

に住肉胞子虫のシストを確認した。地域を隔てても、全個体にシストを認めている事実は、本州において、シカと未同定の野生肉食動物との間に、住肉胞子虫の生活環が確立していることを示している。また、環境中に播種された住肉胞子虫のスポロシストを、草食動物であるシカが容易に摂取し、寄生が成立することも示している。

30 個体を調査した地域では、肉片中にシスト数は多くはなく、最大 30 シスト程度だった。一方、50 個体を調査した地域の、シカ肉中のシスト数は、最大 90 シスト以上あった。また、全体にシスト数が多かった。この調査結果は、本州においての住肉胞子虫の分布が均一でないことを示すが、野生のシカにおける住肉胞子虫寄生がない地域が存在する可能性はある。今後の調査が待たれる。

すべての個体にシストを確認したものの、平方センチメートル当たり数個の個体もある。本報告で取り上げた有症苦情事例におけるエゾシカ肉のシスト数は9から25を示した。この検査結果は、住肉胞子虫のシストが寄生しているシカ肉においても、シスト数が少数の場合、食中毒症状を起こさない可能性を示唆している。一方、9 あるいは 25 シスト/cm²以上を示す検体も多数ある。全体的な評価としては、ホンドジカの住肉胞子虫による危害は大きいものになると考えられる。今後、多くの地域において同様の調査をするとともに、有症事例における患者喫食シカ肉中のシスト数を把握し、

シカ肉における住肉胞子虫の危害性を明瞭化する研究が必要となる。

シカ肉中の住肉胞子虫シストに、毒性タンパク質である 15KDa タンパク質と免疫学的交差性があることが明らかになった。15KDa タンパク質は *S. fayeri* の病原性を担う本体であるが、シストを含む馬肉を凍結すると毒性は消失する。シカ肉中の住肉胞子虫も同様の冷凍処置で、食中毒制御が可能だろう。有害動物としてのシカの有効利用として、ジビエ料理への転用がなされているが、住肉胞子虫以外の病原体の存在も考えなければならず、シカを食用に供するには、加熱することが望まれる。ステーキや焼き肉というメニューでは、肉塊の内部への熱の浸透が不十分となる危険性もある。シカ肉の利用には、カレーやシチュー、また、鍋料理など、熱の浸透が肉片内部にまでおよぶ調理法が望ましいと考える。

E. 参考文献

- 1) 遠藤卓郎、黒木俊郎：ザルコシスチス（住肉胞子虫）。食中毒予防必携 第2版。p290-293、社団法人 日本食品衛生協会、東京、2007
- 2) 鎌田洋一、渡辺麻衣子、入倉大祐、斉藤守弘、田中成幸、原田誠也、古川真斗：生鮮獣肉中の危険因子の制御に関する研究。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 平成 22 年度 総括・分担研究報告書、79-95、2011

3) 厚生省監修：微生物検査必携 細菌・真菌検査 第 3 版、金井興美、財団法人 日本公衆衛生協会、東京、1987

4) 厚生労働省：生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について (Q & A)、2011

5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について。平成 23 年 6 月 17 日、食安発 0617 第 3 号、2011

6) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：ノロウイルス検査法について、平成 15 年 11 月 5 日、食安監発第 1105001 号/平成 19 年 5 月 14 日、食安監発第 0514004 号、2007

7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法 (暫定法)、平成 23 年 8 月 23 日、食安監発 0823 第 1 号、2012

8) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針、微生物編 2004。社団法人 日本食品衛生協会、東京(2004)

9) 厚生労働省健康局結核感染症課長：生シカ肉を介する E 型肝炎ウイルス食中毒事例について、平成 15 年 8 月 1 日、健感発第 081001 号/食安監発第 081001 号 (2009)

10) 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会、食中毒部会、乳肉水産食品部会：生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例の提言、平成 23 年 6 月 8 日(2011)

11) 成澤昭徳、横井 智、河合和枝、作井睦子、菅原憲治：野生エゾシカにみられた *Sarcosystis*。日獣会誌、61、321-323(2008)

12) 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)

13) 斉藤守弘、柴田 穰、久保政則、板垣博：野生ホンジョウジカおよびエゾシカにみられた住肉胞子虫。日獣会誌、51、683-686(1998)

F. 研究発表

・論文・総説発表

1. 青木佳代、石川和彦、林 賢一、新井陽子、斉藤守弘、鎌田洋一、小西良子：シカ肉の *Sarcosystis* が原因として疑われた有症苦情の事例について、日本食品微生物学雑誌、30、28-32、2013

2. 鎌田洋一：寄生虫毒素性食中毒-馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* の構成タンパク質が食中毒を誘発する-、日本獣医師会雑誌、65、705-710、2012

3. 鎌田洋一：ザルコシスティスが含まれる馬肉による食中毒、日本食品微生物学雑誌、29、47-52、2012

・講演・シンポジウム発表

1. 鎌田洋一：サルコシスティスが含まれる食中毒、平成 24 年度獣医師会年次大会、2013. 2

・学会発表

1. Sugita-Konishi, Y., Irikura, D.,

- Saito, M., Yahata, Y., Kamata, Y.: Parasite toxin of Sarcocystis in raw horse meat causes a new food borne disease. European symposium on food safety 2012、2012、5
2. 鎌田洋一、入倉大祐、斉藤守弘、大西貴弘、小西良子：馬肉食中毒の原因寄生虫であるフェイヤー住肉胞子虫の病原性タンパク質の性状、第154回日本獣医学会、2012.9
3. 鎌田洋一、入倉大祐、斉藤守弘、小西良子：馬肉ザルコシスティス食中毒の病因毒素タンパク質の同定と性状解析、第103回日本食品衛生学会、2012.5
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案取得
なし。
 3. その他
なし。

