

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 14 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501031

研究課題名(和文) クドア属粘液胞子虫による新規寄生虫性食中毒の防止に向けた現場即応型検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a rapid and simplified method for detecting *Kudoa septempunctata* in the field to prevent foodborne illness caused by this novel myxosporean parasite

研究代表者

河合 高生 (Kawai, Takao)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：30250319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメに寄生する粘液胞子虫、*Kudoa septempunctata* (以下、クドア)による食中毒の発生を防止するため、イムノクロマトグラフィー法によるクドア寄生ヒラメの簡易迅速判別法の開発を試みた。開発した簡易迅速判別法の試作キットは、クドア以外のヒラメ筋肉寄生性*Kudoa*属粘液胞子虫に弱い交差反応を示したものの、ヒラメ筋肉1gあたり20,000個以上のクドア胞子が寄生したヒラメを判別することが可能であった。

研究成果の概要(英文)： *Kudoa septempunctata*, a myxosporean parasite of olive flounder, causes foodborne diseases. We attempted to develop a rapid and simple method for detecting olive flounders infected with *K. septempunctata* using an immunochromatographic technique, in order to prevent foodborne illness caused by this parasite.

The experimental immunochromatographic kit developed in this study was able to detect olive flounders with more than 20,000 spores of *K. septempunctata* per 1 g of muscle tissue, although this kit showed a weak cross-reaction with olive flounder muscle tissue containing other *Kudoa* sp. spores.

研究分野：食品微生物

キーワード：クドア 粘液胞子虫 食中毒 イムノクロマト

1. 研究開始当初の背景

平成 12 年以降、生食用生鮮食品の喫食後に一過性の嘔吐や下痢を呈する原因不明食中毒が増加していた。このうち、ヒラメの生食を原因とする食中毒は、ヒラメ筋肉に寄生する *Kudoa* 属粘液胞子虫の一種、*Kudoa septempunctata* (以下、クドア) が病因物質であることが明らかとなった。クドアは、アニサキス等の他の寄生虫と同様に、冷凍処理や加熱処理でその病原性を失活させることが可能なため、この新規寄生虫性食中毒の発生防止には、宿主であるヒラメに冷凍処理や加熱処理を施すことが有効であることが分かっている。しかし、ヒラメは生食することに商品価値が見出されるため、冷凍処理や加熱処理はほとんど実施されない。このため、クドア寄生ヒラメの流通阻止が食中毒発生防止に最も重要な手段となる。

クドア検出法としてこれまでに開発された方法は、主として食中毒診断を目的とし、高い特異性をもって高感度にクドアを検出する必要があることから、遺伝学的手法が用いられている。この遺伝学的手法に基づくクドア検出法の実施には、微量高速遠心器や核酸増幅装置などの実験機器が必要であり、流通段階で実施するには設備的、時間的および手技的に困難であった。

一方、病原微生物を検出する方法には、上述の遺伝学的手法の他に、抗原抗体反応を利用した免疫学的手法がある。近年、免疫学的手法に基づく病原微生物の簡易迅速検出法として、イムノクロマトグラフィー (以下、イムノクロマト) 法が開発され、利用されている。この方法では、病原微生物に対する抗体を固相化したセルロース膜を作製し、毛細管現象によって病原微生物 (抗原) をセルロース膜上で移動させる。これにより、抗原が標識抗体および捕捉抗体と順次結合し、免疫複合体の集積物が形成され、バンドとして病原微生物の有無を目視で判定することが可能となる (図 1)。イムノクロマト法に基づく検出キットは、細菌やウイルスを対象とするものが多く、寄生虫に関しては、マラリア原虫やクリプトスポリジウム原虫などを測定対象とするものはあったが、クドアの検出キットは開発されていなかった。

