

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501026

研究課題名(和文) 寄生虫性食中毒に対する分子疫学的解析法の確立

研究課題名(英文) Development of molecular epidemiological analysis on parasitic food-borne disease.

研究代表者

大西 貴弘(Ohnishi, Takahiro)

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部第4室・室長

研究者番号：30321855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：寄生虫性の食中毒事例が国内で急増しているが、これまで大規模でかつ頻発する寄生虫性食中毒はほとんどなかったため、これらの食中毒に対する分子疫学的解析はほとんど行われていない。一方、細菌やウイルス分野では種々の分子疫学的解析手法が開発されている。本研究では細菌やウイルスの分子疫学的解析に用いられてきた解析法の寄生虫への応用を試みた。本研究ではモデル寄生虫として *Kudoa septempunctata* を用いた。種々の検討の結果、Random Amplified Polymorphic DNA法が *K. septempunctata* の分子疫学的解析法の一つとして有用であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In Japan, outbreaks caused by parasites have increased. However, the molecular epidemiological analysis for parasites have not been well studied. A wide variety of molecular epidemiological analysis has been developed in the field of bacteriology and virology. In this study, we tried to apply these molecular analytical methods to parasites. We chose *Kudoa septempunctata* as a model parasite in this study. We demonstrated that Random Amplified Polymorphic DNA method was useful as the molecular epidemiological analysis method of *K. septempunctata*.

研究分野：食品微生物学

キーワード：クドア 寄生虫 疫学 分子疫学 食中毒

1. 研究開始当初の背景

近年、寄生虫性の食中毒事例が国内で急増しているが、これまで大規模でかつ頻発する寄生虫性の食中毒の発生はほとんどなかったため、寄生虫性食中毒に対する分子疫学的解析はほとんど行われていない。それに対して、細菌やウイルス性食中毒に関しては、種々の分子疫学的解析手法が開発され実用化されている。近年ではこうした方法が感染源の特定や食中毒事例間での微生物株の比較に威力を発揮している。これらの方法を寄生虫に応用しようとした場合、寄生虫のゲノムは細菌やウイルスなどと比較して非常に巨大であるため、細菌やウイルスで用いられてきた手法がそのまま寄生虫に対して応用できるかどうかかわからない。また、虫体構成成分も細菌やウイルスとは大きく異なっていると考えられるため、虫体壁を破壊し無傷のゲノム DNA を取り出す方法も細菌やウイルスで用いられている手法をそのまま利用できないかもしれない。さらに、分子疫学に利用できるだけの遺伝的多様性が寄生虫にも存在するのかどうかなど不明な点は多い。

粘液胞子虫の一種である *K. septempunctata* (クドア) はヒラメを原因食材とする食中毒の原因微生物であり、年間 50 件を超える事例が報告されている。この食中毒は一過性の下痢や嘔吐をおもな症状とし、潜伏期間が 2 時間から 8 時間程度と非常に短いのが特徴である。2010 年には愛媛県で患者数が 100 名を超える大規模な事例が発生している。この食中毒を予防するためには、感染魚を出荷している養殖業者を突き止め対策を講じなければいけない。最近では韓国産の輸入魚が急増しており、これによる食中毒が頻発している。この輸入魚は流通過程で国産と混ぜて輸送される場合があり、ひどい場合は国産として販売されている例もあるという。このようにヒラメは非常に複雑な流通経路を経るため、感染源を特定するためには信頼性のある分子疫学的手法が確立される必要がある。また、発生件数、頻度から言っても、クドアは国内において最も優先して対策に取り組みなければいけない食中毒微生物のひとつである。クドアに対する分子疫学的手法を確立することによって、次のような問題点に対処できるようになると思われる。(1) クドアの感染は特徴的で、魚から魚への感染はないと考えられている。このためクドアの遺伝学的多様性は感染した場所に結びつけることができる。つまりクドアの遺伝的多様性を調べることにより感染源となる養殖場を特定できると考えられる。(2) 韓国産の輸入ヒラメによる食中毒が急増している。しかし、前述のとおり韓国産が国産ヒラメに混ぜられて販売される場合があるため、見かけ上は国産ヒラメによる食中毒と断定されている場合が存在すると考えられる。もし、韓国産ヒラメに寄生するクドア特有の遺伝学的特徴があれば、食中毒発生時にはそれをマ-

