる(入力されている情報は各処理の結果作成されるエクセルファイルにも反映される)ので、必要に応じて列名を追加する。

② 参照株ファイルの準備

遺伝子型別を行うための参照株のエクセルファイルを作成する。遺伝子型別に使用する株を収集、整理しFASTA形式で保存する。そのファイルを

「FastaConvert.exe」プログラムによりエクセルファイルに変換する(図2)。作成されたエクセルファイルに、「ウイルス名」(任意)、「領域」(任意)、「遺伝子型」(必須)、「アクセションセッションNo」(任意)を入力する。

② 問い合わせ株の準備

遺伝子型別を行いたい株のスークエンスデータをFASTA形式で保存する。そのファイルを「FastaConvert.exe」プログラムによりエクセルファイルに変換する(図2)。

③ ClustalWの条件設定

ClustalWを実行する際のパラメータの設定を行う(図3)。「cutoff_Distance」は問い合わせ株が遺伝子型別されるための、参照株との遺伝的距離の限界値を指定するものである。すなわち、参照株の中に、ここで指定された数値より小さい(近縁な)株がない場合は、遺伝子型別されず、「該当なし」となる。

解析過程で得られたphbファイルを利用して、系統樹を作成したい場合には「debug=true」と設定する。「debug=true」の設定はTemp(一時)ファイルを残す設定なので、解析過程で得られるClustalWでアライメントされたファイル(.aln)なども残っており、必要に応じてアライメントされた配列データを確認することもできる。

条件設定画面で設定された条件は、変更しない限り維持されるので、同様な条件で行う場合は再度設定を行う必要はない。

④ ClustalWの実行

V-nus net_tool.exe(平成26年度の報告書では、Blast_tool.exeと記載)をクリックする(図4)。遺伝子型別参照株(参照株)のファイルを「Reference」に、型別したい株(問い合わせ株)のファイルを「Query」にそれぞれドラッグ&ドロップする。ClustalWのオプションボタンをクリックし、「実行」をクリックすると、両エクセルファイルからFASTAデータの作成→両データの結合→ClustalWへの読み込み→アライメント→隣接接合法による遺伝的距離計算→ブートストラップ検定→phbファイルの作成→得られたデータの参照ファイルへ

の読み込み→遺伝子型等が入力された新しいエクセルファイルの作成が自動実行される。

⑤ データの追加登録・結合

解析済の株のデータを管理しているエクセルファイル(同じフォーマットでなければならない)に新たに遺伝子型別された株を追加登録したい場合は、同Windowにおいて、オプションボタンを「Merge」に変更し、「Reference」のボックスに既存の解析済のエクセルファイルを、「Query」のボックスに新たに解析した株のエクセルファイルを指定し、「実行」することで、データが追加された新しいエクセルファイルが作成される(本Merge機能は平成26年度作成)。

⑥ 疫学情報等の入力

必要に応じて、備考欄に事例番号、検体の由来等の疫学情報を入力する。

⑦ 系統樹の作成

系統樹を作成したい場合は、Blast_tempフォルダ内にphbファイルが作成されている(パラメータ設定で、「debug=true」と設定している場合のみ)(図3)ので、MEGA等の系統樹描画ソフトで開き、系統樹を作成する。

D. 考察

今年度は、遺伝子型別や系統樹解析を迅速、簡便に行うために、系統樹解析で一般的に用いられているClustalWを基本プログラムとした自動遺伝子型別システムを開発した。本システムの特徴として以下の点があげられる。

① システムの汎用性

ノロウイルスの遺伝子型別に限れば、現在、RIVMが提供するNoronetの「Norovirus Genotyping Tool」(<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)を使用することにより、FASTAファイルを用いて簡便に遺伝子型別を実施することが可能である。しかし、同システムはノロウイルスの遺伝子型別、キメラ型(遺伝子組み換え型)の同定に特化したシステムであり、他のウイルスには利用できない。

また、同システムでは複数の株を解析する場合、1株ごとに系統樹解析が行われるため、各事例から検出された株間の相同性については調べることができない。一方、今回開発したシステムは遺伝子型別を塩基配列の比較で実施するものであれば、型別用の参照株ファイルを準備しておくことで基本的にあらゆるウイルス、細菌、その他の生物について利用できる。また、遺伝子型別検査のみならず、シーケンス検査による菌種鑑別、魚種鑑別等の検査に用いることも可能である。

さらに、系統樹解析は一般的に行われているように、解析対象株を一括して実施されるので、株間の相同性についても簡便に調べることが可能となっている。特に、後述の遺伝的距離の値を利用することにより、検出株間の同一性の確認も簡便に実施することができる。たとえば、散在型集団食中毒事例が疑われる事例が発生し、株間の相同性を調べたい場合、遺伝子型別用参照株のリストに他の事例からの検出株を含めて解析し、その株との遺伝的距離が0(両者の塩基配列が一致する)となれば、感染源が同じ事例である可能性を示唆することになる。

