

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07954

研究課題名(和文) 顕性感染型粘液胞子虫は食中毒を起こすのか？ -下痢原性とその機序の解明-

研究課題名(英文) Do kuoid myxozoans showing symptomatic infection cause foodborne diseases? -  
Elucidation of the diarrheagenicity and the mechanism of diarrhea -

研究代表者

河合 高生 (Kawai, Takao)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・課長

研究者番号：30250319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スズキやキチヌ等に「顕性感染」を示すKuoda iwataiは、食中毒との関連性が疑われている。本研究では、K. iwataiの下痢原性を実験動物(乳のみマウス)を使って評価したところ、食中毒を起こすことが証明された唯一の粘液胞子虫であるナナホシクドアと同様に、K. iwataiは下痢原性を示すことが明らかになった。また、K. iwatai胞子を投与したマウス腸管の電子顕微鏡解析とDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析により、下痢の機序として、胞子から弾出された極糸による腸管上皮障害に起因する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キチヌやスズキ等に寄生する顕性感染型のK. iwataiは、不顕性感染型であるナナホシクドアよりも多い孢子数を必要とするものの、ナナホシクドアと同様に下痢原性を示した。その機序もナナホシクドアと似ていたことは、K. iwataiは食中毒を起こすことができると考えられた。本成果は、顕性感染型であっても粘液胞子虫であるならば、食中毒を起こす可能性があることを示唆するものであり、学術的にも公衆衛生学的にも意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Kudoa iwatai, showing a symptomatic infection in Japanese seabass and yellowfin seabream etc., has been suspected as a causative agent of foodborne diseases. In this study, we estimated the diarrheagenicity of K. iwatai using experimental animals (suckling mice). As a result, K. iwatai was found to have the diarrheagenicity, as well as K. septempunctata, which is the only myxosporean parasite proven to cause foodborne diseases. Electron microscopic analyses and gene expression analyses by DNA microarray of intestinal tracts of the mice inoculated with K. iwatai spores suggested that the mechanism of diarrhea might be due to intestinal epithelial damage caused by their polar filaments extruded from spores.

研究分野：食品微生物学

キーワード：Kudoa iwatai 下痢原性 食中毒 顕性感染 粘液胞子虫

## 1. 研究開始当初の背景

粘液胞子虫は、主に魚類を宿主とする寄生虫で、宿主の組織内に大きさ約 10 $\mu$ m 程度の胞子を多数形成する。粘液胞子虫には、胞子を包含するシストが大きくて寄生が顕在化するタイプ(顕性感染型)と、肉眼的に観察できない大きさのシスト(偽シスト)を形成して寄生が顕在化しないタイプ(不顕性感染型)がある。粘液胞子虫の一部の種は、魚類に対して産業上深刻な影響を与えるものの、ほとんどの種は魚類に対して無害であり、ヒトに対する病原性も持たないとされてきた。しかしながら、2000 年以降に増加していた、生食用生鮮魚介類の喫食後に一過性の下痢や嘔吐を発症する原因不明食中毒のうち、養殖ヒラメの生食に起因する食中毒の原因は、ヒラメ筋肉に不顕性感染する粘液胞子虫、*Kudoa septempunctata* (ナナホシクドア)であることが 2011 年 6 月に厚生労働省より通知された。なお、この通知は、原因不明食中毒の疫学調査、網羅的 DNA 解析および下痢発症モデル動物である乳のみマウスを使った動物実験等を実施した結果<sup>1)</sup>を根拠としている。

ヒラメ以外の魚種の生食で同様の症状を呈する有症事例は、2011 年以降もその発生例が報告されている<sup>2)</sup>。ヒラメ以外の事例については、マグロに不顕性感染する *K. hexapunctata* (ムツボシクドア)が原因であると示唆する報告はあるが<sup>3)</sup>、食中毒病因物質としては未だに指定されていない。現在、不顕性感染型クドア属粘液胞子虫については、ムツボシクドアを含め、その病原性や食中毒リスクが評価されつつある。一方、スズキやキチヌ等に顕性感染する *K. iwatai* についても有症事例への関与を示す報告があり<sup>2)</sup>、食中毒との関連性が疑われていたが、その病原性はほとんど研究されていなかった。そこで、乳のみマウスを使って病原性の先行的調査を行ったところ、*K. iwatai* は下痢原性を有する可能性が確認された。しかし、この調査は実験の試行回数が少なく結果の信頼性が乏しかったため、試行回数を増やして科学的に妥当な評価を行う必要があった。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、粘液胞子虫の下痢原性を調べるには 10<sup>7</sup>~10<sup>9</sup> 個以上の大量の胞子が必要との知見を得ていた。そこで、有症事例の報告があり、入手可能な顕性感染型粘液胞子虫であるスズキやキチヌの筋肉寄生性 *K. iwatai* を代表にして、その腸管病原性、すなわち、下痢原性の有無を動物実験等を使って調べ、その発症機序を組織学的および分子生物学的に解析し、顕性感染型粘液胞子虫の食中毒リスクを総合的に評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *K. iwatai* 胞子の下痢原性評価

