

### Kudoa sp. 18S-rDNA (SSU)のPCR増幅

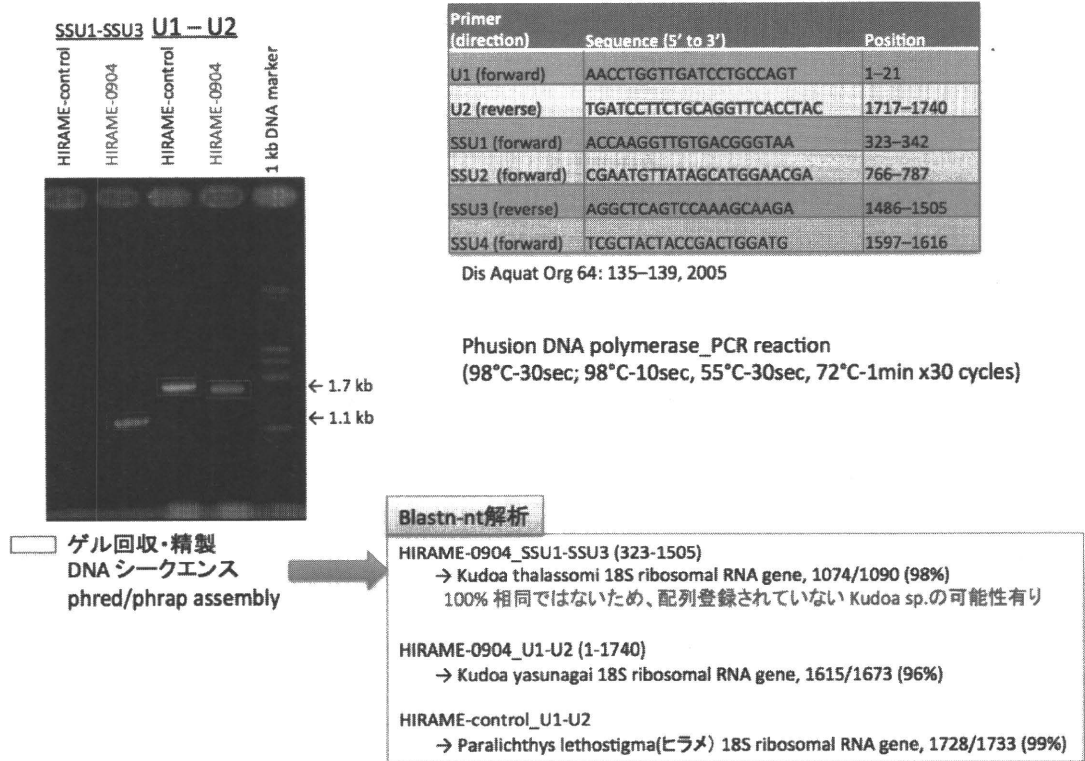


図3 粘液胞子虫 *Kudoa* spp. の 18S-rRNA の PCR 増幅。PCR 増幅は、既報論文のプライマー配列を用いた (Dis Aquat Org 64:135-139, 2005)。SSU1-SSU3 の組み合わせでは、コントロール・ヒラメ(HIRAME-control)には特異増幅が見られず、嘔吐ヒラメ(HIRAME-0904)に想定された 1.1 kb の特異増幅を認めた。ゲルから増幅バンドを回収後、キャピラリー法により配列確定し、新規 *Kudoa* sp. の 18S-rRNA であることが判明した(後に、*Kudoa septempunctata* と登録される)。U1-U2 の組み合わせでは、コントロール・ヒラメ(HIRAME-control)の 1.7 kb はヒラメ 18S-rRNA 配列であり、嘔吐ヒラメ(HIRAME-0904)の 1.7 kb は新規 *Kudoa* sp. の 18S-rRNA であることが判明した。

qRT-PCR primer selection for *Kudoa* sp.

Paralichthys lethostigma(ヒラメ) 18S ribosomal RNA gene  
*Kudoa* sp. 18S-rDNAのアライメントから、*Kudoa* sp. 特異領域を基本にプライマー設計

Primer-pair	Primer-F	18S-position	Primer-R	18S-position	amplicon length
Kudoa-1	Kudoa-18S-rDNA_F1	72	Kudoa-18S-rDNA_R2	266	195
Kudoa-2	Kudoa-18S-rDNA_F2	242	Kudoa-18S-rDNA_R3	481	240
Kudoa-3	Kudoa-18S-rDNA_F3	457	Kudoa-18S-rDNA_R4	710	254
Kudoa-4	Kudoa-18S-rDNA_F4	686	Kudoa-18S-rDNA_R5	843	158
Kudoa-5	Kudoa-18S-rDNA_F5	819	Kudoa-18S-rDNA_R6	1029	211
Kudoa-6	Kudoa-18S-rDNA_F6	1005	Kudoa-18S-rDNA_R7	1277	273
Kudoa-7	Kudoa-18S-rDNA_F7	1253	Kudoa-18S-rDNA_R8	1420	168
HIRAME-control	HIRAME-18S-rDNA-F	493	HIRAME-18S-rDNA-R	689	197

Kudoa-18S-rDNA_F1	GTAAATCAGTTATTGTCCGTTCCGGT
Kudoa-18S-rDNA_F2	TTGTGCGATAGTCCGATCGAATTTCT
Kudoa-18S-rDNA_F3	TTCACATCGGAATGAACGTAATTT
Kudoa-18S-rDNA_F4	GGTCACTTGCAGGTTGTGCCTTGAA
Kudoa-18S-rDNA_F5	ATTTGAGGGCGTTAGTACTTGGTGG
Kudoa-18S-rDNA_F6	AATCCAGGTTGGCCCTCAGTGAAA
Kudoa-18S-rDNA_F7	TATTCCGGTAACGAGCCGAGACCACG
Kudoa-18S-rDNA_R2	AGAAATTCGATCGGACTATCGACAA
Kudoa-18S-rDNA_R3	AAATTACGTTATTCCGATAGTGAA
Kudoa-18S-rDNA_R4	TTCAAGGCACACCTCGCAAGTGACC
Kudoa-18S-rDNA_R5	CCACCAAGTACTAACGCCCTCAAAT
Kudoa-18S-rDNA_R6	TTTCACTGAGGGCCCAACCTGGATT
Kudoa-18S-rDNA_R7	CGTGGTCTCGCTCGTTACCGGAATA
Kudoa-18S-rDNA_R8	TGTTGTCACATCATTGTAGCACAC
HIRAME-18S-rDNA-F	AATAACAATACAGGACTCTTTCCGAG
HIRAME-18S-rDNA-R	CCTCGCGGCGGACCGTCAAGCTCGAT

図4 粘液胞子虫 *Kudoa* spp. の18S-rRNA全般をPCR増幅するための共通プライマーをアライメント解析を行い選別した。

qRT-PCR primer check for *Kudoa* sp.