以上のように、本システムは、目的に応じて様々な利用方法が考えられ、汎用性のあるシステムとなっている。

② 遺伝的距離の数値化

近隣結合法によって得られる株間の遺伝的距離は、phbファイルをテキストファイルとして開き、テキストデータを基に手作業で算出することができる。しかしながら、解析株数が増えると構文が複雑になり、解読は極めて困難で、その実施は現実的ではない。一方、本システムでは問い合わせ株と最も近縁な参照株との距離を自動計算し、遺伝子型別を実行している。また、その値をエクセルファイルに還元するので、参照株との遺伝的距離を迅速に把握することができる。この値を比較することにより系統樹を作成しなくても変異の程度のみならず、検出株間の相同性比較もある程度把握することが可能である。すなわち、参照株との遺伝的距離が異なる場合には、解析部位において

参照株と一致しない(異なる)塩基の数が、問い合わせ株ごとに異なることを意味するので、それらの株の塩基配列は一致しないことになる。一方、参照株との遺伝的距離が一致する場合には、一致しない塩基の数は同じであるが、変異部位が異なる場合もあり得るので、必ずしも配列の一致を意味するものではない。

③ 検査台帳としての使用

本システムはエクセルファイルをデータソースとして用いるので、推定原因食品、発生時期等の疫学情報等と塩基配列情報を合わせて解析・管理できる。そのため、食中毒等の調査におけるデータ管理や情報交換の手段として有用なツールとなると思われる。

④ 迅速・簡便な系統樹解析

系統樹描画ソフトを用いて系統樹を作成する場合も、操作手順の多くが自動化されているので、解析に伴う負担が大幅に軽減できる(図5)。

昨年度は、株間の相同性を簡便に調べるために、ローカルデータベースを対象とするBLAST検索システムを開発した。今年度開発した遺伝子型別や系統樹解析の自動化システムは、同一のシステム上で作動し、操作は極めて簡単である。本システムを使用することにより遺伝子検査に係る労力や時間の軽減を図ることができ、食中毒調査の精度向上に寄与できると思われる。現在、協力地方衛生研究所とのノロウイルス等のシーケンスデータの共有の中で本システムを使用しているが、迅速に解析結果を還元することができている。また、本システムの使用を希望する地方衛生研究所にも配布し、有用性の評価などを実施している。

E. 結論

迅速な遺伝子型別や系統樹解析を行うために、系統樹解析のプログラムとして広く利用されているClustalWを基本プログラムとした自動遺伝子型別システムを開発した。

F. 謝辞

ご協力いただきました自治体の本庁、保健所及び衛生研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 楠原 一, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道, 小林真美, 山口江里, 岩出義人, 田沼正路, 野田 衛: ノロウイルス GII.17 型の流行とその特徴について—三重県, 病原微生物検出情報, 36,91-92 (2015)
- 2) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 上林大起, 久保英幸, 野田 衛: 2014?2015 シーズンに流行したノロウイルス GII.17 について, 食品衛生研究, 65(10),7-15 (2015)
- 3) 三好龍也, 内野清子, 岡山文香, 芝田有理, 吉田永祥, 小林和夫, 左近直美, 土生川洋, 田中智之, 野田 衛: 臨床検体および下水検体を用いた堺市内の A 型肝炎の流行解析, 病原微生物検出情報, 36, 6-7 (2015)

- 4) 入谷展弘, 山元誠司, 改田厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 平井有紀, 上林大起, 野田 衛, 西尾孝之: 2014-2015 シーズンに大阪府で認められたノロウイルス流行, 大阪府立環境科学研究所報告 調査・研究年報, 77, 13-16 (2015)

2. 学会発表

- 1) 入谷展弘, 山元誠司, 改田 厚, 阿部仁一郎, 久保英幸, 上林大起, 野田 衛: 大阪府におけるノロウイルス GII.17 の流行状況, 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡市, 11/22 (2015)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