天然のキチヌやスズキ等を入手し、まずは *K. iwatai* の寄生実態(寄生率と寄生強度)を目視により調査した。*K. iwatai* の寄生度が高かったキチヌからシストを採取し、PBS 中でシストを破碎し *K. iwatai* 胞子を抽出した。抽出胞子はパーコール密度勾配遠心分離法により精製を行った。得られた胞子を乳のみマウスに経胃投与し、経時的に腸管内液体貯留(FA)値を測定した。*K. iwatai* 胞子が下痢原性を示す最小胞子数(閾値)を調べる実験では、蛍光染色法で生存率を算出した。

### (2) *K. iwatai* 胞子の腸管内侵入動態

*K. iwatai* 胞子のマウス腸管内への侵入動態を解析するため、*K. iwatai* 胞子投与後のマウスから十二指腸や空回腸を切り出し、固定、脱水後に樹脂包埋した後、超薄切片を作製して電子染色を実施し、透過型電子顕微鏡下で観察した。

### (3) マウス腸管における遺伝子発現解析

*K. iwatai* 胞子投与後のマウスから十二指腸を切り出して RNA を抽出し、マウス用 Clariom S assay を使って遺伝子発現を解析した。

### (4) 養殖マダイ種苗の *K. iwatai* の寄生実態調査

寄生情報を得た養殖マダイについて、種苗業者ごとに導入直後の種苗から体側筋肉を採取し、PCR 検査により *K. iwatai* の寄生の有無を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) *K. iwatai* 胞子の下痢原性評価

キチヌより採取したシストから *K. iwatai* 胞子を抽出して 10<sup>7</sup> 個のオーダーで乳のみマウスに経時的に投与した結果、投与後 1.5h および 3h で、PBS 投与群と比較して FA 値は有意に上昇した(図 1)。一方、投与後 0.5h、1h では、FA 値の有意な上昇は認められなかった。この抽出胞子の実験では、抽出胞子液中に含まれるタンパク等の夾雑物が結果に影響を及ぼした可能性を完全に排除できなかったため、新たにキチヌより採取・抽出した胞子をパーコール密度勾配遠心分離法によって精製した後、10<sup>7</sup> 個のオーダーで乳のみマウスに経時的に投与した。精製 *K. iwatai* 胞子では、投与後 0.5h を除き、投与後 1h、1.5h、3h で PBS 投与群と比較して FA 値は有意に上昇した(図 2)。この *K. iwatai* 胞子投与後の FA 値の上昇は別の実験で、用量依存性であること、

ならびに加熱処理（95 10分）や冷凍処理（-80 1時間）で失活することを確認した。また、FA 値は最大で  $0.087 \pm 0.008$  まで上昇することを確認した。以上の結果から、*K. iwatai* はナナホシクドアと同様に、生きた孢子が用量依存性に腸管内に液体を貯留させること、すなわち下痢原性を有することが明らかになった。

一方、キチヌによっては色調や硬さが異なるシストが複数種類存在することがあった。弾力のない硬いシストが多かったキチヌより抽出した孢子では、 $10^7$  個のオーダーで乳のみマウスに投与しても FA 値は有意に上昇しなかった。シストに含まれる孢子の生存率を調査した結果、シストの色調によって生存率が大きく変わることがわかった。そこで、*K. iwatai* 孢子が下痢原性を発揮するための閾値を算出するための実験では、一定の色調を示し、弾力のある軟らかなシストを選んで孢子を抽出・精製した。蛍光染色法で孢子の生存率を算出し（図3）、乳のみマウス試験を実施した結果、FA 値が PBS 投与群と比較して有意に上昇し、かつ、その値が 0.080 以上を示す最小孢子数は  $4.5 \times 10^6$  個と算出された。以上の結果、*K. iwatai* が下痢原性を発揮するには、ナナホシクドアよりも約 5 倍以上の孢子数を必要とすることがわかった。