SuperScript III RT/Platinum Taq mix	1 $\mu$ l
2xSYBR Green reaction mix with ROX	25 $\mu$ l
primer-pair (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
DEPC-water	18 $\mu$ l
sample: 0904-RNA 1/4 dilution (52 ng/ $\mu$ l)	4 $\mu$ l
	50 $\mu$ l

↓  
 ABI 7900HT (9600 mode)  
 50C 3min  
 95C 5min  
 95C 15sec x40  
 60C 45sec x40

dissociation curve

Kudoa-5のプライマーペアが  
 ノンスペもなく良さそう。

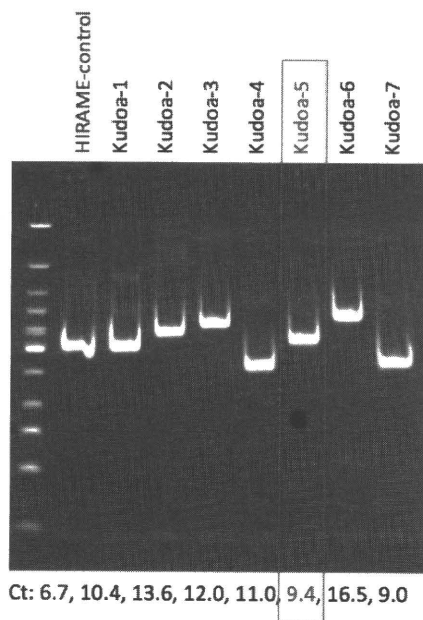


図5 図4のプライマー・ペアを用いて、精製RNAを鋳型にした定量的逆転写PCR(qRT-PCR)を行った。Kudoa-1~7の内、Kudoa-5のペアが非特異的増幅もなく良好な検出感度を得られると推測された。

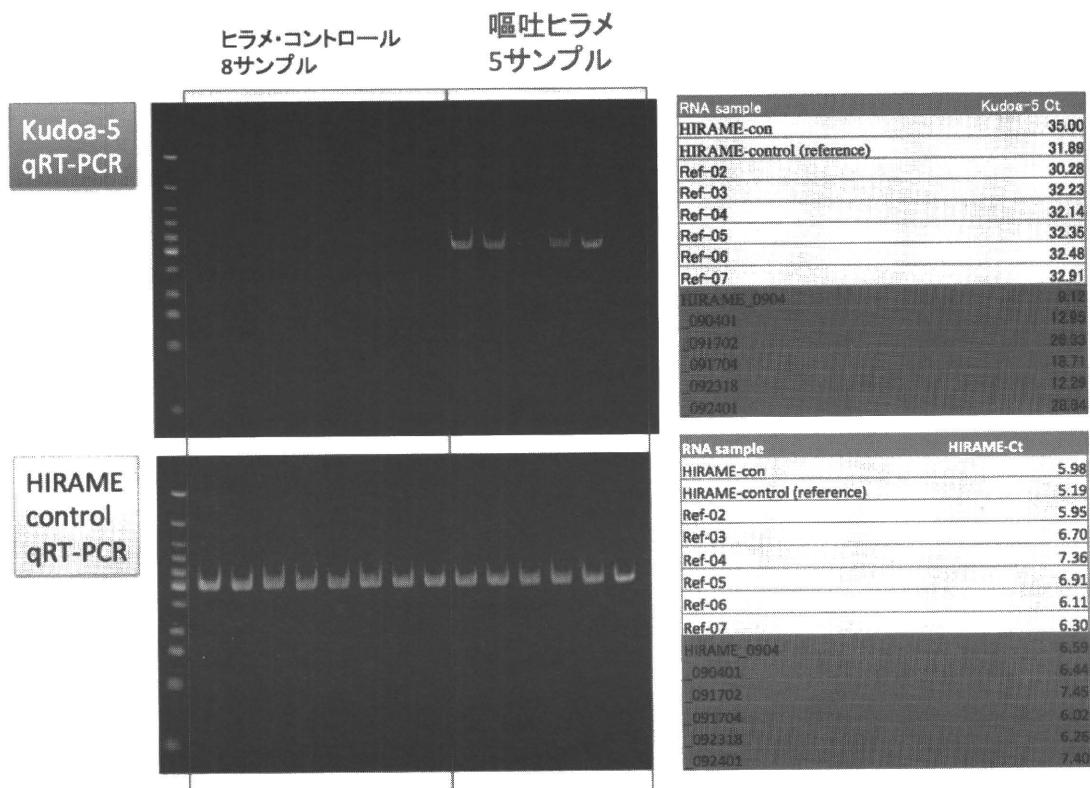


図6 Kudoa-5 のペアと、内在性コントロールとしてヒラメ 18S-rRNA に対する qRT-PCR も行い (HIRAME control qRT-PCR)、ヒラメ食材に内在する粘液胞子虫 *Kudoa* sp. の存在量を概算した。他、嘔吐サンプル5検体から *Kudoa* sp. が潤沢に検出されたものの、コントロール食材からは検出されなかった。

## 厚生労働科学研究費補助金

### (厚生労働科学特別研究事業)

ひらめ喫食と発症の疫学調査

分担研究報告書

研究分担者 八幡裕一郎 国立感染症研究所感染症情報センター 主任研究官

研究協力者 小西良子 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部 部長

研究協力者 豊川貴生 同 研究員

研究協力者 中村奈緒美 同 協力研究員

#### 要旨

倉敷市保健所の調査によると、平成 17 年頃よりひらめ等の生鮮魚の喫食による原因不明の食中毒の報告がなされた。しかしながら、疫学的に有意な結果は十分に得られていない。平成 22 年に A 県保健所管内及び B 市保健所において C 銀行の景品のひらめ喫食による嘔吐、下痢を主な症状とする食中毒事例が発生した。本研究は疫学的にひらめの喫食と発症のリスク推定及び発症するクドア摂取量の推定を行うことを目的とした。調査対象は C 銀行の景品が送付された家庭で調査協力を得た家庭とした。調査方法は標準調査票を用いた。本研究は大規模なひらめ喫食による食中毒事例であった。第一報で報告された発症率と症例対照研究の発症率は 25.3%であった。潜伏期は中央値が 5.0 時間で、症状は下痢が 79.7%で最も多く、症例のひらめ喫食量の中央値が 66.7g であった。保存は冷蔵またはチルドが多かった。疾患の治療中がある者は症例で 39.0%、対照で 30.5%であった。治療中の疾患は高血圧が最も多く、症例の 43.5%、対照の 39.2%であった。ひらめ喫食での発症リスクは景品と同封のポン酢の使用 (OR=2.33, 95%CI: 1.27-4.26) のみが有意であった。モンテカルロシミュレーションによるクドア摂取量の推定は 75 パーセンタイル値が  $7.20 \times 10^7$  であった。モンテカルロシミュレーションにより得られた推定により、発症するクドアの摂取量が推定 ( $7.20 \times 10^7$ ) され、今後のさらなる検討により一般化する必要があるものの、暫定値としての予防対策への利用が可能であると考えられた。

#### A. 研究目的

倉敷市保健所の調査によると、平成 17 年頃よりひらめ等の生鮮魚を喫食後に原因不明の嘔吐、下痢等の消化器症状を呈する食中毒事例が報告された。厚生労働省も原因不明の生鮮魚の喫食との調査実施を発生自治体に依頼

を行い、国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所などとともに調査および解析を実施してきた。しかしながら、多くの事例は少数グループで飲食店同じような喫食状況であり、対照群の設定などが困難な場合やサンプリング誤差の多い状況などのため、ひらめ等