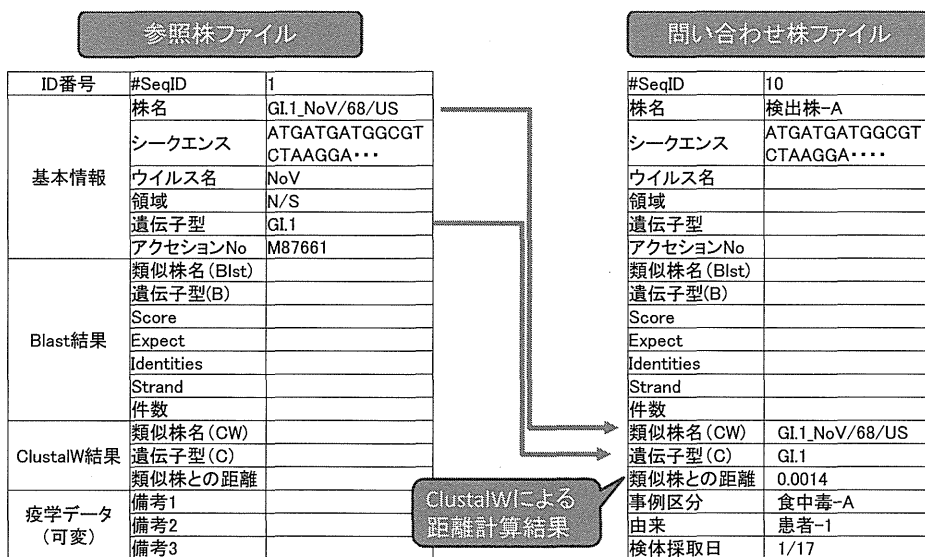
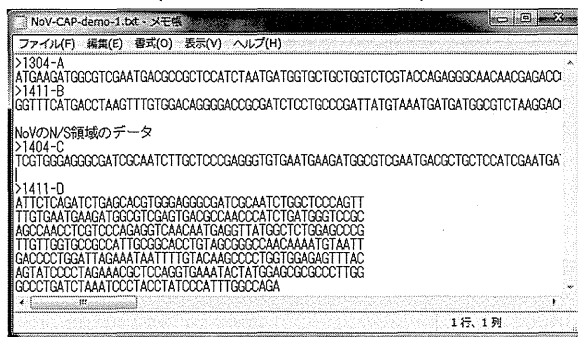


図1 本システムで使用するエクセルファイルのフォーマット

本システムによりClustalWを自動実行することにより、参照株ファイルの基本情報の「株名」および「遺伝子型」がそれぞれ、問い合わせファイル(遺伝子型別したい株のファイル)の「類似株名(CW)」、「遺伝子型(C)」に入力される。また、ClustalWで計算された類似株との遺伝的距離が「類似株との距離」に入力される。(図は実際のエクセルファイルの行と列を入れ替えて記載してある)

FASTAファイル(*.txt, *.fas, *.fast, *.fasta)



FASTAファイルをドラッグ&ドロップすると、同名のエクセルファイルが作成される。



図1 NoV-CAP-demo-1.xls [互換モード]

	A	B	C	D	E	F
1	#					
2	#SeqID	株名	シーケンス	ウイルス名	領域	遺伝子型
3	1	1304-A	ATGAAGATGGCGT	CGAATGACGCGCGT	CCATCTAATGATGGT	GCTCG
4	2	1411-B	GGTTTCATGACCT	AAAGTTTGTGGAC	AGGGGACGCGGAT	CTCCTGCC
5	3	1404-C	TGCTGGGAGGGCG	GATCGAATCTTGC	TCCGAGGGTGTGA	TGAAG
6	4	1411-D	ATTCTCAGATCT	GAGCACGTGGG	AGGGCGATCGCA	ATCTGGCTCC
7						
8						

