

表2. 山口市内で市販魚に検出した粘液胞子虫シスト\*

寄生虫種	宿主	収集日	漁獲地	計測に用いたシスト数	長さ	幅
<i>Kudoa iwatai</i>	スズキ	23.May.08	山口県防府沖(瀬戸内海)	11	1.5±0.1 (1.4-1.7)	1.3±0.1 (1.1-1.6)
<i>Kudoa iwatai</i>	( <i>Lateolabrax japonicus</i> )	8.Dec.08	山口県防府沖(瀬戸内海)	5	1.7±0.2 (1.4-2.0)	1.2±0.2 (0.9-1.4)
<i>Kudou iwutai</i>		10.Dec.08	山口県防府沖(瀬戸内海)	7	1.8±0.7 (1.0-2.8)	1.1±0.3 (0.7-1.4)
<i>Kudoa iwatai</i>	クロダイ	29.Aug.08	山口県防府沖(瀬戸内海)	8	1.3±0.2 (1.0-1.7)	1.0±0.2 (0.6-1.3)
<i>Kudoa iwatai</i>	( <i>Acanthopagrus schlegelii</i> )	1.Dec.08	山口県防府沖(瀬戸内海)	14	0.8±0.2 (0.5-1.2)	0.6±0.1 (0.3-0.8)
<i>Kudou iwutai</i>	ボラ ( <i>Mugil cephalus</i> )	5.Apr.11	山口県防府沖(瀬戸内海)	9	0.75-2.25 (1.64±0.47)	0.65-1.33 (1.07±0.21)
<i>Kudoa trachuri</i>	マアジ	11.Sep.08	長崎県長崎沖(日本海)	3	1.6±0.1 (1.5-1.6)	0.9±0.2 (0.6-1.1)
<i>Kudoa trachuri</i>	( <i>Trachurus japonicus</i> )	4.Dec.08	長崎県長崎沖(日本海)	8	0.7±0.2 (0.5-1.1)	0.4±0.1 (0.3-0.6)
<i>Kudoa trachuri</i>		6.Feb.11	島根県沖(日本海)	-	NE	NE
<i>Kudou trachuri</i>		5.Mar.11	長崎県長崎沖(日本海)	-	NE	NE
<i>Kudoa trachuri</i>		10.Mar.11	長崎県長崎沖(日本海)	19	0.38-1.00 (0.56±0.14)	0.25-0.45 (0.32±0.06)
<i>Kudoa trachuri</i>		30.Mar.11	長崎県長崎沖(日本海)	4	0.65-1.65 (1.11±0.42)	0.50-0.70 (0.58±0.10)
<i>Kudoa trachuri</i>		24.Apr.11	山口県仙崎沖(日本海)	NE	NE	NE
<i>Kudoa thunni</i>	ピンチョウマグロ ( <i>Thunnus alalunga</i> )	3.Oct.08	太平洋	14	1.5±0.2 (1.3-2.0)	1.2±0.1 (1.1-1.4)
<i>Kudou thunni</i>	キハダマグロ ( <i>Thunnus albacares</i> )	31.Mar.11	太平洋	13	0.85-1.25 (1.04±0.11)	0.75-1.18 (0.89±0.14)
<i>Kudoa</i> sp. from <i>Scomber japonicus</i>	マサバ ( <i>Scomber japonicus</i> )	12.Feb.11	長崎県長崎沖(日本海)	7	0.30-0.75 (0.49±0.15)	0.20-0.40 (0.26±0.07)
<i>Heneguyia ogawai</i>	クロダイ ( <i>Acanthopagrus schlegelii</i> )	12.Jul.11	山口県防府沖(瀬戸内海)	NE	0.78 / 0.66	0.58 / 0.66
		15.Jul.11	山口県防府沖(瀬戸内海)	2	0.78 / 0.38	0.32 / 0.20
<i>Heneguyia yokoyamai</i>	クロダイ ( <i>Acanthopagrus schlegelii</i> )	15.Jul.11	山口県防府沖(瀬戸内海)	5	0.22-0.71 (0.42±0.19)	0.17-0.57 (0.28±0.17)
<i>Myxobolus machidai</i>	イシガキダイ ( <i>Oplegnathus punctatus</i> )	5.Oct.11	山口県下関沖(日本海)	4	0.16-0.30 (0.22)	0.13-0.28 (0.19)

\* 計測値はmmで示す。括弧内は平均±標準偏差。

表3. 粘液胞子虫の18S rDNA/28S rDNAの増幅とシーケンスに用いたプライマー一覧

増幅断片 番号	プライマー名 <sup>a</sup>		塩基配列	アニーリング 温度	5'末端 塩基位置 <sup>b</sup>
	増幅用	シーケンス用			
1	F: NSF4/18		5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	64°C	4
	R: KUDOA-SSU926R		5'-AAACACTCTTGGCGAATGCT-3'		933
2	F: NSF573/19	R: NSR581/18	5'-TCTCAGGCTCCCTCTCCGG-3'	64°C	382
	R: S.r.18S-SSU18R		5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCA-3'		555
3	F: NSF1419/20	F: NSF1419/20	5'-TGATCCTTCYGCAGGTTAC-3'	62°C	1,740
	R: Kudoa-28S-113R		5'-ATAACAGGTCTGTGATGCCC-3'		1,380
4	F: NSF1419/20	NC13R(ITS2)/F	5'-ATAACAGGTCTGTGATGCCC-3'	62°C	1,380
	R: Kudoa-28S-275R	NC13R(ITS1)/R	5'-TCCGGGAAGATTAAACGATG-3'		3,263
5	F: KUDOA-Kt28S1F		5'-ATCGATGAAGAACGCAGC-3'	62°C	2,482
	R: KUDOA-28S-795R		5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'		2,499
6	F: NSF1419/20		(see above)	62°C	1,380
	R: Kudoa-28S-275R		5'-AGGTTGCAGTCCCAAACAAC-3'		3,429
7	F: KUDOA-Kt28S1F	NC13R(ITS2)/F	(see above)	62°C	2,482
	R: NLR2362/20	NC13R(ITS1)/R	(see above)		2,499
8	F: KUDOA-Kt28S1F		5'-CAAGACTACCCTGCTGAAC-3'	62°C	3,150
	R: NLF3090/24		5'-CTGTSTTTCAAGACGKGTGCG-3'		3,927
9	F: KUDOA-Kt28S1F		(see above)	64°C	3,150
	R: Mbseq2r		5'-ACATTGAGCACTGGGCAG-3'		5,641
10	F: NLF3090/24	F: Kudoa28S-260F	5'-TTGGGATTGCAACCTAAAGC-3'	64°C	3,415
	R: Mbseq2r	F: NLF1999/19	5'-CCGCAKCAAGTCTCCAAG-3'		5,191
11	F: NLF3090/24	R: 28S-1284R	5'-GTTGATTCGGCAGGTGAGTT-3'	64°C	4,566
	R: Mbseq2r	R: 28S-2132R	5'-AGAGGCTGTTACCTTGGAG-3'		5,221
12	F: NLF3090/24		5'-AGGGAACGTGAGCTGGGTTTAGAC-3'	62°C	-194
	R: Mbseq2r		5'-CCTTGGTGAGCCACTACCTC-3'		330