の原因として疑われている食品の喫食が発症への強いリスクとしての関与が得られた食中毒事例はいくつかあるが、5分の4以上の事例はひらめが有意なリスクとして推定されなかった。

平成22年10月にA県保健所管内及びB市保健所においてC銀行の景品として送付されたひらめを喫食した約500人中約110人が嘔吐、下痢等の消化器症状を呈する食中毒事例が発生した。本事例は疫学情報収集により、喫食量と発症の関連、ひらめ喫食によるクドア発症量の推定をすることを目的とする。

## B. 研究方法

調査対象はC銀行の景品が送付された家庭で、調査に協力が得られた家庭とした。症例と対照は下記の定義を満たす者とし、国立感染症研究所感染症情報センターで作成した標準質問票を用いて調査を実施した。

### 症例定義

症例定義は2010年10月5日～9日に伊予銀行の景品が届いた家庭で下痢または嘔吐を呈した者とした。

対照は症例と銀行の景品が届いた家庭で、2010年10月5日～9日に下痢または嘔吐を呈していない者とした。

調査方法はA県の保健所及びC市の保健所より研究班で作成した標準調査票を利用し、保健所職員が調査を行った。統計解析は相関係数の算出をSpearmanの順位相関係数、喫食及び健康状態が発症のリスクについてはロジスティック回帰分析（ゼロセルがある場合には全てのセルに1を加算して算出）によりオッズ比（OR: Odds Ratio）を算出し、クドア摂取量による発症する閾値の推定をモンテカルロシミュレーションにより喫食量[g]とクド

アの汚染度[個/g]をそれぞれランダムに10万回抽出し、乗算し、その分布より75パーセンタイル値を閾値として算出することとした。また、クドア汚染度は国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部小西部長グループで測定した74検体のひらめのデータを利用した。

## C. 研究結果

調査対象者の属性（表1）は発症者が25.3%（59/233）で、男性の発症者が24.0%（23/96）、女性の発症者が26.7%（36/135）であった。年齢階級別の発症割合は20-29歳が42.9%（3/7）で最も高く、次いで60-69歳（30.6%）、70-79歳（28.6%）であった。

症例の潜伏期喫食量、症状年齢、潜伏期の中央値（表2）は潜伏期が5.0時間（範囲：1.0-22.0時間）であった。症状は下痢が79.7%（47/59）で最も多く、次いで嘔吐（57.6%）の順であった。下痢を呈した者のうち24時間以内の下痢回数は中央値が3.0回（範囲：1.0-20.0回）であった。喫食量は症例の中央値が66.7g（範囲：33.3-300.0g）であった。

治療中の疾患がある者は症例が39.0%（23/59）、対照が30.5%（51/167）であった（表3）。治療中の疾患は高血圧が症例で10人、対照で20人であった。保管方法は冷蔵が最も多く、症例が48.3%（28/58）、対照が63.7%（109/171）で、チルドがともに次に多かった（発症者：39.7% [23/58]；対象者：21.1% [36/171]）。

ひらめの喫食量は100g以上120g未満が27.4%（61/223）で最も多く、次いで40g以上60g未満が26.9%（60/223）であった。分布の特徴は見られなかった（図1）。

（表4）。

基礎疾患及び喫食方法による発症のリスク

の検討を表4に示した。

通院中の疾患、高血圧、アレルギーの診断、加熱での喫食、醤油の使用及び自宅のポン酢使用は発症と有意な関連はなかった。ひらめの調理方法は生での喫食 (OR=7.26, 95%CI: 0.95-55.44) のオッズ比が大きかったが、有意ではなかった。また、景品と同封のポン酢の使用 (OR=2.33, 95%CI: 1.27-4.26) は有意に発症していた。

モンテカルロシミュレーションにより喫食量 (図2)、クドアの汚染度 (図3)、クドア摂取量 (図4) を算出した。喫食量及びクドア汚染度は特徴的な分布ではなかったが、クドア摂取量は左肩上がりの分布であった。モンテカルロシミュレーションにより求められたひらめ摂取量、汚染度、クドア摂取量のパーセンタイル値より、クドア摂取量の75パーセンタイル値は  $7.20 \times 10^7$  であった (表5)。

#### D. 考察

本研究は大規模なひらめ喫食による食中毒事例であった。第一報で報告された発症率と症例対照研究の発症率は25.3%であった。潜伏期は中央値が5.0時間で、症状は下痢が79.7%で最も多く、症例のひらめ喫食量の中央値が66.7gであった。保存は冷蔵またはチルドが多かった。疾患の治療中がある者は症例で39.0%、対照で30.5%であった。治療中の疾患は高血圧が最も多く、症例の43.5%、対照の39.2%であった。ひらめ喫食での発症リスクは景品と同封のポン酢の使用 (OR=2.33, 95%CI: 1.27-4.26) のみが有意であった。モンテカルロシミュレーションによるクドア摂取量の推定は75パーセンタイル値が  $7.20 \times 10^7$  であった。

モンテカルロシミュレーションにより推定

された発症量のクドア摂取量閾値は  $7.20 \times 10^7$  (個) であると算出された。本閾値は非常に多量のクドア摂取が嘔吐及び下痢を引き起こす事が考えられた。特に、閾値以上の摂取量は非常に多量の摂取をすることで下痢及び嘔吐を中心に発症する事が推定された。本研究で算出したひらめ摂取による発症への喫食量の閾値は限定的な流通経路による事例であったため、一般化するには本事例のみならず複数の事例による検討を要する必要があると考えられた。

喫食量は症例及び対照群共に不均一な摂取であった。また、症例は対照群と比べ多くの喫食をしていたとは言えず、むしろ有意ではないが、中央値は症例 (66.7g) よりも対照 (の喫食量が多かった。摂取量のシミュレーションより、分布が仮定できる様な喫食状況ではなかったため、クドアによる汚染度合いとひらめの摂取量が発症と関連していると考えられた。

通院・治療中の疾患及びアレルギーの診断が発症への有意なリスクにはなっていなかった。特定の疾患と発症への関連は本研究の結果からは否定的であると考えられた。

喫食と発症のリスクを検討したところ景品と同封されたポン酢と一緒に喫食をしていた者が有意に発症していた (OR=2.33, 95%CI: 1.27-4.26)。同封のポン酢がひらめ喫食量を増やすことへの交絡因子である可能性があり、見掛け上の関連の可能性もあと考え、同封のポン酢を利用する事によるひらめの喫食量の増加は発症との関与を検討したが有意な差は見出されなかった (データ未表示)。

#### E. 結論

モンテカルロシミュレーションにより得ら

れた推定により、発症するクドアの摂取量が推定 ( $7.20 \times 10^7$ ) され、今後のさらなる検討により一般化する必要があるものの、暫定値としての予防対策への利用が可能であると考えられた。

F. 謝辞

C 銀行からの景品のひらめを喫食し本調査にご協力いただきました各位、喫食 A 県保健

所、B 市保健所等の関係機関の皆様に厚く御礼申し上げます。

G. 発表論文

なし

H. 学会発表

なし

表1 対象者の属性

	症例		対照	
	人	%	人	%
対象者	59/233	25.3	174/233	74.7
性別				
男	23/96	24.0	73/96	76.0
女	36/135	26.7	99/135	73.3
年齢階級				
0-9 歳	0/8	0.0	8/8	100.0
10-19 歳	2/14	14.3	12/14	85.7
20-29 歳	3/7	42.9	4/7	57.1
30-39 歳	6/25	24.0	19/25	76.0
40-49 歳	4/19	21.1	15/19	78.9
50-59 歳	9/35	25.7	26/35	74.3
60-69 歳	19/62	30.6	43/62	69.4
70-79 歳	10/35	28.6	25/35	71.4
80-89 歳	5/25	20.0	20/25	80.0
90 歳以上	1/3	33.3	2/3	66.7