#### (2) *K. iwatai* 孢子の腸管内侵入動態

マウス腸管内における *K. iwatai* 孢子の侵入動態を電子顕微鏡解析によって調べた。十二指腸を詳細に観察したところ、腸上皮に *K. iwatai* 孢子が接着し、孢子から弾出された極糸が腸上皮細胞内に認められた。*K. iwatai* 孢子が作用した腸上皮細胞では、微絨毛の崩壊、ミトコンドリアや小胞体の膨化、変形した核、細胞崩壊など様々な像が観察された。空回腸でも、十二指腸と同様の像が確認された。以上の結果、*K. iwatai* 孢子は孢子から弾出された極糸によって腸管上皮細胞に障害を及ぼし、腸管内液体貯留を起こすと考えられた。

#### (3) *K. iwatai* 孢子を投与したマウス腸管における遺伝子発現解析

*K. iwatai* 孢子投与後のマウス十二指腸から RNA を抽出して DNA マイクロアレイ法による発現遺伝子の網羅的解析を行った。*K. iwatai* 孢子投与群では、加熱処理によって失活させた *K. iwatai* 孢子投与群と比較して、MHC class やケモカイン等の細胞性免疫に関わる遺伝子や、プログラム細胞死の一種であるネクロプトーシスに関わる *11β* 遺伝子の発現上昇が認められた。さらに、炎症や疼痛を起こすプロスタグランジンの産生に関与する *Cox2* 遺伝子の発現が認められたことから、*K. iwatai* 孢子が作用した腸管では炎症応答が起きていると考えられた。

#### (4) 養殖マダイ種苗の *K. iwatai* の寄生実態調査

天然海産魚における *K. iwatai* の寄生状況は個体差が激しく、明確な季節的傾向が認められなかった。養殖マダイの種苗における *K. iwatai* 寄生は、種苗業者にかかわらず陽性反応が確認されなかったことから、感染は種苗由来でなく養殖漁場で起こることが示唆された。

#### (5) まとめ

本研究により、*K. iwatai* は、顕性感染型粘液孢子虫の中で初めて、下痢原性を有することが動物実験により明らかになった。この動物実験は、ヒラメに寄生するナナホシクドアの病原性を明らかにした時と同じ方法を採用している<sup>1)</sup>。有症事例への *K. iwatai* の関与を示す報告が増えつつあることから<sup>2,4)</sup>、*K. iwatai* は食中毒病因物質であることが強く示唆された。

*K. iwatai* は、孢子原形質の関与は不明だが、孢子から弾出された極糸によって腸管上皮細胞に障害を及ぼすことが明らかになった。しかし、孢子原形質の関与の有無等、下痢発症機構の詳細な解明には、今後もさらなる検討が必要であると考えられた。

*K. iwatai* の下痢原性はナナホシクドアと同様、加熱処理や冷凍処理によって失活する。キチヌ、スズキ、クロダイ、マダイ等、*K. iwatai* の寄生が確認されている魚種を扱う場合は、シストの有無に注意を払うこと、シストが確認された場合は廃棄する、もしくは加熱・冷凍処理を施して提供することにより、本粘液孢子虫による食中毒の発生を防止することが可能と考えられた。また、養殖マダイについては、養殖漁場で *K. iwatai* 感染が起こると示唆されたため、今後は養殖漁場の感染対策についての検討も必要であると考えられた。

#### <引用文献>

1. Kawai, T., Sekizuka, T., 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, 2012, 1046-1052.
2. 鈴木淳、村田理恵ら．東京都内で発生したクドアが原因と考えられる下痢症について．病原微生物検出情報(IASR) 33, 2012, 153-155.
3. Suzuki, J., Murata, R., et al., Detection rate of diarrhoea-causing *Kudoa hexapunctata* in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from Japanese waters. Int.

*J. Food Microbiol.* 194, 2015, 1-6.

4. 浅沼貴文、竹原裕代ら. *Kudoa iwatai*が原因と疑われる有症事例の背景と啓発の必要性について. *病原微生物検出情報(IASR)* 43, 2022, 97-99.