図2 FASTAファイルからエクセルファイルを作成する操作

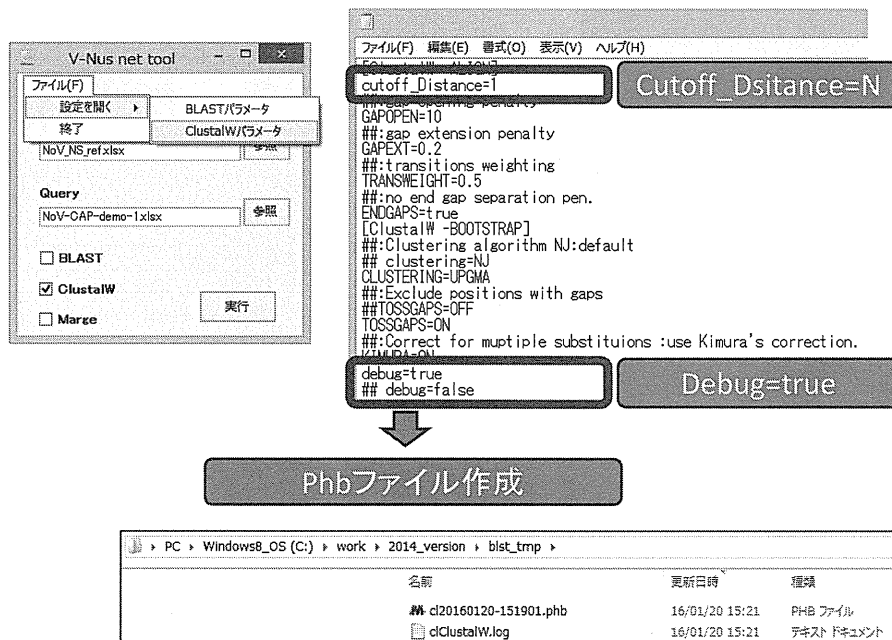


図3 ClustalWの条件設定

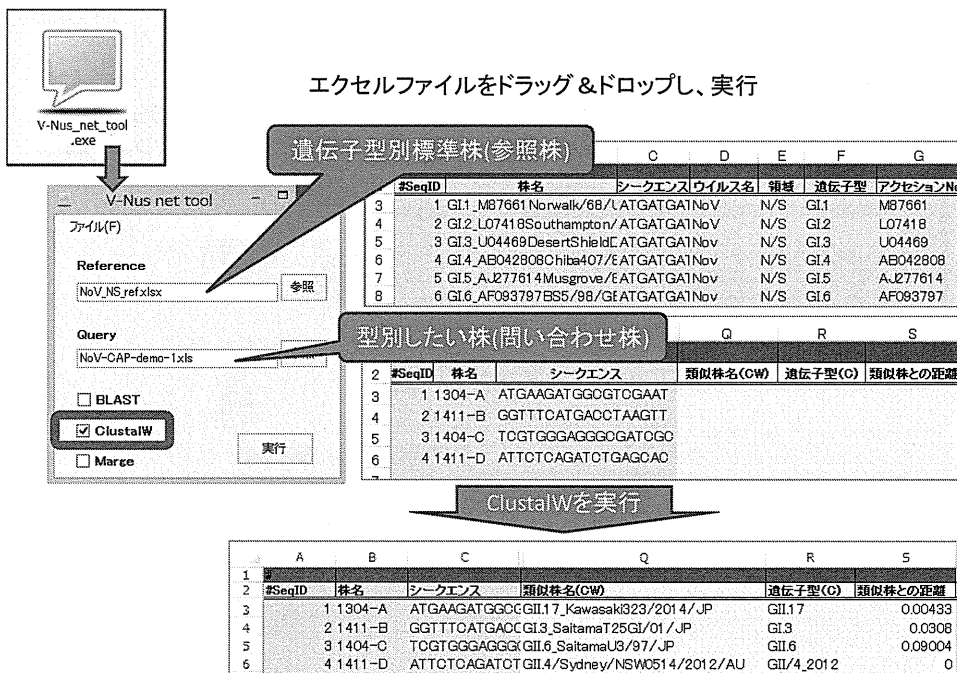


図4 ClustalWの実行

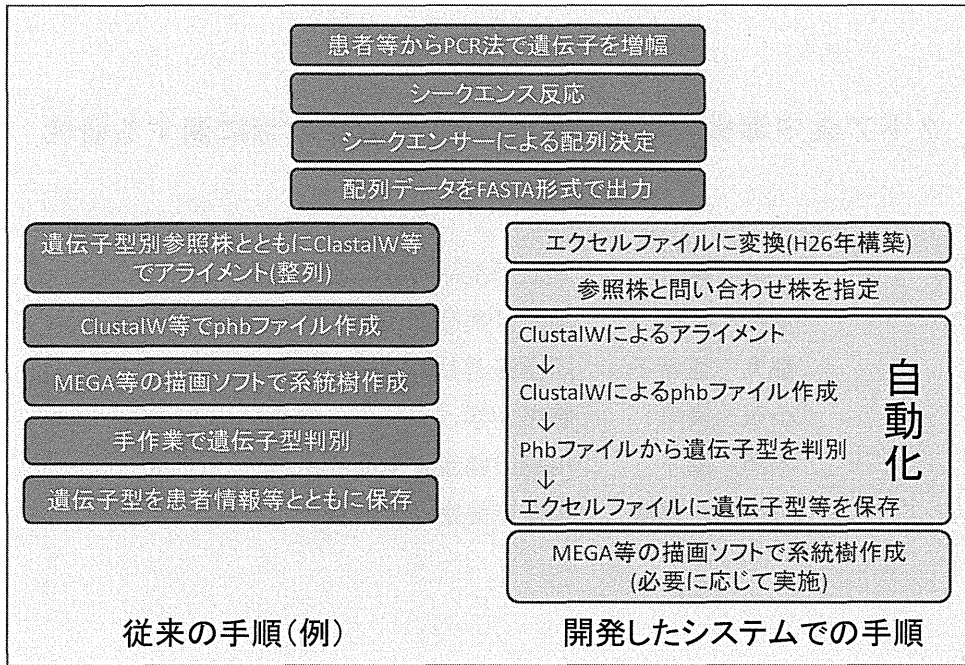


図5 一般的な遺伝子型別方法との比較

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	渡辺 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所
	都丸 亜希子	国立医薬品食品衛生研究所
	小西 良子	麻布大学
	本間 幸子	川崎市健康安全研究所
	小河内 麻衣	川崎市健康安全研究所

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) 自治体から受け入れた有症苦情事例中の粘液胞子虫の検索を行った。33 事例 52 検体の検査を行った。その結果、33 事例中カンパチが関与している可能性のある事例が 14 事例あった。そのうち 9 事例から *Unicapsula seriola* が検出され、事例との関連性が疑われた。
- 2) *U. seriola* の検出を容易にするために、*U. seriola* 特異的 PCR 法と顕微鏡検査法を確立した。
- 3) カンパチ、マグロに次いでタイ類が関与する有症事例が多く、しばしば粘液胞子虫が検出される。そのため、市場流通タイ類における粘液胞子虫の寄生状況を調査した。その結果、タイ類 45 検体中 1 検体から粘液胞子虫が検出された。このことから市場流通品における粘液胞子虫の寄生は少なく、事例残品に寄生が集中している可能性が考えられた。
- 4) *Kudoa septempunctata* の発症機構のひとつとしてアレルギーが関与している可能性が以前より疑われていた。そこで、*K. septempunctata* 免疫によるマウスにおける IgE 抗体産生誘導の確認を行った。その結果、代表的な食物アレルギーである卵白アルブミンと同等またはそれ以上の IgE 抗体産生誘導能が *K. septempunctata* にあることが確認された。