表2 症例の年齢、潜伏期、症状、喫食量

	中央値	範囲
年齢 症例	62.0 歳	13.0 - 90.0 歳
(対照)	60.5 歳	1.0 - 91.0 歳)
潜伏期	5.0 時間	1.0 - 22.0 時間
下痢回数 (24 時間以内)	3.0 回	1.0 - 20.0 回
喫食量 症例	66.7g	33.3 - 300.0g
(対照)	77.5g	20.0 - 300.0g)
	人	%
症状		
発熱あり	11/56	19.6
嘔吐あり	34/59	57.6
下痢あり	47/59	79.7
腹痛あり	25/59	42.4



表3 治療中の疾患、保管方法

	症例		対照		合計	
	人	%	人	%	人	%
治療中の疾患あり	23/59	39.0	51/167	30.5	74/226	32.7
高血圧	10/23	43.5	20/51	39.2	30/74	40.5
アレルギーあり	3/59	5.1	13/167	7.8	16/226	7.1
保管方法						
室温	5/58	8.6	9/171	5.3	14/229	6.1
冷蔵	28	48.3	109/171	63.7	137/229	59.8
チルド	23	39.7	36/171	21.1	59/229	25.8
チルドと冷凍	0	0.0	2/171	1.2	2/229	0.9
冷凍	2	3.4	15/171	8.8	17/229	7.4

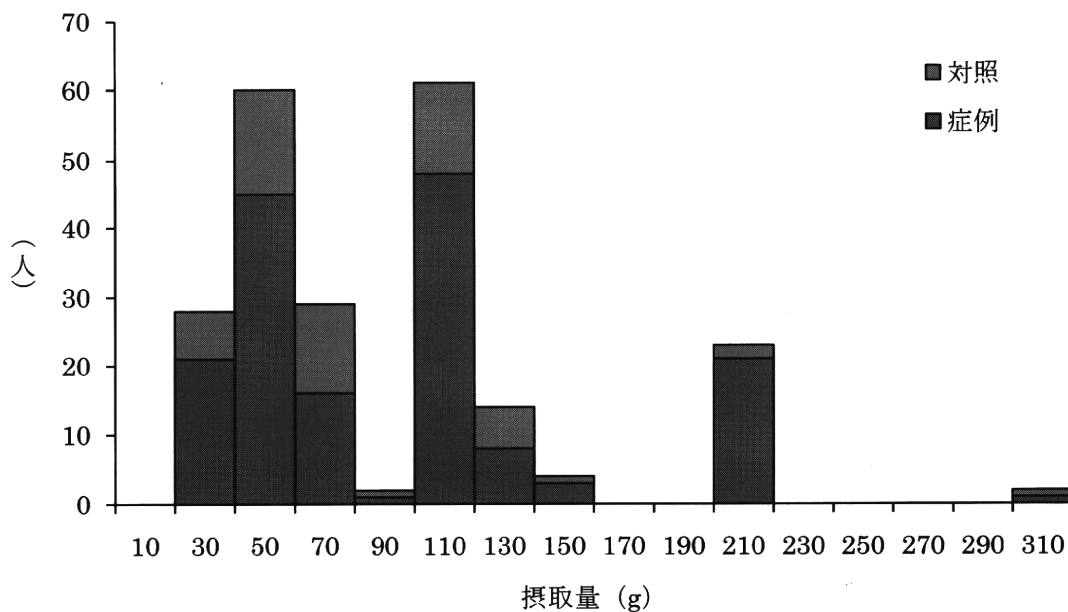


図1 ひらめの喫食量

表 4 基礎疾患及び喫食方法によるリスク

	症例		対照		OR <sup>b)</sup>	95%CI <sup>c)</sup>	
	人	%	人	%			
通院・治療中の疾患あり	23/59	39.0	51/167	30.5	1.45	0.78 - 2.70	
高血圧あり	10/23	43.5	20/51	39.2	1.57	0.69 - 3.58	
アレルギー診断あり	3/59	5.1	13/167	7.8	0.64	0.17 - 2.31	
調理法・生 <sup>a)</sup>	59/59	100.0	156/174	89.7	7.26	0.95 - 55.44	
調理法・加熱（揚げ物）	1/59	1.7	7/174	4.0	0.41	0.05 - 3.42	
調理法・加熱（汁物・鍋）	8/59	13.6	26/174	14.9	0.89	0.38 - 2.10	
調味料・醤油（わさび無）	6/59	10.2	14/174	8.0	1.29	0.47 - 3.54	
調味料・醤油（わさび有）	34/59	57.6	76/174	43.7	1.75	0.97 - 3.19	
調味料・ポン酢（景品と同封）	36/59	61.0	70/174	40.2	2.33	1.27 - 4.26	
調味料・ポン酢（自宅） <sup>a)</sup>	0/59	0.0	14/174	8.0	0.18	0.02 - 1.38	

a) 各セルに 1 を加算して算出

b) OR: Odds Ratio

c) 95%CI: 95%信頼区間 (95% Confidential Interval)