<sup>a</sup> 増幅用プライマーは"for amplifying"で示し、シーケンス用のみのプライマーを"for sequencing"で示した。

<sup>b</sup> *Kudoa neothurni* rDNA sequence (DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号AB693042)上でのプライマー5'末端の塩基位置。

表4. 宿主個体別の*Kudoa iwatai*孢子計測値\*

寄生虫名	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa iwatai</i>	<i>Kudoa lutjanus</i>
宿主名	<i>Lateolabrax japonicus</i>	<i>Lateolabrax japonicus</i>	<i>Lateolabrax japonicus</i>	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	<i>Pagrus major</i>	<i>Sparus aurata</i>	<i>Lutjanus erythropterus</i>
場所	瀬戸内	瀬戸内	瀬戸内	瀬戸内	瀬戸内	日本	紅海	台湾南部(養殖)
収集日	23.May.08	8.Dec.08	10.Dec.08	29.Aug.08	1.Dec.08	-	-	24.Dec.03
参考文献	Matsukane et al. (2011) <sup>38)</sup>	Matsukane et al. (2011) <sup>38)</sup>	Matsukane et al. (2011) <sup>38)</sup>	Matsukane et al. (2011) <sup>38)</sup>	Matsukane et al. (2011) <sup>38)</sup>	Diamant et al. (2005) <sup>46)</sup>	Diamant et al. (2005) <sup>46)</sup>	Wang et al. (2005) <sup>49)</sup>
孢子検査数	20	20	20	20	20	30	30	100
孢子幅	9.2-10.6 (10.1)	9.3-11.1 (10.7)	10.0-11.6 (10.7)	8.8-9.9 (9.5)	9.6-10.8 (10.4)	9.0-11.0 (10.2)	9.5-10.8 (10.1)	-
孢子厚	8.7-10.3 (9.3)	7.9-10.7 (9.7)	8.7-10.0 (9.5)	7.4-9.0 (8.1)	9.0-10.4 (9.7)	9.0-10.0 (9.7)	9.0-9.7 (9.2)	7.4-9.2 (8.2)
孢子長	7.3-8.9 (8.2)	8.0-8.6 (8.4)	7.8-8.7 (8.3)	6.6-8.1 (7.3)	8.3-9.2 (8.5)	7.2-8.4 (7.8)	8.3-9.4 (8.7)	6.3-7.9 (7.3)
極囊長	3.7-5.0 (4.3)	4.1-4.7 (4.5)	4.2-4.8 (4.5)	3.7-4.6 (4.2)	4.6-5.4 (5.1)	4.0-5.5 (4.7)	4.3-5.2 (4.8)	3.0-4.2 (3.6)
極囊幅	1.5-2.1 (1.9)	2.1-2.7 (2.3)	2.1-2.7 (2.4)	2.1-2.9 (2.2)	2.1-2.4 (2.2)	1.8-2.4 (2.1)	2.2-2.8 (2.4)	1.5-2.6 (2.2)