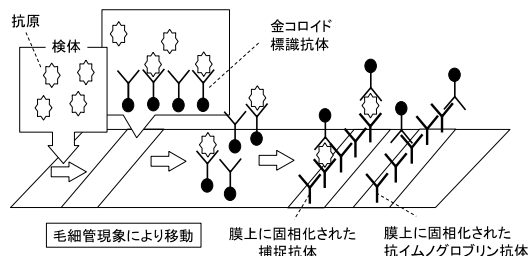


図 1 イムノクロマトグラフィー法の原理

2. 研究の目的

クドア寄生ヒラメを流通段階で排除するため、最終流通現場の販売店においても、クドアの寄生の有無が簡易かつ迅速に判定できるイムノクロマト法によるクドア検出法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) クドア寄生ヒラメから胞子を抽出し、パーコール密度勾配遠心法により精製した。この精製胞子に超音波処理や界面活性剤存在下での加熱処理をそれぞれ施したもの、および未処理の胞子を抗原として、それぞれをマウスに免疫した。超音波処理したクドア胞子を固相化して行った ELISA 法の結果、陽性を示したマウスから脾臓細胞を採取してミエローマ細胞株と融合させた。市販キットを使ってクローニングを行った後、ハイブリドーマの培養上清を用いた ELISA 法を実施し、本研究の目的に資するハイブリドーマを選別した。さらに、超音波処理、0.5% コール酸ナトリウム処理、0.1% TritonX 処理、ホモジナイズ処理、加熱処理、-20 凍結処理および未処理の 7 種類の処理を施したクドア胞子およびクドア非感染ヒラメ筋肉を固相化して ELISA 法を行い、クドア胞子にのみ反応する抗体産生ハイブリドーマを選別した。抗クドアモノクローナル抗体は、選別したハイブリドーマをマウス腹腔内に接種して得られる腹水から、Protein A-Agarose カラムクロマトグラフィーを実施することにより精製した。

(2) 上記(1)で得られたモノクローナル抗体について、クドア、*K. thyrsites*、*K. yasunagai*、*K. neothunni*、*K. lateolabracis*、*K. iwatai* および *K. amamiensis* の胞子を固相化した ELISA 法を実施し、抗体の特異性を調べた。イムノクロマト法に使用する抗体の選別では、胞子を抗原とするサンドイッチ ELISA 法を行い、最も反応性の高い抗体の組み合わせを調べた。

(3) 上記(2)で得られたモノクローナル抗体を使用し、金コロイド標識あるいはニトロセルロース膜への固相化を行い、イムノクロマト法を実施してクドア胞子の検出感度や特異性を検討した。また、最も高い反応性を示した抗体について、モノクローナル抗体アイソタイプングキットを使用し、そのアイソタイプを決定した。

(4) 上記(3)のイムノクロマト法の検討で最も高い反応を示し、かつ、上記(2)の ELISA 法で最も高い特異性を示した 1 種類のモノクローナル抗体を使用し、キット作製会社の協力の下、イムノクロマト法の試作キットを作製し、検出感度や特異性を検討した。

(5) 上記(4)で使用した抗クドア抗体が認識

する抗原を特定するため、HiTrap NHS-activated HP カラムを用いて抗体固定カラムを作製し、超音波処理したクドア胞子の遠心上清から抗原タンパク質をアフィニティー精製した。de novo 配列解析により決定した精製タンパク質の部分アミノ酸配列情報をもとに、精製クドア胞子から精製した mRNA を鋳型に用い、3' RACE 法ならびに 5' RACE 法を行って精製タンパク質をコードする cDNA の塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 市販キットを使ったクローニングの結果、2,500 個以上のハイブリドーマコロニーを得た。これらのハイブリドーマの培養上清を ELISA 法でスクリーニングした結果、抗体価の高い 36 個のハイブリドーマを得た。次に、7 種類の異なる処理を施したクドア胞子およびクドア非感染ヒラメ筋肉を固相化して ELISA 法を行い、クドア胞子に反応し、かつヒラメ筋肉に反応しない 7 つの抗クドア抗体産生ハイブリドーマ (A、B、C、D、E、F、G) を選抜した。これら 7 つのハイブリドーマを使い、抗クドアモノクローナル抗体を精製した。

(2) クドアを含む 7 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫の胞子を固相化して ELISA 法を行った結果、選抜した 7 つのモノクローナル抗体のうち、抗体 E はクドアに高い特異性を示したものの、残り 6 つはクドア以外にも複数の粘液胞子虫に反応した (表 1)。