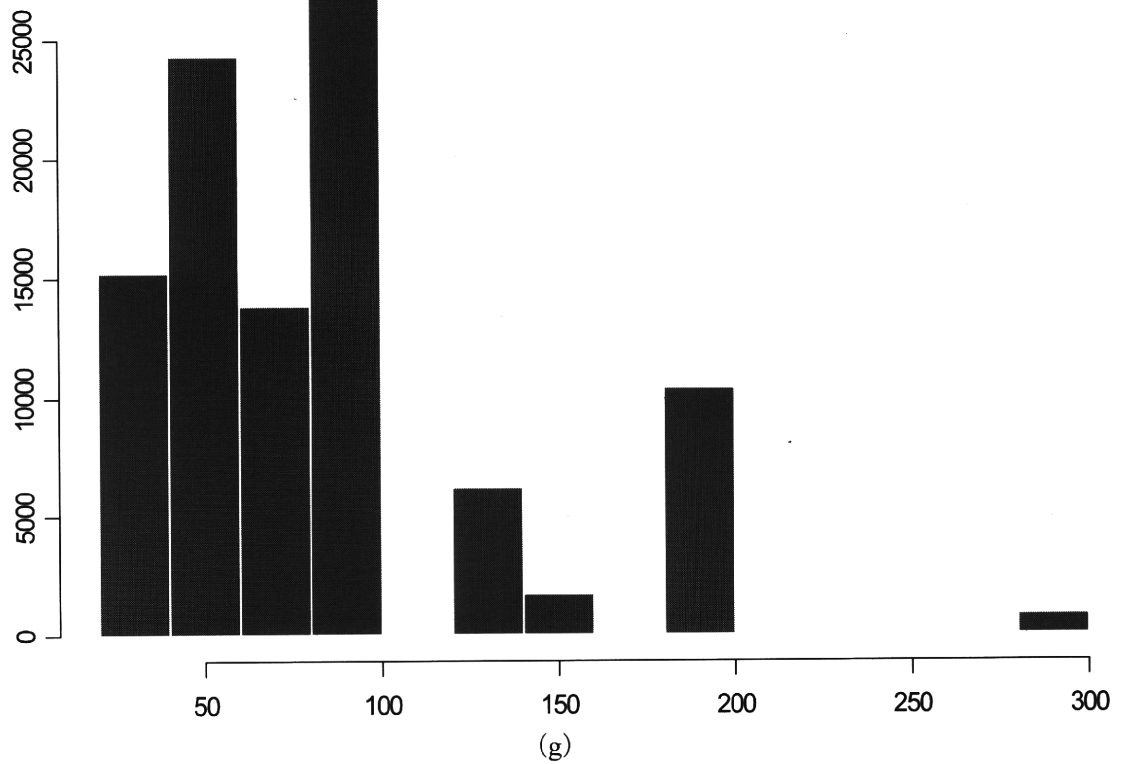


図2 モンテカルロシミュレーションによる喫食量 (g)

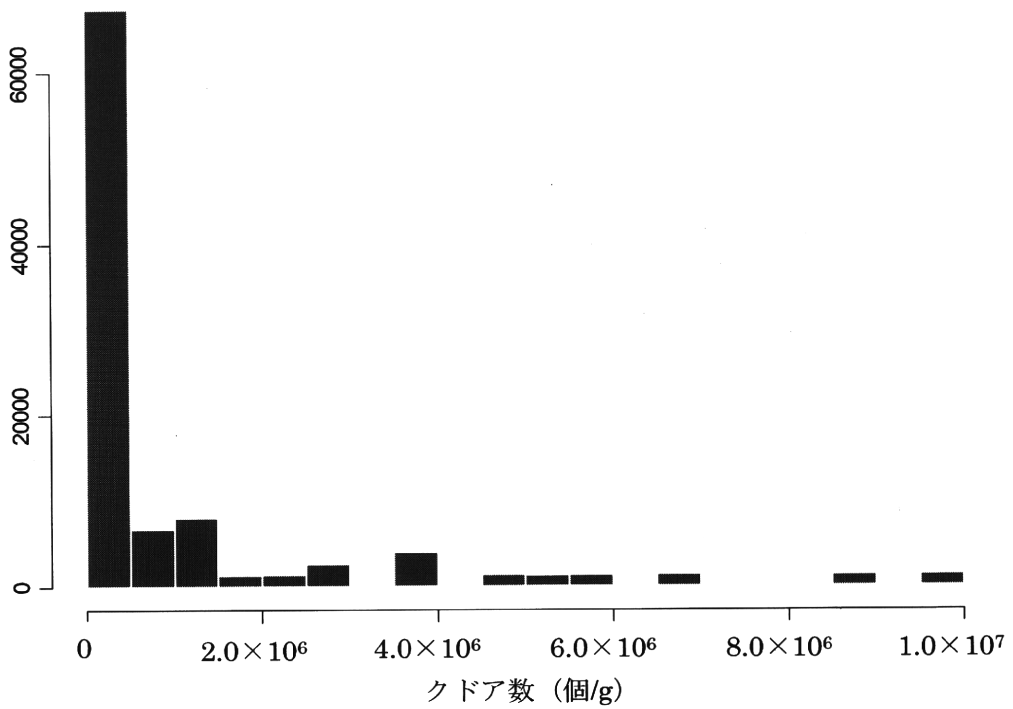


図3 モンテカルロシミュレーションによるクドア汚染度 (個/g) の分布

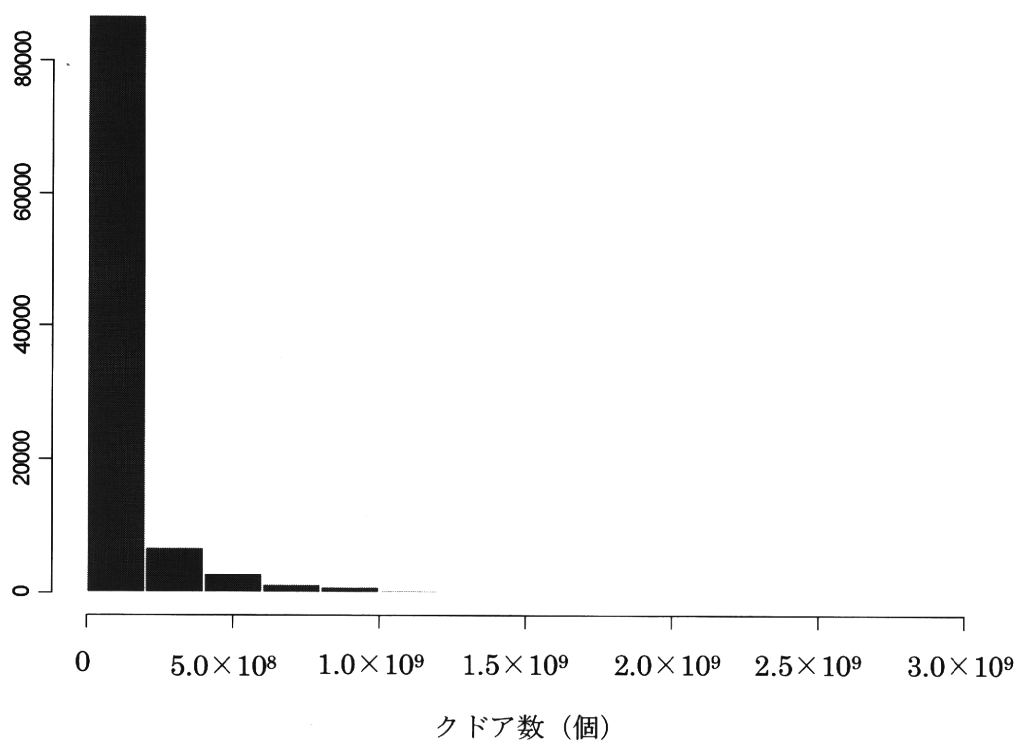


図4 モンテカルロシミュレーションによるクドア摂取量の分布

表5 モンテカルロシミュレーションにより求められたひらめ摂取量、汚染度、クドア摂取量のパーセンタイル値

パーセンタイル値	ひらめ摂取量 (g)	汚染度 (個/g)	クドア摂取量 (個)
0%	20	$1.00 \times 10^3$	$2.00 \times 10^4$
25%	50	$1.00 \times 10^3$	$7.50 \times 10^4$
50%	66.67	$4.50 \times 10^3$	$3.00 \times 10^5$
75%	100	$1.07 \times 10^6$	$7.20 \times 10^7$
100%	300	$9.63 \times 10^6$	$2.89 \times 10^9$

# 厚生労働科学研究費補助金 (厚生労働科学特別研究事業)

## 生鮮獣肉中の危害因子の制御に関する研究 分担研究報告書

研究分担者	鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部 室長
研究協力者	渡辺 麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
研究協力者	入倉 大祐	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部
研究協力者	斉藤 守弘	埼玉県食肉衛生検査センター	精密検査部
研究協力者	田中 成幸	埼玉県食肉衛生検査センター	精密検査部
研究協力者	原田 誠也	熊本県保健環境研究所	微生物科学部
研究協力者	古川 真斗	熊本県保健環境研究所	微生物科学部