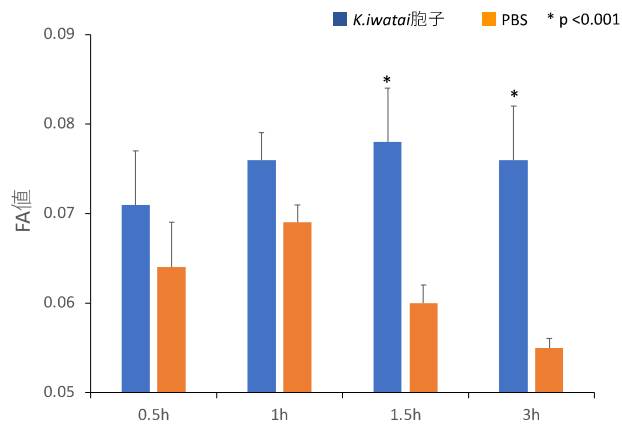


図1 *K. iwatai*胞子 (未精製) の腸管内液体貯留活性

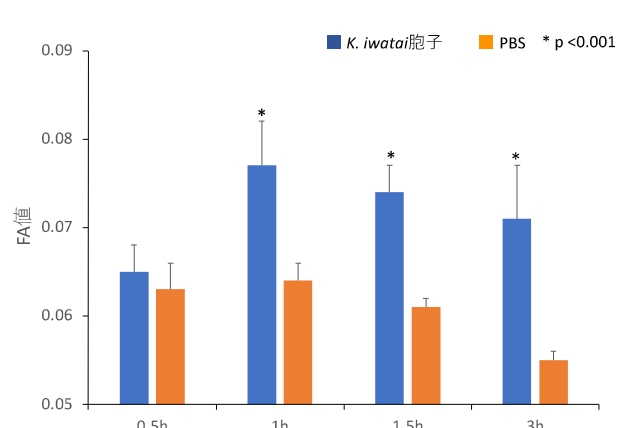


図2 *K. iwatai*胞子 (精製) の腸管内液体貯留活性

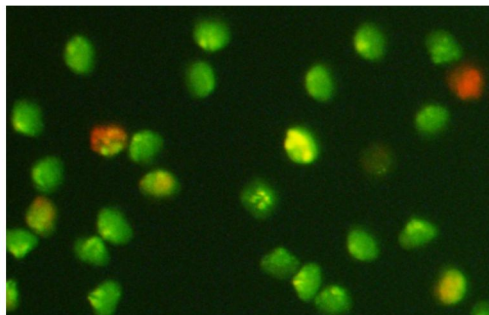


図3 *K. iwatai*胞子の蛍光染色写真

胞子全体が緑色を呈した場合を生胞子、全体または一部が赤色を呈した胞子を死胞子と判定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iida-Aoyama N, Harada T, Kawai T, Yokoyama H, Kawatsu K	4. 巻 81
2. 論文標題 Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of <i>Kudoa iwatai</i> (Myxosporea: Multivalvulida) in Japanese Seabass ( <i>Lateolabrax japonicus</i> ).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Food Prot.	6. 最初と最後の頁 1346-1350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4315/0362-028X.JFP-18-089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jinnai M, Kawai T, Harada T, Nishiyama Y, Yokoyama H, Shirakashi S, Sato H, Sakata J, Kumeda Y, Fukuda Y, Ogata K, Kawatsu K.	4. 巻 259
2. 論文標題 Production of a novel monoclonal antibody applicable for an immunochromatographic assay for <i>Kudoa septempunctata</i> spores contaminating the raw olive flounder ( <i>Paralichthys olivaceus</i> ).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Food Microbiol.	6. 最初と最後の頁 59-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田哲也, 青山奈都子, 河合高生, 横山博, 川津健太郎
2. 発表標題 Kudoa iwatai種特異的リアルタイムPCR法の確立
3. 学会等名 第39回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河合高生, 原田哲也, 横山博, 白樫正, 久米田裕子, 川津健太郎
2. 発表標題 顕性感染型クドア属粘液胞子虫Kudoa iwataiの腸管病原性の検討
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	横山 博  (Yokoyama Hiroshi)  (70261956)	岡山理科大学・獣医学部・教授   (35302)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	原田 哲也  (Harada Tetsuya)  (70516723)	地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・主任研究員   (84407)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------