7 つのモノクローナル抗体の組み合わせ 49 通りについて、胞子を抗原とするサンドイッチ ELSIA 法を行った結果、イムノクロマト法に適すると考えられる 3 つの抗体 (B、C、E) を選抜することができた。

表 1 *Kudoa* 属粘液胞子虫に対するモノクローナル抗体の特異性

	A	B	C	D	E	F	G
クドア	1.353	2.257	2.422	2.294	1.984	2.375	0.909
<i>K. thyrsites</i>	1.261	1.163	1.443	1.694	0.19	1.16	0.059
<i>K. lateolabracis</i>	2.223	0.212	0.205	1.594	0.608	0.527	0.231
<i>K. yasunagai</i>	0.08	0.129	0.287	0.099	0.069	0.267	0.085
<i>K. neothunni</i>	0.177	2.514	2.494	0.493	0.065	2.501	0.188
<i>K. iwatai</i>	0.094	0.36	0.809	0.072	0.091	0.697	0.048
<i>K. amamiensis</i>	0.09	0.069	0.103	0.074	0.081	0.07	0.049
PBS(-)	0.082	0.05	0.054	0.066	0.058	0.049	0.048

数値は OD 値

(3) 上記(2)で選別した 3 つの抗体の組み合わせを変えることにより作製した 9 通りのイムノクロマト法を検討した結果、クドア胞子に対して最もよく反応する抗体の組み合わせは、抗体 C および抗体 E を使用した場合であった (表 2)。この組み合わせを用いたイムノクロマト法は、クドアと異なる 5 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫のうち、ヒラメ筋肉に寄生しない 2 種とヒラメ筋肉に寄生す

る 1 種の計 3 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫に弱い交差反応を示したが、 1.2×10^5 個/mL のクドア胞子を検出することが可能であった (表 3、4)。また、抗体 C および抗体 E のアイソタイプはそれぞれ IgG1 () および IgG1 () であった。

表 2 イムノクロマト法におけるモノクローナル抗体の反応性

検出抗体	固相化抗体					
	B		C		E	
	クドア	PBS(-)	クドア	PBS(-)	クドア	PBS(-)
B	+	+	+	+	+ ^w	-
C	+ ^{ww}	-	+ ^w	-	+	-
E	-	-	+ ^w	+ ^w	++	+ ^{ww}

バンドの濃さに応じて、++、+、+^w、+^{ww}、±、- の 6 段階で判定した。

表 3 抗体 C および抗体 E を用いたイムノクロマト法の特異性

バンドの濃さ	
クドア	+
<i>K. thyrsites</i>	+ ^{ww}
<i>K. yasunagai</i>	-
<i>K. neothunni</i>	-
<i>K. iwatai</i>	+
<i>K. amamiensis</i>	±
ヒラメ筋肉	-
PBS(-)	-

バンドの濃さに応じて、++、+、+^w、+^{ww}、±、- の 6 段階で判定した。

表 4 抗体 C および抗体 E を用いたイムノクロマト法の検出感度

クドア胞子濃度	バンドの濃さ
1.23×10^7 /ml	+
1.23×10^6 /ml	+
1.23×10^5 /ml	+ ^w
1.23×10^4 /ml	-
1.23×10^3 /ml	-
PBS(-)	-

バンドの濃さに応じて、++、+、+^w、+^{ww}、±、- の 6 段階で判定した。

(4) クドアを含む 7 種の *Kudoa* 属粘液胞子虫の胞子を用いて、イムノクロマト法の試キットの有効性を検討したところ、本キットは、クドアと異なるヒラメ筋肉寄生性の *Kudoa* 属粘液胞子虫に対して弱い交差反応を示したが、筋肉 1 g あたり 2.0×10^4 個のク

ドア胞子の寄生が認められたヒラメを検出することが可能であった。

(5) 超音波処理したクドア胞子の遠心上清をアフィニティー精製した結果、分子量約24,000のタンパク質が得られた(図2)。de novo 配列解析およびその結果に基づいたRACE法を行い、精製タンパク質をコードするcDNAの塩基配列を決定し、BLAST検索を行ったところ、相同性のある既知の配列は存在しなかった。この結果より、試作キットに用いた抗クドアモノクローナル抗体が認識する抗原は、新規タンパク質であることがわかった。