### 要旨

馬肉を共通食とする食中毒の原因を分析するとともに、その制御を目的に実験を行った。住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* のシストを含んだ馬肉のホモジネートは、ウサギ腸管ループ試験陽性だった。ホモジネートル液中に、タンパク質分解酵素の影響で失活する、可溶性の毒性物質を認めた。シスト内に含まれているブラディゾイトにも腸管毒性が認められた。*S. fayeri* ブラディゾイトが馬肉中の毒性を担う可能性が高い。シスト含有馬肉を種々の低温と時間で処理し、ブラディゾイトの安定性を調べた。馬肉の冷蔵はブラディゾイトの死滅には効果がなかった。 $-20^{\circ}\text{C}$ や $-30^{\circ}\text{C}$ では48時間の保持時間が必要だった。急速凍結後の $-30^{\circ}\text{C}$ や $-35^{\circ}\text{C}$ では24時間の、 $-40^{\circ}\text{C}$ では18時間の、 $-60^{\circ}\text{C}$ では12時間の保持によってブラディゾイトが死滅した。この結果は、馬肉の凍結処置によって、*S. fayeri* の危害を制御できる可能性を示唆している。一方、*S. fayeri* シストの危害性の本体を確定するため、毒性物質として候補になっていた15 KDa タンパク質の同定を試みた。内部アミノ酸配列解析の結果、同タンパク質はActin filamentを分解する寄生虫性タンパク質と相同性があることがわかった。15 KDa タンパク質の組換え体を作製し、毒性学的検討を行えば、馬肉が共通食の原因物質を確定できる可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

生鮮獣肉を共通食とした下痢、嘔吐、吐き気、倦怠感、虚脱感を症状とする食中毒が報告され

ている。原因が特定されないため、有症事例として報告される場合も多い。共通食の獣肉の種類は馬肉で、生食をしている。平成21年度の

食品検査事業において、馬肉中に住肉胞子虫の1種、*Sarcocystis fayeri* のシストが検出されることが報告されている<sup>1)</sup>。*S. fayeri* はイヌを終宿主、ウマを中間宿主とし、ウマの骨格筋の中に、シストとして寄生する<sup>2, 3)</sup>。イヌに取り込まれるのを待ち、*S. fayeri* シストはウマの筋肉内で生息する。寄生しているウマが生き続ける限りシストも生存し続ける<sup>2, 3)</sup>。シストの中には、イヌの腸管上皮細胞内に侵入し、次世代を形成するブラディゾイトが含まれている。

また、同じ報告の中で、シスト抽出物に、ウサギに沈鬱、下痢、血性下痢、死亡をひき起こすタンパク質が含まれていることが示されている。*S. cruzi* という住肉胞子虫の種についての解析では、分子量が約 15 KDa で、ウサギに同様の毒性を示すタンパク質が報告されており<sup>4)</sup>、*S. fayeri* でも同じ分子量のタンパク質であったことから、15 KDa のタンパク質は、*Sarcocystis* 属に共通して含まれる毒性タンパク質である可能性がある。

平成 22 年度の食品検査事業からは、有症事例患者喫食馬肉中には *S. fayeri* シストが大量に含まれること、一般流通していて喫食に支障のない馬肉にも同シストが寄生していることが報告されている。

本分担研究の目的は、*S. fayeri* シストの病原性を、動物実験によって明らかにすることにある。シストを含んでいる馬肉の病原性を制御する方策を勘案する。シストが含有する分子量 15 KDa の毒性タンパク質の生化学的分析を行うことにある。

本分担研究では以下を実施した。

1 : *S. fayeri* シストのウサギ腸管ループ試

験による腸管病原性解析

2 : 馬肉の冷凍処理によるシスト (ブラディゾイト) 失活の条件検討

3 : 15 KDa タンパク質のアミノ酸分析と生化学的性状解析

## B. 実験方法

1 *S. fayeri* シストのウサギ腸管ループ試験による腸管病原性解析

### 1) 試験材料

熊本県保健環境研究所に 40℃ で保管中の有症事例由来の馬肉を試験に用いた。馬肉は後日組織標本を検鏡し、平方センチメートルあたりのシスト数を確認した。

検体 10 g に Phosphate buffered saline (以下 PBS) 15 ml を加え、5 分間ホモジナイズした。3,000 rpm、20 分間遠心後、上清を試験用原液とした。原液は PBS で希釈した。別の実験では遠心上清 (原液) を 0.45 μm のフィルターでろ過し、可溶性成分のみとして実験に供した。陰性コントロールとして、市販の馬肉 ((株) フジチク、(株) 千興ファーム) で、後日シストを含まないことを確認したのを用いた。ホモジナイズ処理は同様に行った。PBS もコントロールとして検体と同時に投与した。

タンパク質分解酵素の作用をみるため、馬肉抽出物に対してペプシン処理を行った。ホモジネート遠心上清のろ液に、2% になるようにペプシン粉末を加え、塩酸を用いて pH 2.0 に調整、37℃ にて 60 分反応させた。その後 1 N 水酸化ナトリウム溶液を pH が 7.0 となるように添加し、ペプシン処理試験材料とした。

別の馬肉からシストを取り出し、人工胃液で

シスト壁を壊してブラディゾイトを遊出させ、遠心にて回収し、試験材料とした。

## 2) ウサギ腸管ループ試験手技

ウサギ（日本在来種、オス、約 1.5 Kg、日本 SLC）をペントバルビタール麻酔下で開腹し、空腸を体外に取り出した。6~10 cm のループとなるように腸管を結紮した。上述の試験材料を各 1 ml、ループ内に接種した。ウサギの腹壁を閉じ、18 時間後、麻酔液の過剰投与で殺処分して腸管を取り出した。写真撮影後貯留している内容物の有無とその量を計測した。

## 2 馬肉の冷凍処理によるシスト（ブラディゾイト）失活の条件検討

### 1) シスト含有馬肉の冷凍処理

シストが含まれていることを実体顕微鏡で確認した馬肉（(株)フジチク、(株)千興ファーム）を、5 × 5 × 5 cm (125 g) の大きさに切り出し、フリージングバック内に入れ、-20、-30、-35、-40、-60℃の冷凍庫内に設置した。また、急速冷凍装置内に設置し、-30℃に冷却した。それぞれの冷凍条件の馬肉に温度センサーを装着し、中心温度が目的温度まで冷却されたことを確認後、6~48 時間保持した。経時的に馬肉を取り出し流水で解凍後、シストを取り出した。

### 2) 冷凍処理の効果判定

予め人工胃液（2%ペプシンを含んだ pH 2.0 の溶液）1 ml を入れたマイクロチューブ内にシストを懸濁した。その後 15 分間 37℃で保温した。反応液を顕微鏡下で観察し、ブラディゾ

イトが検出されるかどうか確認した。

### 3) シスト由来 15 KDa タンパク質への冷凍効果の影響

冷凍処理前後のシストについて、PBS に懸濁後凍結融解を 5 回繰り返した。15,000 rpm、10 分の遠心後上清を回収した。常法に従い上清を SDS-電気泳動し、その後ウエスタンブロット法を用いて 15 KDa タンパク質の存在の有無を調べた。ウエスタンブロット法を行う際に用いる抗体は、シスト抽出タンパク質からゲルろ過法によって精製した 15 KDa タンパク質で、ウサギを免疫することによって調製した。