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。しかしながら、ヒラメ以外の食品による原因物質不明の有症苦情事例も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。そこで地方自治体に広く情報および検体の提供を呼びかけ、これらの解析をこなした。今年度は有症事例検体に含まれる粘液胞子虫に焦点をあてた。

原因物質不明の有症苦情事例でカンパチを喫食したものが多く報告されている。さらにこれらの事例の残品から粘液胞子虫の *Unicapsula seriolae* がしばしば分離される。現時点ではこの *U. seriolae* が原因物質の候補として挙げられている。しかし、*U. seriolae* の胞子は強い粘着性を持ったため、胞子同士が接着し大きな塊を作り胞子の正確な計数が困難である。また、カンパチの身は脂分に富むため、鏡検時にその油が油滴を形成する。*U. seriolae* は油滴に非常に似ているため、判定が難しく、*U. seriolae* の存在をしばしば見落とすことにつながっている。そこで、*U. seriolae* の研究をさらに進めるためには *U. seriolae* の簡易かつ正確な検出法が必要である。

カンパチと並んで有症苦情事例に関係する魚種としてタイ類があげられ、しばしば粘液胞子虫が検出されている。しかし、これらの粘液胞子虫が有症苦情事例の残品から特異的に検出されるのか、それとも市販されているタイ類に広く存在するのか明らかになっていない。市販品に見られず、残品から特異的に検出されるようであれば、これらの粘液胞子虫が原因微生物である可能性が出てくる。そこで、市場に流通しているタイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査を行った。

Kudoa septempunctata の下痢原性は孢子原形質による腸管上皮細胞層の傷害が発症機序のひとつとして考えられている。しかし、その症状からこれ以外の機序が下痢発症に関与している可能性が指摘されてきた。これまでに我々はクドア刺激によってマクロファージから種々のサイトカインが産生されることを確認している¹。また、クドアによる食中毒症状は一過性の水様性下痢を主症状とする急性腸炎であり、アレルギー性腸炎と類似すること、また、寄生虫の一種であるアニサキスアレルギー患者の存在は幅広く知られており、寄生虫には全般的に強力な IgE 誘導能があるとの報告が数十年間にわたり多数ある²⁻⁴。これらのことから、クドアによる食中毒の発症は IgE 抗体が関与する I 型アレルギーによるものである可能性がある。アレルギー性臨床症状発症の確認には、多数のサイトカインや免疫細胞の相互作用が必要であり、*in vitro* で証明するのはほぼ不可能である為、実験動物を用いた感作実験が適当かつ不可欠である。しかし、これまで動物実験によるアレルギー性の検討はなされていない。そこで本研究では、マウスに *K. septempunctata* 破砕物を免疫して、血清中における IgE 抗体誘導の確認を行った。

B. 研究方法

1. 生鮮魚介類を原因食品とする有症苦情事例残品の解析
厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課

食中毒被害情報管理室より事務連絡『食中毒調査に係る病因物質不明事例の情報提供について』を発出していただき、地方自治体から有症苦情事例の残品および情報の収集を行った。得られた検体は顕微鏡検査を行い、粘液胞子虫の胞子の確認を行った。また、検体から DNA を抽出し、遺伝子検査を行った。検体からの DNA 抽出は QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて行った。得られた DNA をテンプレートとしてクドア属粘液胞子虫の 28S rDNA をターゲットとした PCR を行った⁵。得られた約 800 bp のバンドを切り出し、シークエンス解析を行った。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. タイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査

市場流通タイ類を無作為に購入した。顕微鏡検査によって粘液胞子虫の胞子の確認を行うとともに、遺伝子検査を行った。検体からの DNA 抽出は QIAamp DNA Mini kit を用いて行った。PCR は粘液胞子虫の 18S rDNA をターゲットとした既報に従って⁶行った。得られたバンドを切り出し、シークエンス解析を行った。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。18S rDNA だけで種を決定できなかった場合、28S rDNA のシークエンス解析⁵も行った。

3. マウスを用いた *Kudoa septempunctata* のアレルギー性の検討

マウスは、系統 BALB/c (日本エスエルシー)、微生物学的品質は SPF、雌性を用いた。3 週齢で入荷後、7 日間の馴化期間を設定し、4 週齢から実験を開始した。