ーカーとして正確に感染源を特定できる可能性がある。以上のように、クドアの分子疫学的解析法を確立することによって、ヒラメの複雑な流通経路上の問題を取り除き、感染源を特定できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では細菌やウイルスの分子疫学的解析に用いられてきた解析法の寄生虫への応用、特にパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) および Random Amplified Polymorphic DNA 法 (RAPD 法) を中心に寄生虫への応用を試みる。モデル寄生虫として近年国内で最も問題となっているクドアを用い、クドアに対する分子疫学解析法を確立する。

3. 研究の方法

(1) PFGE 法

ゲノム DNA は非常に巨大であるためピペッティングなどの操作によって機械的に切断されてしまう。そのため PFGE 法では、細菌などを低融点アガロースゲルに包埋し、ゲル中で酵素処理を行い、菌壁を溶解しゲノム DNA を取り出し、制限酵素処理により DNA の切断を行う。クドアの本体であるアメーバー状の孢子原形質は厚い孢子壁に覆われている。クドアが腸管細胞に感染すると孢子壁の中から孢子原形質が放出され、孢子原形質が腸管細胞へと侵入する。よって、無傷のゲノム DNA を取り出すためには孢子壁を溶解すると同時に内部の孢子原形質を溶解する必要がある。この条件を既存のタンパク分解酵素などを用いて検討した。

(2) RAPD 法

クドア寄生ヒラメの筋肉より、クドア孢子を精製し QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。RAPD プライマーは Operon 社製 RAPD 10mer kit (Kit A) に含まれる 20 種類のプライマーの内、再現性が認められた 19 種類のプライマーを使用した。PCR 反応液は 20 μ L あたりテンプレート DNA 50 ng、0.5 U Ex Taq (タカラバイオ株式会社)、1 \times PCR buffer、0.2 mM dNTPS、5 μ M RAPD プライマーとした。PCR の反応条件は 94 $^{\circ}$ C、1 分間を 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C、30 秒間、36 $^{\circ}$ C、30 秒間、72 $^{\circ}$ C、1 分間を 45 サイクル、72 $^{\circ}$ C、10 分間を 1 サイクルとし、T100 サーマルサイクラー (Bio Rad 社製) で行った。PCR 反応後、PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、SYBR Safe DNA Gel Stain (Life technology 社製) で染色を行った。得られた DNA バンドをゲル解析ソフト TotalQuant (total lab 社製) を用いて解析し、多型バンドについて各クドア株ごとにその有無を確認した。2 株間の遺伝的距離は以下の式から求めた非類似度によって表した。 N_1 は 19 種類の RAPD プライマーを用いて行った PCR において株 1 で得られたバンドの総数、 N_2 は同様

に株 2 で得られたのバンドの総数、 N_{12} は株 1 と株 2 に共通するバンドの総数である。

$$\text{非類似度} = 1 - 2N_{12} / (N_1 + N_2)$$

このようにして各株間の遺伝的距離を算出し、距離行列を作成した。この距離行列から Neighbor-joining 法を用いてクラスター解析を行った。クラスター解析および系統樹作成は MEGA6 (フリーソフト) によって行った。

4. 研究成果

(1) PFGE 法

今回収集したヒラメ検体の多くは食中毒残品で、検体保管時点で凍結融解が繰り返されており、多くの場合ゲノム DNA の断片化が認められた。増菌することによって無傷のゲノム DNA を用意できる細菌とは異なり、培養を行えない寄生虫の場合、PFGE 法を適用するのは困難であると考えられた。