\* 計測値は μmで示す。括弧内は平均±標準偏差。

表5. 頂面像で四角もしくは亜四角の胞子をもつ*Kudoa* spp. の計測値比較

寄生虫名	<i>Kudoa trachuri</i>	<i>Kudoa trachuri</i>	<i>Kudoa thunni</i>	<i>Kudoa</i> sp.	<i>Kudoa crumena</i>	<i>Kudoa nova</i>	<i>Kudoa clapeidae</i>	<i>Kudoa leiostomi</i>
宿主名	<i>Trachurus japonicus</i>	<i>Trachurus japonicus</i>	<i>Thunnus alalunga</i>	<i>Trachurus trachurus</i>	<i>Scorberomorus maculatus</i>	<i>Trachurus trachurus</i>	<i>Brevoortia tyrannus</i>	<i>Leiostomus xanthurus</i>
シスト形状	Lilipsoidal cysts between myofibers	Lilipsoidal cysts between myofibers	Ovoid cysts between myofibers	—	Lilipsoidal cysts between myofibers	Pseudoecyst in a myofiber	Pseudoecyst in a myofiber	Pseudoecyst in a myofiber
場所	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Pacific Ocean	Atlantic Ocean off Portugal	Miami, Florida	Atlantic Sea off North African coast	Beaufort, North Carolina	Gulf of Mexico
収集日	11-Sep-08	4-Dec-08	3-Oct-08	Oct-98 - Aug-99		(Jan-01)		(Apr to Jul-90)
参考文献	Matsukane et al. (2011) <sup>36</sup>	Matsukane et al. (2011) <sup>36</sup>	Matsukane et al. (2011) <sup>36</sup>	Cruz et al. (2003) <sup>25</sup>	Iversen & Van Meter (1967) <sup>29</sup>	Campbell (2005) <sup>39</sup>	Reimschuessel et al. (2003) <sup>40</sup>	Dyková et al. (1994) <sup>49</sup>
胞子検査数	20	20	20	30	10	30	10	—
胞子幅	7.0-8.5 (7.9)	5.9-6.8 (6.3)	9.2-9.9 (9.5)	5.0-8.5 (6.5)	9.3-10.4 (9.9)	5.1-7.7 (6.2)	6.5 (6.5)	8.0-9.8 (9.1)
胞子厚	5.3-6.2 (5.8)	4.5-5.6 (5.1)	7.7-9.0 (8.3)	4.0-7.5 (5.4)	8.2-9.7 (9.0)	—	5.5-6.5 (6.0)	5.8-7.0 (6.5)
胞子長	5.5-6.9 (6.1)	6.7-7.5 (7.0)	6.4-6.6 (6.5)	4.0-7.0 (5.5)	6.8-8.2 (7.5)	5.1-7.7 (6.2)	5.0-5.5 (5.25)	6.8
極嚢長	2.6-3.5 (2.9)	2.2-2.9 (2.7)	2.2-2.9 (2.5)	1.5-3.0 (2.1)	3.2-4.6 (4.0)	1.3-2.6 (1.8)	1.3-1.5 (1.4)	3.3
極嚢幅	1.6-2.2 (2.0)	1.7-2.2 (2.0)	1.9-2.2 (2.1)	1.0-2.0 (1.4)	2.1-2.9 (2.5)	—	1.0 (1.0)	1.7
胞子頂面像	Subquadrate	Subquadrate	Subquadrate	Round	Subquadrate	Subquadrate	Quadrate	Subquadrate
胞子側面像	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Round	Pouch shaped with truncated apex	Pouch shaped with truncated apex	Ovoid	Round or slightly ellipsoidal
殻片上の構造物	None	None	None	—	None	None	Slightly uplifted antero-lateral tips of the valve	None
極嚢形状	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Oval	Elongated, drop-like	Drop-like	Elongated, drop-like	Elongated, drop-like

\* 計測値はmmで示す。括弧内は平均±標準偏差。

表6. 異なる産地から得られた*Kudoa iwatai* と*Kudoa lutjanus*の18S rDNA塩基配列の比較

種名	分離株名	宿主	漁獲場所	DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号	参考文献	比較した塩基 位置 <sup>a</sup>	塩基位置 <sup>a</sup>				
							610	739	795	1031	1443
<i>Kudoa iwatai</i>	NSMT: Pr262	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Japan (Japan's Inland Sea)	AB553294	Matsukane et al. (2011) <sup>30)</sup>	1 – 1,694	G	A	G	T	G
<i>Kudoa iwatai</i>	NSMT: Pr263	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Japan (Japan's Inland Sea)	AB553295	Matsukane et al. (2011) <sup>30)</sup>	1 – 1,694	.	.	.	.	.
<i>Kudoa iwatai</i>	NSMT: Pr268	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Japan (Japan's Inland Sea)	AB553296	Matsukane et al. (2011) <sup>30)</sup>	1 – 1,694	.	.	.	.	.
<i>Kudoa iwatai</i>	NSMT: Pr269	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Japan (Japan's Inland Sea)	AB553297	Matsukane et al. (2011) <sup>30)</sup>	1 – 1,694	.	.	.	.	.
<i>Kudoa iwatai</i>	NSMT: Pr270	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Japan (Japan's Inland Sea)	AB553298	Matsukane et al. (2011) <sup>30)</sup>	1 – 1,694	.	.	.	.	.
<i>Kudoa iwatai</i>	J	<i>Pagrus major</i>	Japan (Japan's Inland Sea)	AY641571	Diamant et al. (2005)	1 – 1,560	.	.	.	.	.
<i>Kudoa iwatai</i>	RS1	<i>Sparus aurata</i>	Israel (Red Sea Gulf of Eilat)	AY514038	Diamant et al. (2005)	1 – 1,560	.	.	A	C	A
<i>Kudoa iwatai</i>	RS2	<i>Siganus rivulatus</i>	Israel (Red Sea Gulf of Eilat)	AY514039	Diamant et al. (2005)	1 – 1,560	.	.	A	C	A
<i>Kudoa lutjanus</i>	SCC93020M	<i>Lutjanus erythropterus</i>	South Taiwan (fish farm)	AY644702	Wang et al. (2005)	306 – 1,134	A	C	.	C	
<i>Kudoa lutjanus</i>	SCC93028B	<i>Lutjanus erythropterus</i>	South Taiwan (fish farm)	AY644703	Wang et al. (2005)	306 – 1,134	A	C	.	C	
<i>Kudoa lutjanus</i>	SCC93028M	<i>Lutjanus erythropterus</i>	South Taiwan (fish farm)	AY644704	Wang et al. (2005)	306 – 1,134	A	C	.	C	

<sup>a</sup>塩基位置は、*K. iwatai* 18S rDNA (DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 AB553294)塩基配列上の相対位置で示す。空欄はデータがないことを示す。

表7. フィリピン国ミンダナオ島Mati市の生鮮市場で購入した材料一覧

魚番号と魚種	検査数
1. Reef Needle Fish ( <i>Strongylura leiura</i> )	4
2. Needle Fishes ( <i>Hemirhamphus</i> sp.)	39
3. Mackerel Scad ( <i>Decapterus</i> sp.)	15
4. Mackerels ( <i>Auxis rochei</i> or <i>Auxis thazard</i> )	12
5. Milk Fish ( <i>Chanos chanos</i> )	14
6. Big-eyed Scad ( <i>Selar boops</i> )	23
7. Squirrelfishes-Holocentridae ( <i>Sargocentron</i> sp.)	10
8. Flying fish ( <i>Cheilopogon</i> sp.)	20
9. Rabbitfishes - Siganidae ( <i>Siganus</i> sp.)	23
10. Parrot fishes ( <i>Scarus</i> sp.)	7
11. Yellow fin ( <i>Thunnus albacares</i> )	6
12. Tilapia ( <i>Tilapia nilotica</i> )	12
13. Flying fish ( <i>Cheilopogon</i> sp.)	27
14. Mackerel Scad ( <i>Decapterus</i> sp.)	12