K. septempunctata を 10^7 胞子/ml の濃度で PBS に懸濁し、 -80°C で凍結した。その後融解と超音波破碎を繰り返して細胞破碎を行い、これを免疫原とした。抗原特異的 IgE 抗体の誘導法として最も確実性の高い投与方法は腹腔内および皮下注射であることが知られ⁴、一般的に経口投与ではア

レルギーが再現されにくい。本研究では、ひとまず *K. septempunctata* の IgE 抗体誘導能の有無を確認することが目的があるため、初回免疫を腹腔内投与、続く追加免疫を皮下投与とすることとした。免疫原調整後、初回免疫時はアジュバントとして等量の水酸化アルミニウムと混和し、腹腔内に 27G の注射針を用いて投与した。投与量は、免疫原とアジュバントの 1 : 1 混合液 500 $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{day}$ とした。10~13 日おきに 2 回の追加免疫を行った。追加免疫は免疫原単独で、皮下に 27G の注射針を用いて投与した。投与量は免疫原 500 $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{day}$ とした。アレルギー反応の指標として、初回免疫直前および各免疫後に静脈から採血し、血清中の total IgE 抗体濃度を測定した。採血は、初回免疫および各免疫投与の直前に、イソフルラン吸入による麻酔下で、尾静脈から 27G の注射針を用いて採血した。採血量は 20 $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{day}$ とし、直ちに軽く圧迫して止血した。最終免疫の 10~13 日後に、イソフルラン吸入による深麻酔下で、心臓から全採血し、採血後直ちに頸椎脱臼により安楽死させた。採取した血液は血清分離後 -80°C で凍結保存し、total IgE 濃度の測定に用いた。マウス血清中の total IgE 濃度の測定は、発色によって検出するサンドイッチ ELISA 法を利用したマウス total IgE 測定キット (森永生化学研究所、横浜市) を使用して行った。ELISA 反応に係る操作は添付のマニュアルに従って行った。発色強度の検出は、96well プレートリーダー (iMark マイクロプレートリーダー、BIO RAD 社、アメリカ) を用いて 450 nm における吸光度を測定することによって行った。各 well の吸光度は 2 回繰り返し測定した。キットに含まれるマウス IgE 標準溶液 0、0.5、1、2、4、8、16、32 ng/ml を測定して得られた値を用いて、検量線を作成した。得られた吸光度は、作成した検量線 (図 1) を用いて解析し、サンプル血清中の IgE 濃度 (ng/ml) に変換した。

さらに、各免疫の直前および全採血直前に、体温および体重を計測し、増減を確認した。マウスでは直腸温度と耳介表面温度は相関関係が有り、直腸温度ではなく耳介表面温度を計測すること

でマウスに与えるストレス軽減させることができるとの報告⁷⁾を参照し、体温測定方法は耳介表面温度を計測することとした。温度計は、Thermoscan Ear Thermometer (日本ブラウン、東京)を用い、連続的に3回繰り返し測定してそれらの平均値を測定値とした。また、アナフィラキシーショック発生の可能性があるため、各免疫直後、90分後、3時間後にマウスの臨床症状の観察を行い、重度の呼吸困難、沈うつ状態、歩行異常・伏臥・後肢脱力を含む自発運動低下等の発生の有無を確認した。

供試したマウス数は、クドア免疫群で15匹、陽性コントロール群(卵白アルブミンを8 mg/回/匹投与)で7匹、陰性コントロール群(PBS投与)で7匹、計29匹で実施した。全ての供試マウスについて免疫原投与・行動観察・体重測定・耳介表面温度測定を実施し、そのうちクドア免疫群で15匹、陽性コントロール群2匹、陰性コントロール群で3匹、計20匹で血清中のtotal IgE抗体濃度の測定を実施した。

得られたtotal IgE濃度、体温、体重の増減を経時的に比較、および最大値について各群間で比較し、増減が有意なものであるかについて、各群間の有意差検定を行った。

C. 研究結果

1. 生鮮魚介類を原因食品とする有症苦情事例残品の解析

自治体から国衛研に送付されたのは33事例52検体だった。内訳はカンパチ14、マグロ(メジマグロを含む)13、タイ類6、ブリ4、シイラ4、カツオ3、サワラ2、ヒラメ2、キス、ハマチ、ハモ、マダカがそれぞれ1検体だった(図2)。33事例中、粘液胞子虫のDNAが検出されたのは25事例(75%)、胞子も確認できたのは16事例(48%)だった。52検体中、粘液胞子虫のDNAが検出されたのは28検体(54%)、胞子も確認できたのが15検体(29%)だった。検出された粘液胞子虫はそれぞれ *Unicapsula seriolae* 9, *K. neothunni* 5, *K.*

hexapunctata 2, *K. thyrsites* 2, *K. iwatai* 1, *K. lateolabracis* 1, *K. septempunctata* 4, データベース未記載の新種4であった(図3)。