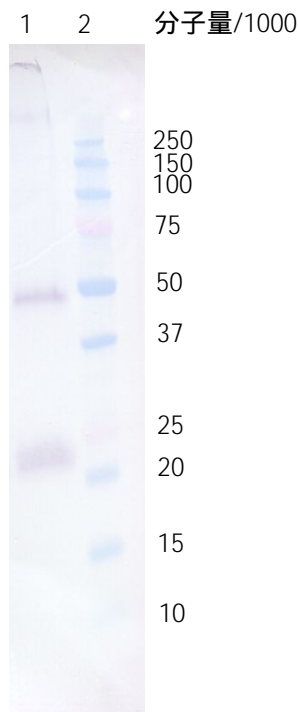


図2 試作キットに使用した抗クドアモノクローナル抗体が認識する抗原のイムノブロットング解析

- 1: アフィニティー精製によって得られた抗原タンパク質
- 2: 分子量マーカー

(6) 本研究で作出したモノクローナル抗体を用いて試作したイムノクロマト法に基づくクドア検出キットは、クドア以外のヒラメ筋肉寄生性 *Kudoa* 属粘液胞子虫に弱い交差反応を示した。しかし、当該寄生虫が寄生したヒラメは、魚の死後にジェリーミート(筋肉融解)を起こすため、市場には流通されずに廃棄されると推測される。また、ヒラメ筋肉1gあたり 1.0×10^6 個を超えてクドアが寄生した場合、食中毒の原因になる恐れが高く、食品衛生法第6条にも違反し回収措置が執られる。このため、クドアが筋肉1gあたり 2.0×10^4 個以上寄生したヒラメを判別することが可能な本キットを市販流通ヒラメに適用すれば、最終流通現場の販売店においても、クドアによる食中毒の防止が可能に

なると考えられる。さらに、ヒトに対して危害リスクを持つヒラメの流通阻止も可能になると考えられる。

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4件)

河合高生、新しく見つかった寄生虫性食中毒 - ヒラメに寄生する *Kudoa septempunctata* による食中毒、食品機械装置、査読無、Vol.51、No.10、2014、pp.52-60、<http://www.bcs-food.co.jp>

Harada, T., Kawai, T., Sato, H., (他2), Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)., Int. J. Food Microbiol., 査読有, Vol.156, 2012, pp.161-167, DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.01810.

Harada, T., Kawai, T., Jinnai, M., (他3), Detection of *Kudoa 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., 査読有, Vol.50, 2012, pp.2964-2968, doi: 10.1128/JCM.01218-12

Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y. (他6), 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., 査読有, Vol. 54, 2012, pp.1046-1052, DOI:10.1093/cid/cir1040

[学会発表](計5件)

河合高生、クドア・セプテンプンクタータ以外のクドアによる食中毒の可能性について、衛生微生物技術協議会第35回研究会、2014年6月27日、タワーホール船堀(東京都)

河合高生、乳のみマウスを使用した *Kudoa 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年10月3日、タワーホール船堀(東京都)

陳内理生、ミトコンドリアDNAを標的としたナナホシクドア検出法の開発、第34

回日本食品微生物学会学術総会、2013年
10月3日、タワーホール船堀（東京都）

河合高生、乳のみマウスを使用した *Kudoa 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年10月25日、アクロス福岡(福
岡県・福岡市)

原田哲也、食中毒患者糞便からのナナホ
シクドア試験法、第33回日本食品微生物
学会学術総会、2012年10月25日、アク
ロス福岡（福岡県・福岡市）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：クドア・セプテンブクタータの迅
速検出法

発明者：陳内理生、河合高生、原田哲也

権利者：大阪府

種類：特許

番号：特願 2013-273156

出願年月日：平成25年12月27日

国内外の別：国内

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

河合 高生 (KAWAI, Takao)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・
主任研究員

研究者番号：30250319

(2) 研究分担者

原田 哲也 (HARADA, Tetsuya)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・
主任研究員

研究者番号：70516723

陳内 理生 (JINNAI, Michio)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・
研究員

研究者番号：70622752