表8. 筋線維内にシュードシスト形成する6ヶの殻片／極嚢をもつクダア粘液胞子虫の計測値の比較

種名	<i>K. neohunni</i>	<i>K. neohunni</i>	<i>K. grammatorcyni</i>	<i>K. scomberomori</i>	<i>K. thalassomi</i>	<i>K. septempunctata</i>
殻片／極嚢数	6	6	6	6	6 / 7 <sup>b</sup>	6 / 7 <sup>b</sup>
模式宿主	<i>Thunnus thynnus</i>	<i>Thunnus albacares</i>	<i>Grammatorcynus bicarinatus</i>	<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Thalassoma lunare</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>
魚類宿主死後の筋肉融解の有無	No	Yes	No	No	No	No
参考文献	本研究	Arai & Matsumoto (1953) <sup>a)</sup>	Adlard et al. (2005) <sup>a)</sup>	Adlard et al. (2005) <sup>a)</sup>	Adlard et al. (2005) <sup>a)</sup>	Matsukane et al. (2010) <sup>a)</sup>
胞子検査数	15	— <sup>c)</sup>	30	30	30	10
胞子幅	9.5-11.4 (10.6)	9.1-13.0 (11.0)	8.0-8.9 (8.6)	6.8-8.2 (7.6)	9.5-11.8 (10.7)	11.1-13.1 (11.8)
胞子厚	8.9-10.9 (9.7)	—	7.6-8.7 (8.1)	6.2-7.6 (6.8)	8.6-10.8 (9.4)	8.9-10.0 (9.4)
胞子縫合線部幅	7.3-8.6 (8.1)	5.9-8.7 (7.1)	7.2-8.2 (7.8)	5.3-6.3 (5.9)	6.8-8.8 (8.0)	—
胞子長	7.3-7.7 (7.6)	5.3-7.3 (6.2)	6.3-6.7 (6.5)	5.0-6.2 (5.4)	6.2-7.1 (6.7)	7.9-8.9 (8.5)
極嚢長	3.6-4.1 (3.8)	2.0-3.1 (2.5)	3.6-3.8 (3.7)	3.0-3.6 (3.2)	4.7-5.0 (4.9)	3.7-5.3 (4.6)
極嚢幅	1.8-2.3 (2.0)	1.3-2.1 (1.6)	1.6-1.8 (1.7)	1.3-1.5 (1.4)	2.0-2.2 (2.1)	2.2-2.8 (2.4)
胞子頂面像	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Irregularly radial
胞子側面像	Pyramidal	Pyramidal	Ovoid	Ovoid	Pyramidal	Pouch-shape
殻片上の構造物	None	None	None	None	Lateral projections	None
極嚢サイズの同一性	Not evident	Not evident	Not evident	Not evident	Not evident	Evident

<sup>a)</sup> 計測値はμmで示す。括弧内は平均。

<sup>b)</sup> 6つの殻片／極嚢をもつ胞子が優勢。Burger & Adlard (2011)<sup>7)</sup>参照。

<sup>c)</sup> 宿主個体により殻片／極嚢数は不定。例えば、26:74、33:67、60:40、66:34であった (Matsukane et al. 2010<sup>38)</sup>; 佐藤, 未公表)。

<sup>d)</sup> —, データなし。

分 担 研 究 報 告 書

獣肉中の食中毒危害物質の解析

鎌田 洋一



平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

### 分担研究報告書

#### 獣肉中の食中毒危害物質の解析

分担研究者 鎌田 洋一（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究者 入倉 大祐（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

協力研究者 斉藤 守弘（埼玉県食肉衛生検査センター 精密検査部）

協力研究者 田中 成幸（埼玉県食肉衛生検査センター 精密検査部）

協力研究者 新井 陽子（埼玉県食肉衛生検査センター 北部支所）

馬肉を共通食とする食中毒の原因を分析した過程から、住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* がその病原体であることを明らかにして来た。また、生鮮馬肉の生食で発生する食中毒症状、とくに下痢症状を誘発するのが、*S. fayeri* を構成している 15K Da タンパク質である可能性を示唆して来た。本研究では、部分アミノ酸配列を基に、同タンパク質遺伝子のクローニングを試みた。その結果、アミノ酸 118 残基をコードする 354 bp の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列を明らかにした。塩基配列の相同性から、*Sarcocystis* 属と同門の類縁寄生虫であるアイメリアならびにトキソプラズマのアクチン脱重合因子に相同性がみられた。同遺伝子から組換えタンパク質を作製した。組換え 15K Da タンパク質は、シスト由来の 15K Da タンパク質に対して作製された免疫抗体と反応し、免疫学的交差性が認められた。組換え 15K Da タンパク質の腸管毒性が実験的に証明された。以上の結果は、馬肉を喫食して発生する食中毒の直接的原因物質が、*S. fayeri* の持つ 15K Da タンパク質であることを立証するものである。

#### A. 研究目的

平成 24 年 8 月厚生労働省は、生鮮馬肉を喫食後、短い潜伏期で下痢、嘔吐、吐き気、腹痛、倦怠感を症状とする事例において、馬肉から住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* が検出された場合、食中毒として報告するよう、発出した。この発出の科学的根

拠は、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」<sup>1)</sup>、ならびに、平成 22 年度の厚生労働科学特別研究事業における「生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策」<sup>2)</sup> 研究の結果に基づいている。その科学的根拠は以