魚種ごとに見ていくと、カンパチでは *U. seriolae* 9, *K. septempunctata* 3, *K. neothunni* 1、新種1が検出された(表1)。マグロでは *K. neothunni* 4, *K. hexapunctata* 2であった(表2)。タイからは *K. iwatai* 1が検出された(表3)。シイラからは *K. thyrsites* 1が検出された(表4)。サワラからは新種2が検出された(表5)。

平成27年度におけるカンパチが原因食と考えられる有症苦情事例は20件発生している(国立医薬品食品衛生研究所に検体の送付はなく情報のみ提供の事例も含む)。うち検体から *U. seriolae* が検出されたのは16件であった。A県で発生した事例では、ある施設が毎日夕食時にカンパチの刺身を提供していたが、患者が発生した日のカンパチからのみ *U. seriolae* 特異的PCRが陽性となり胞子も検出された(図4)。事例の情報を集計したところ *U. seriolae* が関与していると思われる事例の潜伏時間は1から12時間が多くみられた(図5)。一方、症状は下痢が多く90%以上の患者が発症していた。しかし、*K. septempunctata* 食中毒で多く見られた嘔吐は少なく、20%程度の患者が発症したのみであった(図6)。

次に *U. seriolae* の検出を容易にするために検査法を検討した(図7)。まず、*U. seriolae* 特異的PCR法を作成した。この方法は *U. seriolae* の18S rDNAをターゲットとしたものである。現時点で、2種類の *U. seriolae* のDNA情報がデータベースに登録されているため、プライマーセットを2種類用意した。この方法を用いると検体中の *U. seriolae* を容易に検出することが出来る。次に *U. seriolae* の顕微鏡検査法を検討した。カンパチから *U. seriolae* を *K. septempunctata* と同じ顕微鏡検査法で検出しようとする、胞子の強い粘着性により塊を作ってしまう正確に計数することが出来ない(図8)。また、油滴と胞子の区別がつきにくく、胞子の検出が困難である(図8)。検討の結果、カンパチの抽出物をスライドグラスに塗抹し火炎固

定することによって観察が容易になることが明らかになった。検出方法を図 9 に示す。カンパチの身 0.5g をすり潰す。接着性の強い *U. seriolae* が付着するのを防ぐため、*K. septempunctata* の検査時のようにメッシュをカンパチに載せないですりつぶす。すり潰したカンパチを PBS で洗浄し、洗浄液を遠沈管に集める。この時、*K. septempunctata* の検査ではセルストレーナーを通すが、*U. seriolae* の付着を防止するため、セルストレーナーには通さない。さらに遠心分離を行い、上清を取り除き、沈査に少量の PBS を加える。これをスライドガラスに塗抹し、細菌のグラム染色を行う要領で火炎固定を行う。火炎固定を行うことによって油滴が消失し、また火炎固定のショックによって孢子から極糸が弾出されるため、判定が非常に容易になることが明らかになった。このスライドガラスをサフラニン染色することによって、さらに孢子の検出が容易になった(図 10)。

2. タイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査

スクリーニングを行ったのはタイ類 45 検体、シイラ、サワラ、メバチマグロ、本マグロ、スズキがそれぞれ 1 検体ずつで計 50 検体であった(表 6)。検体の産地を見てみると東北 1 検体、関東 6 検体、近畿・東海 3 検体、中国・四国 21 検体、九州 16 検体、その他が 3 検体であった(表 7)。検体の購入は川崎市内で行った。

スクリーニングの結果、ハナダイ 1 検体から *K. thyrsites* の DNA が検出された。しかし、顕微鏡検査をおこなったところ孢子は検出されなかった。また、サワラから *Kudoa* 属の DNA が検出されたが、データベース未記載の種のため同定することが出来なかった(表 8)。

3. マウスを用いた *Kudoa septempunctata* のアレルギー性の検討

測定した体重の変化について、初回免疫前と最終免疫後 10~13 日後に実施した全採血直前の体重差を算出し、図 11 に示した。卵白アルブミン投与(陽性コントロール)群は 0.6 g~3.2 kg、PBS

投与(陰性コントロール)群は-0.5 g~1.0 kg、およびクドア投与群は 0.8 g~2.7 kg の体重増加量となり、3 群間に有意な差はなかった。測定した耳介表面温度の変化について、初回免疫前と最終免疫後 10~13 日後に実施した全採血直前の耳介表面温度差を算出し、図 12 に示した。初回免疫直前の各個体の耳介表面温度は 37.2~38.2°C であり、Positive control 群は-0.4 g~1.0°C、PBS 投与(negative control)群は-1.5 g~1.9°C、およびクドア投与群は-0.8 g~0.8°C の体重増加量となり、3 群間に有意な差はなかった。また、過去の研究では、7 週齢の雌性マウスを用いて 14 日間の体温を測定した結果、日間変動は平均値 37.2 から 37.6°C の幅にあったとの報告がある⁷。これと本研究の結果を比較すると、免疫原投与による急激な体温低下は無かったことが確認された。さらに、各免疫後のマウス臨床症状の観察の結果、急激な体温低下や自発運動低下等異常運動は確認されなかった。これらのことから、アナフィラキシーショックの発生は認められないと判断した。