## 3 15 KDa タンパク質のアミノ酸分析と生化学的性状解析

### 1) アミノ酸配列分析のためのサンプル調製

シスト抽出タンパク質からの 15 KDa タンパク質のゲルろ過による精製法については、平成 21 年度の食品検査事業で報告した。

### 2) N 末端アミノ酸配列の決定法

15 KDa タンパク質を含む画分を SDS-電気泳動した。クーマシーブルーでアクリルアミドゲルを染色した後、分子量が 15 KDa を示すバンドを 6 レーン分切り出し、マイクロチューブ内に冷凍保存し、受託会社（(株)アプロサイエンス）に送付した。

ゲルからタンパク質を抽出後、エドマン分解の後、PTH 標識が行われた。HPLC による PTH アミノ酸の同定がなされた。

### 3) 内部アミノ酸配列の決定法

15 KDa タンパク質を含むフラクションを SDS-電気泳動後、ブロッティング装置を用いて、常法に従い PVDF 膜に転写した。クーマ

シーブルー染色の後、分子量が 15 KDa を示すバンド 2 レーンを切り取り、マイクロチューブ内に冷凍で保存し、アミノ酸配列分析受託会社に送付した。

15 KDa タンパク質が吸着した PVDF 膜断片および、陰性コントロールとしてタンパク質が吸着していない PVDF 膜断片に対してトリプシン分解を行った。逆相 HPLC にトリプシン分解物を添加し、ペプチドの分離を行った。分画を 210 nm の吸光値で追跡しながら、陰性コントロールには検出されず、15 KDa タンパク質検体のみに認められるペプチドピーク 2 本について、アミノ酸配列を決定した。

決定されたアミノ酸配列について、Blast 検索を行い、相同性を示すタンパク質を検索した。

### C. 結果および考察

#### 1 *S. fayeri* を含んだ馬肉、および *S. fayeri* の腸管病原性

##### 1) 実験 1

*S. fayeri* のシストを含んだ馬肉ホモジネート、およびその可溶性成分のみとしたホモジネートろ液について、ウサギにおける腸管ループテストを行った。

図 1A は、ホモジネートしたシストを含んだ馬肉を示す。顕微鏡検査で、この検体は 420 シスト/cm<sup>2</sup> の *S. fayeri* 寄生数を示した。図 1B は、ループ内に接種後 18 時間の腸管を示す。

接種検体とループ内に貯留した液体量の関係を以下に示す。

ループ No.

1 : 馬肉ホモジネート 2.4 ml

2 : 馬肉ホモジネートろ液 2.5 ml  
3 : ループ No. 2 の 2 倍希釈物 0 ml  
4 : ループ No. 2 の 4 倍希釈物 0 ml  
5 : PBS 0 ml

以上の結果は、馬肉ホモジネートおよびその可溶性画分であるろ液に、腸管毒性が認められることを示す。その毒性はホモジネート原液にのみ保持されていた。

##### 2) 実験 2

*S. fayeri* シストの有無による馬肉の腸管毒性の比較と、ホモジネート調製中に出現する脂肪分の、腸管毒性を検討した。図 2A は、ループ No. 4 に接種したシスト含有馬肉を示す。図 2B は投与の結果の腸管を示す。

接種検体とループ内に貯留した液体量の関係を以下に示す。

ループ No.

1 : シスト不含馬肉ホモジネート 0 ml  
2 : 330 シスト/cm<sup>2</sup> の馬肉ホモジネート 8.0 ml  
3 : ループ No. 1 とは別ロットのシスト不含馬肉ホモジネート 0 ml  
4 : 210 シスト/cm<sup>2</sup> の馬肉ホモジネート 8.0 ml  
5 : PBS 0 ml  
6 : 脂肪分 0 ml

以上の結果は、腸管ループ反応は馬肉の影響を受けず、馬肉中にシストが存在するときに腸管毒性を示すことを証明している。ホモジネート調製中に出現する油分も腸管ループ反応に影響しないことを示している。

##### 3) 実験 3



馬肉ホモジネートへのペプシン処理の、腸管毒性への影響を調べた。また、シストに含まれるブラディゾイトに毒性があるかを検討した。

シスト数 209/cm<sup>2</sup>の馬肉からホモジネートを調製し、そのろ液に対してペプシン処理を行った。ループへの接種後 18 時間の腸管を図 3 に示す。

接種検体とループ内に貯留した液体量の関係を以下に示す。

ループ No.

1 : 馬肉ホモジネートル液	8.0 ml
2 : ループ No. 1 のペプシン処理物	0 ml
3 : ループ No. 1 の 2 倍希釈物	0.4 ml
4 : ループ No. 2 の 2 倍希釈物	0 ml
5 : PBS	0 ml
6 : 150 万ブラディゾイト	11 ml

以上の結果は、シスト中に含まれるペプシン感受性のタンパク質によって、ウサギ腸管毒性が担われていること、その毒性はシストの中に含まれるブラディゾイトに起因する可能性があることを示している。

#### 4) 接種ループの病理組織像

図 4 にシストを含んだ馬肉のホモジネートを接種されたループの病理組織図を示す (図 4A, B)。対象に PBS を接種したループの病理像を示す (図 4C)。シストを含んだ馬肉ホモジネートを接種されたループでは、腸管腔内に蓄積された分泌物が顕著であるとともに、分泌物中には壊死した細胞の断片が沢山認められた。腸管上皮細胞は剥離脱落し、腸絨毛が短くなっていた。筋層から漿膜にかけて水腫性病変が観察された。一方、PBS 接種ループでは病変は見ら

れなかった。

以上の実験から、*S. fayeri* のシストが馬肉に存在する場合、腸管毒性が観察され、毒性成分はシスト内のブラディゾイトが保有し、かつ、タンパク質性の物質であることが考えられた。

#### 2 冷凍処理による *S. fayeri* の安定性への影響

住肉胞子虫の生活還に関する研究から、シストがペプシンや酸に耐性を示し、胃を通解して腸に達した後、ブラディゾイトを放出することが分かっている<sup>3)</sup>。冷凍処理によってシスト壁に障害を与えることが出来た場合、胃内でシストおよびブラディゾイトの失活を誘導できる可能性がある。

#### 1) ブラディゾイトへの人工胃液処理時間の検討

予備試験として -20°C で 24 時間保持したシストと、非冷凍処理のシストについて、人工胃液によるブラディゾイトの安定性を調べた。結果を表 1 に示す。馬肉を購入後、冷蔵状態で保存し、シストを摘出して人工胃液処理した場合、60 分の処理時間でもブラディゾイトは確認された。一方、-20°C 処理した馬肉からシストを調製した場合には、人工胃液処理時間が長くなるにつれて、ブラディゾイトが確認できなくなった。この結果は、冷凍処理がシスト壁を障害し、ペプシンを含んだ人工胃液の作用を受けやすくなり、胃液の作用がブラディゾイトまで及んだと考えられる。以後、種々の冷凍条件を試みる際、シストへの効果を判ずるに、人工胃液処理 15 分でブラディゾイトが確認されない時に、冷凍処理の効果が認められたとする判断基