下に要約される。

- ・有症者は共通食として生鮮馬肉を喫食している。オッズ比および信頼限界値解析から、馬肉が共通食として疫学統計学的に有意である。
  - ・馬肉中に白色のシストとして、住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* を認めた。有症者が喫食した馬肉を検査すると、同胞子虫のシストが、1 cm<sup>2</sup> 当り 40 以上存在した。
  - ・一方、市販の馬肉には、シストは存在しないか、10 シスト/ cm<sup>2</sup> 未満の寄生が認められたに過ぎなかった。
  - ・多数のシストを含んだ馬肉の 10% ホモジネート物を、ウサギ腸管ループ内に投与すると、液体の貯留が認められた。一方、シストを含まない馬肉ホモジネートには同様の毒性を見出せなかった。
  - ・シスト中に存在するブラディゾイトを腸管ループ内に投与すると、液体貯留を引き起こした。
  - ・シストおよびブラディゾイトを構成するタンパク質群を分析したところ、分子量が 15K Da を示すタンパク質が、ウサギに致死毒性および腸管毒性を示した。
  - ・15K Da タンパク質の内部アミノ酸配列を調べたところ、コクシジウムおよびトキソプラズマに相同性のあるタンパク質遺伝子が存在した。同タンパク質はアクチン脱重合因子とされていた。同寄生虫は、動物や人に病原性を示す。
- 以上の解析結果は、15K Da タンパク質が

*Sarcocystis fayeri* を含む馬肉食中毒の本態であり、同タンパク質によって症状が直接的に誘発されている可能性を示している。本分担研究の目的は、以下に要約される。

- ・15K Da タンパク質の内部アミノ酸配列を手がかりに、分子生物学的手法を用いて、同タンパク質をコードする遺伝子を単離する。
- ・15K Da タンパク質の遺伝子構造を分析する。
- ・15K Da タンパク質の組換え体を作製する。その腸管毒性を証明する。

## B. 研究方法

### 1. *S. fayeri* 15K Da タンパク質遺伝子のクローニング

クローニングのステップの概要を表 1 に示す。

#### ステップ 1 : 試験材料、cDNA の作製

市販馬肉 ((株) 千興ファーム) よりシストを約 50 収集し、クローニングの出発材料とした。ISOGEN (ニッポンジーン) を用いてシストから Total RNA を抽出した。得られた Total RNA と RNA LA-PCR Kit Ver 1.1 (Takara) の Oligo-dT (20) を用いて cDNA を合成した。

#### ステップ 2 : degenerate プライマーの設計

2 カ所の内部アミノ酸配列を明らかにしている。トキソプラズマおよびアイメリアの相同性を示すタンパク質のアミノ酸配列を参考にすると、解析できた 10 アミノ産残基

<Ile-Gln-Glu-Thr-Glu-Ile-Val-Val- Glu-Lys>は N 末端側に、20 アミノ酸残基 <Arg-Leu-Asp-Gly-Val-Ala-Ala-Leu-Ala-Leu-Glu-Ala-His-Asp-Leu-Ser-Asp-Phe-Glu-Thr>は C 末端側に配置されていた。

各アミノ酸をコードする 3 塩基をコドン表から抽出し、複数の塩基配列となる場合にはイノシン酸を配置し、上記 2 カ所のペプチド部分に相当するオリゴ DNA を作製した (Operon)。

### ステップ 3 : 第 1 回遺伝子増幅

テンプレートにステップ 1 で合成した cDNA を用いた。Oligo-dT(20) をアンチセンスプライマーとして使い、センスプライマーには上記 10 アミノ酸ペプチド部分の degenerate プライマーを用いて、遺伝子増幅を行った。EX Taq (Takara) を用いて、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 30 回繰り返した。

### ステップ 4 : 第 2 回遺伝子増幅

テンプレートにステップ 3 の増幅物を用いた。センスプライマーには上記 10 アミノ酸ペプチド部分の degenerate プライマーを用い、アンチセンスプライマーには 20 アミノ酸ペプチド部分の degenerate プライマーを用いて、遺伝子増幅を行った。EX Taq (Takara) を用いて、94°C 30 秒、40°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 40 回繰り返した。

### ステップ 5 : 3' および 5' RACE

上記の nested PCR 産物の塩基配列を確認し、アイメリアおよびトキソプラズマのアクチン脱重合因子の塩基配列と相同性があることを確認した。

常法に従って、3' および 5' RACE を実施した。SMART RACE Amplification Kit を用いた。この操作によって、上記 nested PCR 産物の 5' 上流と、3' 下流の塩基配列が増幅された。

### ステップ 6、7、8 : クローニング

増幅物をクローニングベクター pGEM-Teasy に挿入した。常法に従い、大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換後、クローニング、プラスミドの増幅、挿入物のシーケンスを実施し、塩基配列を決定した。

### 2. クローニングした遺伝子の解析

塩基配列解析ソフトを用いて、タンパク質翻訳部分を決定した。同部分の塩基配列から、アミノ酸配列を推定した。タンパク質翻訳部分のアミノ酸配列全体について、その相同性を、タンパク質データベースを用いて検索した。

### 3. *S. fayeri* ゲノム中における 15K Da タンパク質遺伝子の構造

*S. fayeri* のシストからゲノム DNA を抽出した。抽出には Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits を用いた。15K Da タンパク質遺伝子の開始コドンから 24 bp のオリゴ

DNA をセンスプライマー、終止コドンから 24 bp のオリゴ DNA をアンチセンスプライマーとして PCR を行った。増幅されてくる DNA の大きさを推定し、ゲノム内での 15K Da タンパク質遺伝子の構造を分析した。

#### 4. 組換え 15K Da タンパク質の作製

15K Da タンパク質の cDNA を、PHAT10 ベクターに挿入した。同ベクターで大腸菌 BL21 を形質転換し、遺伝子導入させた。LB 培地を用い、15 K Da タンパク質遺伝子の挿入のあるプラスミドを持った大腸菌を 37°C で震盪培養した。対数増殖期初期に Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した (最終濃度 1 mM)。培養温度を 16°C とし、さらに 1 晩震盪培養を続けた。