測定したマウス総 IgE 濃度の変化を図 13 に示した。陰性コントロール群と比較して、陽性コントロール群およびクドア投与群では、2 回目免疫原投与後から血清中 total IgE 濃度の有意な上昇($p<0.05$)が確認され、最終免疫原投与後の全採血直前では、クドア投与群において positive control 群と比較しても高い total IgE 濃度の上昇が認められた。

D. 考察

1. 生鮮魚介類を原因食品とする有症苦情事例残品の解析

今回検討した事例のうち 47% から粘液胞子虫の孢子が検出された。これらの粘液胞子虫がすぐにこれらの有症苦情事例の原因微生物とすることはできない。原因物質であることを証明するためにはさらに検体の収集を行うとともに、毒性試験を行う必要性が認められた。一方、53% の事例で粘液胞子虫の孢子を検出できなかったため、今

後は粘液胞子虫以外の原因物質も検討していく必要性が認められた。

今回検討した検体の中でヒラメ以外の魚種から *K. septempunctata* が検出された。クドア寄生ヒラメからの交差汚染なのか、ヒラメ以外の魚に迷入したのか、それともヒラメ以外の魚種でも *K. septempunctata* が増殖できるのかは明らかになっていない。しかし、ウマヅラハギから *K. septempunctata* の胞子が検出された報告があるため、引き続き監視を行っていく必要が認められた。

今回検討した中でカンパチが検体として最も多かった。平成 27 年度に厚生労働省に報告があったものだけでもカンパチに関係する事例が 20 件あった。報告がないものがあるとすると、カンパチによる有症苦情事例は相当数に上ると思われる。また、カンパチからは *U. seriolae* が高率に検出された。現在われわれが行っている研究の途中経過では、市販流通品のカンパチから *U. seriolae* は検出されていない。また、A 県の事例では毎日カンパチを提供している施設があり、カンパチが原因食と思われる有症苦情事例が発生した。保管されている検食を調べたところ、患者が発生した日に提供されたカンパチだけから *U. seriolae* が検出された。このようにカンパチを原因食とする有症苦情事例と *U. seriolae* の間に強い関連性が示唆された。さらに検体や情報の収集を行うとともに毒性試験を行い、カンパチの有症苦情事例の原因物質を明らかにしていきたい。しかし、*U. seriolae* の検査法が確立されておらず、カンパチによる有症苦情事例が発生しても、*U. seriolae* を見逃してしまう事例がしばしばみられる。その理由として、*U. seriolae* の胞子は *K. septempunctata* のものよりもサイズが小さく、また油滴と非常に似ているため判別が難しく、胞子自体の粘着性が非常に強いいため胞子同士が接着し塊を作るためさらに観察が困難になっている。そこで、カンパチの筋肉をすり潰したものをスライドグラスに塗抹し、火炎固定することでこれらの問題を解決した。これらの検査法が普及すれば、地方自治体での日常業務で *U. seriolae* を容易に検

出できるようになるため、今後さらにカンパチによる有症苦情事例と *U. seriolae* の情報が多く報告されるようになることを期待できる。

2. タイ類における粘液胞子虫の汚染実態調査

今回自治体から収集した有症苦情事例の検体数を見てみると、タイ類はカンパチ、マグロに次いで多いことがわかった。そこで、市販流通品タイ類におけるクドア属粘液胞子虫の汚染実態調査を行った。その結果、タイ類からは 1 検体だけ、クドア属粘液胞子虫が陽性となった。この陽性検体は DNA が検出されただけで、胞子は検出されなかった。そのためこの検体が食中毒の原因になる可能性は低いと考えられた。今回の結果から、市販流通しているタイ類におけるクドア属粘液胞子虫の汚染は低いと思われた。今後さらに検体数を増やし、継続的に監視を行っていく予定である。

3. マウスを用いた *Kudoa septempunctata* のアレルゲン性の検討

クドア免疫原の腹腔内および皮下投与においては、アナフィラキシーショックを誘導するほどの強いアレルギー反応は現れなかったが、陰性コントロール群と比較して有意に高く、最終免疫後には陽性コントロール群よりも高い total IgE 濃度の上昇が認められた (図 13)。このことから、クドア破砕物には、腹腔内に投与した場合に、代表的な食物アレルゲンである卵白アルブミンと同等またはそれ以上の IgE 抗体産生誘導能があることが確認された。

今後は、total IgE 抗体中に含まれる *K. septempunctata* 特異的 IgE 抗体産生の有無を確認する。そのためには、今回得られたマウス IgE 抗体を用いた whole の *K. septempunctata* 胞子に対しての免疫組織染色法による IgE 抗体の特異性を確認する予定である。その後、IgE 抗体産生を直接誘導する *K. septempunctata* タンパクの特定を行う必要があり、今回得られたマウス IgE 抗体を用いたイムノブロット法および質量分析によるタンパクの同定を行う。さらに、クドア破砕物の経口