(2) RAPD 法

食中毒事例由来のヒラメは地方自治体から分与されたものからクドア胞子を精製できるだけの検体量があったもの 34 検体を選び使用した。また参考品として、重度のクドア汚染が認められた大分県 A 養殖場の 3 検体、市場流通品でクドアの寄生が認められた 3 検体を使用した。ヒラメの産地の内訳は大分県 8 検体 (A 養殖場の 3 検体を含む)、愛媛県 8 検体、三重県 1 検体、福井県 1 検体、韓国 8 検体、不明 14 検体であった。天然ヒラメは 1 検体だけであった。参考品を除く検体の事例発生年で見ると 2008 年 1 検体、2009 年 10 検体、2010 年 14 検体、2011 年 8 検体、2013 年 7 検体であった。これらのヒラメから分離したクドア株を RAPD 法により解析し、株間の遺伝的距離を算出し、クラスター解析を行い系統樹を作成した。その結果、今回、解析に用いたクドア株は大きく 8 つのグループに分類された。事例の発生年によってグループの別れ方に特定の傾向は見られなかった。2010 年 10 月に発生した愛媛県での大規模事例由来 8 検体からのクドア株は 4 つのグループに分類された。また韓国産ヒラメからの 8 株も愛媛県の実例が属する 3 つのグループに分類された。これらの結果から愛媛県の大規模事例は韓国産ヒラメに寄生しているクドア株と近縁関係の株を含む複数の株によって引き起こされた可能性が示唆された。A 養殖場のヒラメに寄生しているクドア株も複数の株が存在しており、やはり韓国産ヒラメに寄生しているクドア株と近縁関係にある可能性が示唆された。このように同じ養殖場、同じ事例由来のヒラメに寄生しているクドアに複数の株が存在している原因は明らかでない。複数のロットのヒラメが混ぜて出荷されたのか、それとも自然界におけるクドア株の多様性を表しているのか、今後のさらなる調査が必要である。また、上述のように韓

国産ヒラメに寄生するクドア株も複数のグループに分類されることがわかった。さらに同じ大分県産ヒラメからのクドア株も 4 グループに分かれることが明らかになった。このように同じ産地のヒラメに寄生する *K. septempunctata* でも、複数の株が存在することが今回の結果から示唆された。

あるグループには 10 株が分類されたが、大分県産ヒラメ由来 2 株を除いて、ヒラメの産地は不明であった。このように産地を特定できなかったヒラメがこのグループに集まった原因は明らかにできなかった。またあるグループには 6 株が分類されたが、そのうち 4 株は広島県での事例であった。特に 2010 年 3 月 31 日、2010 年 3 月 18 日、2010 年 8 月 1 日の 3 事例は事例発生日が近いだけでなく、近縁関係にあることが明らかになった。同様に 2009 年 4 月 11 日の福井県における事例と 2009 年 9 月 8 日の埼玉県における事例、2009 年 12 月 7 日の静岡県における事例と 2009 年 10 月 11 日の広島県における事例、2013 年 9 月 26 日の山口県の実例と 2013 年 10 月 14 日の兵庫県の実例など発生日の近い事例由来の株同士が近縁関係に分類されることがあった。これらの結果から、これらの発生日の近い事例は遺伝的背景が近似したクドア株によって引き起こされていることが示唆された。このような近縁関係が生じる原因として、1) ヒラメの種苗業者あるいは養殖場が同一である、2) ヒラメの養殖業者あるいは種苗業者が同一の海域にある、などの可能性が考えられた。今回の結果と疫学情報を合わせて、今後さらに検討を進めていきたい。

(3) まとめ

本研究では RAPD 法を用いてクドアの分子疫学的解析を行った。RAPD 法には多くの欠点知られているが、遺伝情報が詳しく調べられていない微生物でも、すぐに解析を行うことができるという利点を持つ。本研究においても RAPD 法によって通常の疫学調査や遊り調査を補完する情報を得ることができ、RAPD 法がクドア食中毒の分子疫学的解析法の一つとして有用であることが示された。今後、検体数を増やすとともに継続して解析を行い、クドア食中毒の全貌を明らかにするとともに、他の寄生虫性食中毒にも応用を目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Takahiro Ohnishi, Hiroko Furusawa, Rie Oyama, Saki Koike, Tomoya Yoshinari, Yoichi Kamata, Yoshiko Sugita-Konishi: Molecular epidemiological analysis of *Kudoa septempunctata* by random amplified polymorphic DNA analysis, Japanese Journal of Infectious Disease, 2014 (in

press), 査読有
DOI: <http://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2014.190>

〔学会発表〕(計 1件)
大西貴弘：クドア属粘液胞子虫による食中毒，
第84回日本寄生虫学会，2015.3 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 貴弘 (Takahiro Ohnishi)
国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部・
第4室長
研究者番号：30321855