遠心分離 (10,000 rpm 10 分) により、菌体を回収した。BugBuster Master Mix (Novagen) を用いて菌体を破壊、かつ、タンパク質を抽出した。TALON カラムを用いて、ニワトリ由来乳酸脱水素酵素内に存在するポリヒスチジンエピトープ (HAT) タグ融合組換え 15K Da タンパク質を精製した。タグと組換え 15K Da タンパク質の間のアミノ酸をエンテロキナーゼで切断した。反応物をゲルろ過し、組換えタンパク質部分のみ回収した。ゲルろ過のカラムは Superdex 200 10/300 で、GE ヘルスケアの ÄCTA を用いて組換え 15K Da タンパク質を精製した。

#### 5. 15K Da タンパク質のウサギ腸管ループ試験

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。組換え 15K Da タンパク質を 1 ml、ループ内に接種した。陰性コントロールとして生理食塩水を、陽性コントロールとして、別に調製した組み換えウエルシュ菌エンテロトキシンをループ内に注入した。ウサギの腹壁を閉じ、18 時間後、ウサギを麻酔死させ、ループを摘出した。

ループ内の液体貯留の有無を確認した。液体の貯留があった場合、液量を測定した。ループの長さを測定し、F/A 値 (液量 ml/ループ長 cm) を求めた。

#### C. 結果および考察

##### 1. *S. fayeri* 15K Da タンパク質のクローニング

Degenerate プライマーを用い、2 段階の遺伝子増幅法である Nested PCR 法を適応することにより、*S. fayeri* シスト由来 cDNA から、250 bp の遺伝子増幅産物を得た。塩基配列を読みとり、アイメリアおよびトキソプラズマのアクチン脱重合因子と相同性があることを確認した。その後、同配列を利用し、3' RACE 法および 5' RACE 法を適応、増幅物の上流および下流を増幅、クローニングしてその配列を決定した。その結果、約 1,000 bp の塩基配列を明らかにできた。その中には 1 つのタンパク質コーディングリージョンが含まれていた。開始コドンから終止コドンまで 354 bp を示した。同塩基配列からアミノ酸配列を推定した。

358 bp の遺伝子は 118 残基のアミノ酸をコードしていた。15K Da タンパク質の計算上の分子量は 13261 となった。

## 2. *S. fayeri* 15K Da タンパク質遺伝子の分子生物学的性状

358 bp の塩基配列について、BLAST による相同性検索を行った。その結果、*Eimeria tenella*<sup>3)</sup> および *Toxoplasma gondii*<sup>4)</sup> のアクチン脱重合因子遺伝子に相同性を認めた。この結果は、部分アミノ酸配列からの相同性検索を行った結果と一致した。アクチン脱重合因子は、寄生虫が動物細胞内に侵入する際、形態を動的に変化させている、その時に作動するとされている。同因子がヒトさらにはウサギに対して腸管病原性や致死毒性を持つこと等の報告は無い。

cDNA をテンプレートとし、15K Da タンパク質の開始コドンから 24 bp のオリゴ DNA、および終止コドンから 24bp のオリゴ DNA をプライマーにして PCR を行ったところ、350 bp 付近に遺伝子増幅が確認された。一方シストから抽出したゲノム DNA をテンプレートにした場合は、2,800 bp 付近に増幅バンドが出現した。cDNA より大きなサイズの遺伝子増幅があったことから、15K Da タンパク質遺伝子は、少なくとも 1 カ所のイントロンと 2 カ所のエクソンから構成されていると推定される。イントロンのサイズは 1,500 bp と計算された。15K Da タンパク質の分子生物学的性状を表 2 にまとめた。

## 3. 組換え 15K Da タンパク質の作製

クローニングした 15K Da タンパク質遺伝

子を、タンパク質発現用ベクターに組み込み、大腸菌を用いて、その組換え体を作製した。組換え体は HAT タグを N 末端側に融合させてあり、さらには、タグと 15K Da タンパク質の間に、エンテロキナーゼというタンパク質分解酵素で切断を受けるアミノ酸配列を配置してある。

IPTG 処理した大腸菌からタンパク質を抽出、TALON カラムを用いて、HAT 融合 15K Da 組換え体をアフィニティー精製した。大腸菌 1 L の培養液から、HAT 融合タンパク質は 10 mg 精製可能だった。HAT 融合 15K Da タンパク質をエンテロキナーゼ処理し、その後ゲルろ過法で、HAT タグおよびエンテロキナーゼを除去した。図 1 に HAT 融合 15K Da タンパク質の組換え体と、HAT タグを取り除いた組み換え体の SDS-電気泳動図を示す。精製組換え体は 14K Da の分子量を示す一本のバンドとして泳動された。本結果は、組換え体の精製が成功したことを示す。

報告者は、シストタンパク質群から精製した 15K Da タンパク質に対するウサギポリクローナル抗体を既に調製している。寄生虫由来の 15K Da タンパク質に対する抗体が、大腸菌で合成された 15K Da タンパク質と同様な抗原性をもつかどうか検討した。ウェスタンブロット法を用いて、抗体の反応性を検討したところ、同抗体はシスト由来タンパク質および組換え 15K Da タンパク質の双方に反応した (図 2)。

## 4. *S. fayeri* 15 KDa タンパク質の腸管病原

性

作製した組換え 15K Da タンパク質が、馬肉食中毒に見られる下痢という症状を説明できる毒性を持つか否か検討した。同タンパク質をウサギ腸管ループ内に投与し、ループ内に液体の貯留の有無を検査した。陰性コントロールとして生理食塩水を、陽性コントロールとしてウエルシュ菌エンテロトキシン 40  $\mu\text{g}$  をループ内に接種した。表 3 にその結果を示す。陽性コントロールでは 13.5 ml、F/A 比 1.2 を示す液体貯留が見られた。陰性コントロール、および 50、100  $\mu\text{g}$  の組換え体の接種ではループ内に液体の貯留は認められなかった。しかしながら、200  $\mu\text{g}$  の組換え体接種では、液体貯留が認められた。3.7 ml の貯留量で、F/A 比 0.5 を示した (表 3)。本実験結果は、15K Da タンパク質に腸管病原性があることを証明するもので、*S. fayeri* を含んだ馬肉による食中毒症状が、15K Da タンパク質によって直接的に誘発されていることを強く示唆している。