準を設けた。

## 2) 各種の冷凍条件の *S. fayeri* シスト/ブラディゾイトへの影響

馬肉片の中心温度が目的の温度に達して、一定時間保持した後、シストを分離して人工胃液処理した。その後顕微鏡下でブラディゾイトの有無を確認した。表2にその結果を示す。各条件で、15分の人工胃液処理を施してある。-20℃および-30℃では、ブラディゾイトの殺滅に48時間の保持時間を必要とした。35℃までは24時間、-40℃では18時間、-60℃では12時間と、冷凍温度が低下するにつれ、ブラディゾイト殺滅に要する保持時間は短くなった。液体窒素中では僅かに1時間でブラディゾイトは消失した。

## 3) 冷凍処理の15 KDa タンパク質への影響

冷蔵で保存していた馬肉から抽出したシストおよび、40℃にて18時間冷凍処理した馬肉から抽出したシストから、タンパク質を抽出し、SDS-電気泳動後、抗15 KDa タンパク質抗体で染色し、15 KDa タンパク質の存在を確認した。冷蔵保存状態では60分の人工胃液処理でも15 KDa タンパク質は明瞭に存在したが、-40℃18時間処理すると、15分の人工胃液処理によって15 KDa タンパク質は消失した(図5)。この結果は、ブラディゾイトが消失する冷凍条件では、毒性を担う15 KDa タンパク質も消失し、馬肉中の毒性成分が失活することを示唆している。

## 3 15 KDa タンパク質のアミノ酸分析と生化学的性状

### 1) 15 KDa タンパク質のN末端アミノ酸配列解析

N末端より10残基(10サイクル)の特定を試みた。各サイクルで微量のアミノ酸は検出されたが、ピークの信頼性からアミノ酸の特定にはいたらなかった。分析に供したタンパク質量から推察すると、検出されるアミノ酸が少ないことから、N末端アミノ酸が修飾されていて、エドマン分解できず、従ってアミノ酸が検出されない可能性が考えられた。

### 2) 内部アミノ酸配列解析

PVDF膜に転写した15 KDa タンパク質をトリプシン消化し、生じたペプチド断片を逆相HPLCで分析した。その結果、対象にはない2つのピーク、Fraction No. 27と54を同定した(図6)。2つのピークをエドマン分解後、PTH標識して、HPLCで標識アミノ酸を同定、それぞれのアミノ酸配列を決定した。

Fraction No. 27のアミノ酸配列は、Ile-Gln-Glu-Thr-Glu-Ile-Val-Val-Glu-Lysだった。アミノ酸を1文字表記すると、IQETEIVVEKとなる。Fraction No. 54は、Arg-Leu-Asp-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ala-Leu-Glu-Ala-His-Asp-Leu-Ser-Asp-Phe-Glu-Thrで、1文字表記ではRLDGVAALALEAHDLSDFETとなる。

### 3) 相同性の検索

決定した内部2カ所のアミノ酸配列について、データベースをBlast検索し、相同性のあるタンパク質を調査した。その結果、Fraction No. 27および54はともに*Toxoplasma gondii*および*Eimeria tenella*という原虫が有する

Actin depolymerizing factor (以下 ADF) と同一性を持っていた。

図 7 にそれらのアミノ酸配列のアラインメント比較を示す。Fraction No. 27 は 10 アミノ酸残基中 6 アミノ酸が一致した。Fraction No. 54 は 20 アミノ酸残基中 8 アミノ酸が一致した。

細胞内アクチンは、重合し多量体となり、Actin filament として細胞骨格を形成する。細胞膜の裏打ち構造となり、寄生虫を含めた有核細胞の形態を構成する基本構造である。単量体アクチンは、Globular actin と称される。G-actin が重合した Actin filament から Actin 分子を解離させる、すなわち G-actin 化させる働きを ADF は持っている。ADF は *Toxoplasma* や *Eimeria* においては、宿主細胞に虫体が侵入する際の形態変化に関与するとされている<sup>5,6)</sup>。両者の ADF が食中毒症状を誘発する毒性や、ウサギにおける致死活性、腸管毒性を持つかどうかは報告がない。

馬肉が共通食となっている食中毒の原因は、*Sarcocystis fayeri* である可能性が高い。患者喫食馬肉には、シストが多量に含まれている<sup>1)</sup>。シスト含有馬肉抽出物およびシスト内に含まれるブラディゾイトに腸管毒性が認められた。その毒性を発揮する物質はタンパク質だと推定される。馬肉を共通食とする事例の潜伏期が短いことは特徴の一つになっていて、毒素性物質の関与が推察されている。*S. fayeri* シスト中の 15 KDa タンパク質が、ウサギで全身性の毒性と腸管毒性を持つことは既に明らかにした<sup>1)</sup>。内部アミノ酸配列分析から、15 KDa タンパク質が、原虫が保有するタンパク質に同一性があることも明らかになった。今後同タンパク質の遺伝子をクローニングし、また、組換

え体を作製する。ウサギによる試験を行い、同組換えタンパク質に毒性が認められれば、生鮮馬肉の生食を共通項目とした原因不明食中毒の、原因の一端を究明できる。

#### D. 結論

馬肉を共通食とし、その生食によって起きる食中毒の原因は、住肉胞子虫の 1 種、*Sarcocystis fayeri* の可能性が高い。根拠としては、患者喫食馬肉中に同住肉胞子虫の寄生の多いこと、シスト含有の馬肉ホモジネート、およびシスト内に含まれるブラディゾイトが腸管に認められること、シストに含まれる毒性タンパク質が同定できつつあることである。シストを含んだ馬肉を一定温度以下の冷凍処理で特定の時間保持すると、毒性を担うと想定されているブラディゾイトが死滅し、馬肉の危害性を制御できることが、今後、毒性タンパク質の分析が進むことにより馬肉中の病因物質を確定できる可能性がある。

#### E. 健康危害情報

無し。

#### F. 文献

- 1) 平成 21 年度食品検査事業 「生鮮馬肉中の食中毒病因物質究明に関する調査研究」
- 2) 斉藤守弘、住肉胞子虫および住肉胞子虫症、日獣会誌、42:383-388 (1989)
- 3) Fayer, R., *Sarcocystis* spp. in human infection, *Clin. Microbiol. Reviews*, 17:894-902 (2004)
- 4) Saito M., Taguchi, K., Shibata, Y., Kobayashi, T., Shimura, K., Itagaki, H.,

Toxicity and properties of the extract from *Sarcocystis cruzi* cyst, J. Vet. Med. Sci. 57:1049-1051 (1995)

- 5) Allen, M.L., Dobrowolski, J.M., Muller, H., Sibley, J.D., Mansour, T.E., Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*, Mol. Biochem. Parasitol 88:43-52 (1997)
- 6) Xu, J.H., Qin, Z.H., Liao, Y.S., Xie, M.Q., Li, A.X., Cai, J.P., Characterization and expression of an actin-depolymerizing factor from *Eimeria tenella*. Parasitol. Res. 103:263-270 (2008)

G. 研究発表

シンポジウム発表

無し。

H. 学会発表

無し。

I. 知的所有権の取得状況

無し。

1) 特許取得

無し。

2) 実用新案取得

無し。

3) その他

無し。