組換え 15K Da タンパク質では、典型的な下痢毒素であるウエルシュ菌エンテロトキシンに比べると、ループ内に液体貯留を引き起こす用量が、多く、かつ、誘導された貯留液体量も少なかった。この結果は 15K Da タンパク質の腸管病原性は弱い傾向にあると考えることもできるが、大腸菌によって合成された組み換え体の立体構造その他が、*S. fayeri* が合成する 15K Da タンパク質のそれと異なるためであるとも考えられ、今

後の検討が必要である。本タンパク質がアクチン脱重合因子と相同性があることは既に述べた。組換え 15K Da タンパク質に、アクチンを脱重合させる活性が認められれば、本タンパク質は、*Sarcocystis fayeri* 脱重合因子と呼称するのがふさわしい。

#### D. 結論

生鮮馬肉の生食で発生する食中毒症状、とくに下痢症状を誘発するのが、*S. fayeri* を構成している 15K Da タンパク質である可能性がある。部分アミノ酸配列を基に、同タンパク質遺伝子のクローニングを試みた。その結果、アミノ酸 118 残基をコードする 354 bp の遺伝子のクローニングに成功し、その塩基配列を明らかにした。塩基配列の相同性から、*Sarcocystis* 属と同門の類縁寄生虫であるアイメリアならびにトキソプラズマのアクチン脱重合因子に相同性がみられた。同遺伝子から組換えタンパク質を作製した。組換え 15K Da タンパク質は、シスト由来の 15K Da タンパク質に対して作製された免疫抗体と反応し、免疫学的交差性が認められた。組換え 15K Da タンパク質はウサギ腸管ループ試験で陽性を示し。その腸管毒性が実験的に証明された。以上の結果は、馬肉を喫食して発生する食中毒の直接的原因物質が、*S. fayeri* の持つ 15K Da タンパク質であることを立証するものである。

#### E. 参考文献

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. 平成 22 年度厚生労働科学特別研究事業  
「生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒に対する食品衛生上の予防対策」

3. 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)

4. 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)

#### F. 研究発表

・講演・シンポジウム発表

1. 鎌田洋一、ザルコシステイスが含まれる馬肉による食中毒、第 32 回日本食品微生物学会学術総会(2011)

・学会発表

1. Daisuke Irikura, Morihiro Saito, Yoshiko Sugita-Konishi, and Yoichi Kamata, Studies on the relationship between the toxicity of *Sarcocystis fayeri* and molecular biological properties of sarcocystin、2011 年度日本分子生物学会 (2011)

2. 新井陽子、田中成幸、伊藤誠一、鎌田洋

一、小西良子、斉藤守弘、馬肉を原因食品とする食中毒病因物質の解明とその予防法、平成 23 年度日本獣医公衆衛生学会 (2011)

3. 古川真斗、徳岡英亮、原田誠也、松本一俊、八尋俊輔、宮坂次郎、斉藤守弘、鎌田洋一、入倉大祐、松本 博、生食用馬肉を共通食とする原因物質不明有症事例の原因究明と予防対策の検討、平成 23 年度九州地区食品衛生監視員協議会 (2011)

4. 八木田健司、野崎智義、鎌田洋一、小西良子、原因不明食中毒に関連した生食用馬肉中の住肉胞子虫 *Sarcocystis* 遺伝子検査、平成 23 年度日本原生動物学会 (2011)

#### G. 健康危害情報

無し。

#### H. 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。

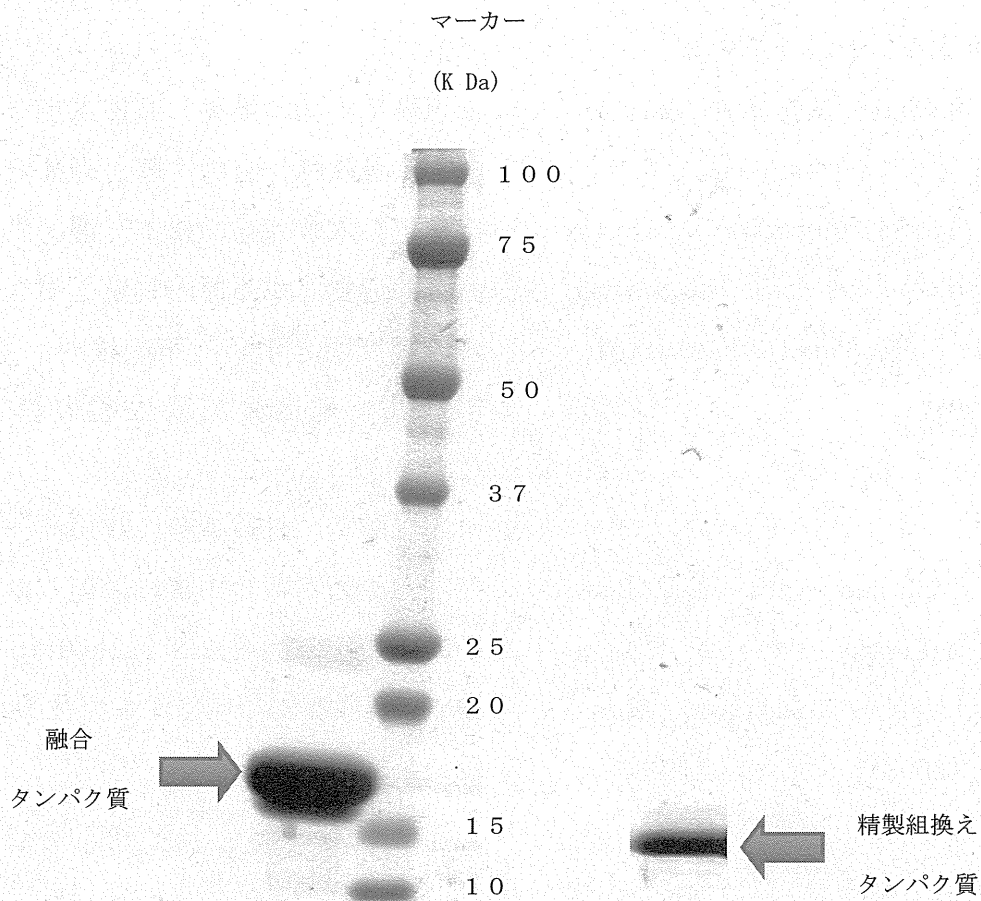


図1 組換え 15K Da タンパク質の作製

組換え 15K Da タンパク質は、HAT 融合タンパク質として発現させた。エンテロキナーゼ処理により、融合タンパク質を 15K Da タンパク質とし、HAT タグおよびエンテロキナーゼをゲルろ過で除去して、15K Da タンパク質を精製した。



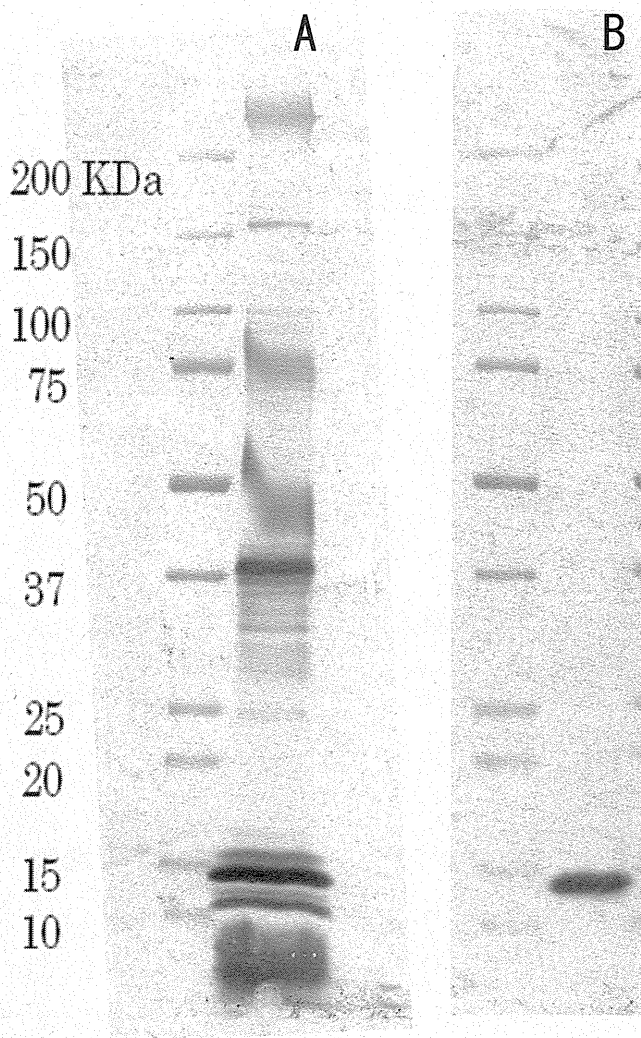


図2 組換え 15K Da タンパク質の抗原性

*Sarcocystis fayeri* のシストタンパク質群から精製した 15K Da タンパク質について、予めウサギ免疫抗体を作製した。同抗体を用いて、組換え 15K Da タンパク質の、精製タンパク質との免疫原性の同一性を検証した。

精製、および、組換え 15 K Da タンパク質を SDS-電気泳動後、PVDF 膜に転写した。同膜を抗精製 15 KDa タンパク質抗体で処理し、抗ウサギ IgG 二次抗体、ジアミノベンジチンで処理した。抗原性に同一部分がある場合、発色が見られる。

A : 精製 15K Da タンパク質

B : 組換え 15K Da タンパク質

表1 *Sarcocystis fayeri* 15K Da タンパク質の遺伝子クローニング法

ステップ1 : *Sarcocystis fayeri* シスト cDNA の調製

- 1 : Total RNA の抽出
- 2 : 逆転写酵素による cDNA の作製

ステップ2 : Degenerate プライマーの設計

- 1 : 2 カ所の内部アミノ酸配列の決定
- 2 : 上記アミノ酸配列をコドンに置き換える  
複数のコドンがある場合、イノシン酸とする
- 3 : プライマーオリゴ DNA の合成

ステップ3 : センスプライマー→ステップ2の内部アミノ酸配列のN末端側

アンチセンスプライマー→Oligo d(T)20 をアンチセンスプライマー

テンプレート→ステップ1のcDNA

PCR

ステップ4 : センスプライマー→ステップ2の内部アミノ酸配列のN末端側

アンチセンスプライマー→ステップ2の内部アミノ酸配列のN末端側

テンプレート→ステップ3のPCR増幅物

PCR

ステップ5 : 3' および5' RACE

ステップ6 : クローニングベクターに挿入

ステップ7 : 大腸菌の形質転換、クローニング

ステップ8 : 塩基配列決定

表2 *Sarcocystis fayeri* 15K Da タンパク質の分子生物学的性状

遺伝子構造	少なくとも2エクソン、1イントロンで構成
塩基数	354 bp
推定アミノ酸数	118 残基
SDS-電気泳動上の分子量	15 kDa
推定分子量	
相同性タンパク質	アクチン脱重合因子 <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Toxoplasma gondi</i></li> <li>• <i>Eimeria tenella</i></li> </ul>
推定される寄生虫体での機能	虫体形状の変化を司る

表3 *Sarcocystis fayeri* 組換え 15K Da タンパク質の腸管病原性確認試験

投与物	腸管ループ長 (cm)	貯留液量 (ml)	F/A 比 (ml/cm)
生理食塩水	7.5	0	-
40 $\mu$ g 組換えウエルシュ菌エ ンテロトキシン	11.5	13.5	1.2
50 $\mu$ g 組換え 15K Da タンパク質	10.5	0	-
100 $\mu$ g 組換え 15K Da タンパク質	9	0	-
200 $\mu$ g 組換え 15K Da タンパク質	7	3.7	0.5