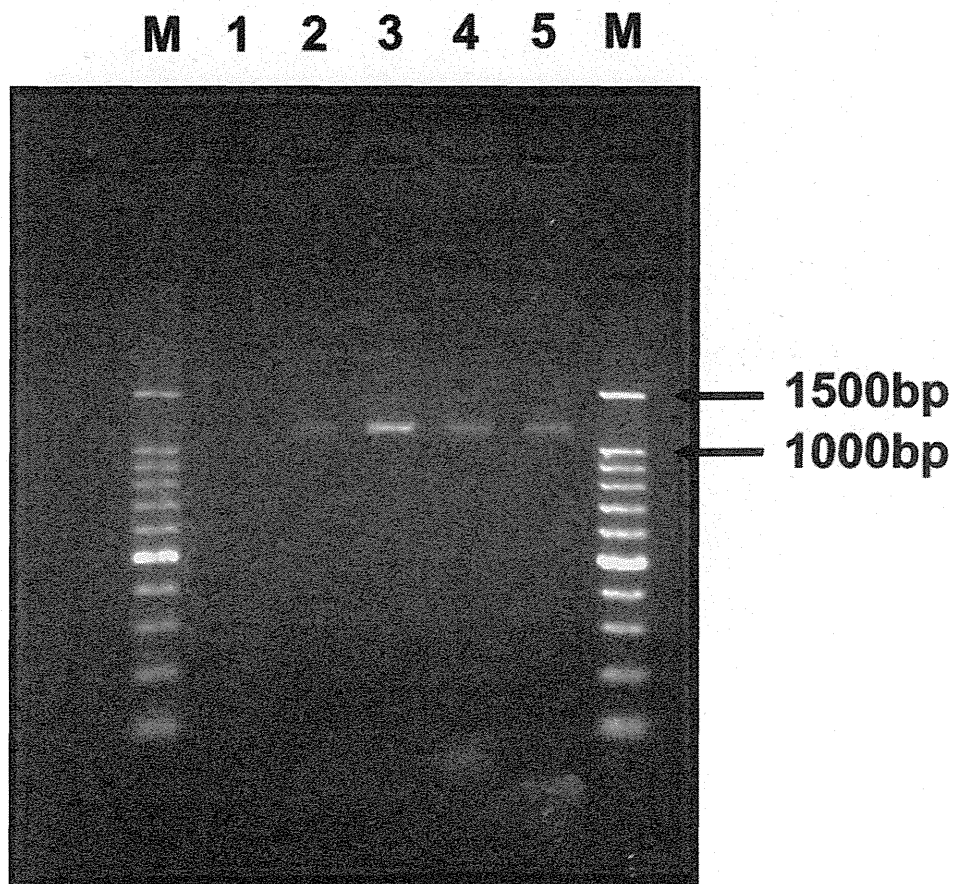


図1 有症苦情事例の原因食となった患者喫食シカ肉片の住肉胞子虫遺伝子結果

M : マーカー、1 : 陰性コントロール (水)、2 - 5 : 同一肉片の一部

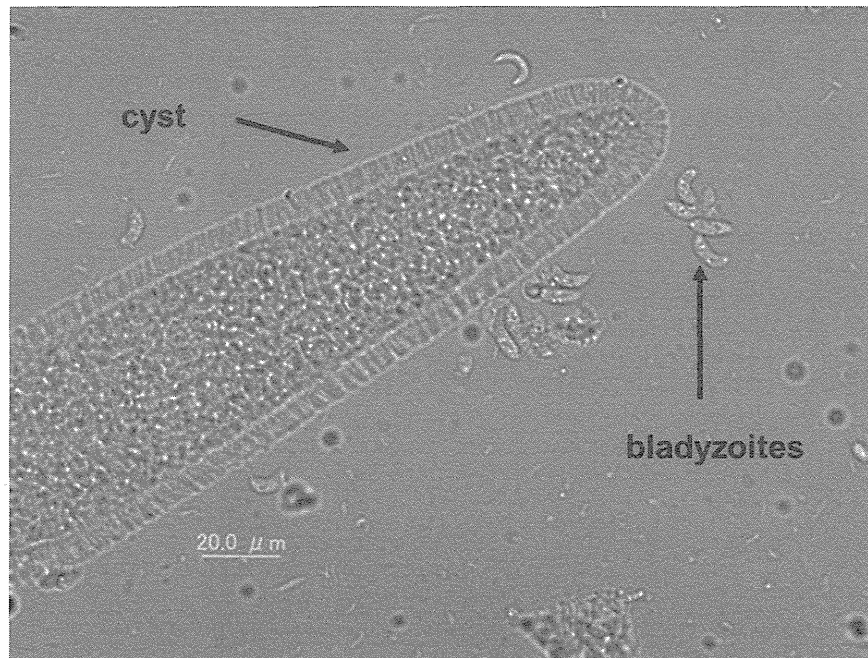


図2 有症苦情事例の原因食となった患者喫食シカ肉片の顕微鏡検査結果

シカニクをごく少量をピンセットで摘出し、スライドガラス上に滴下した PBS 中に浮遊させたのち、カバーガラスで肉片を圧斃し、顕微鏡観察を行った。

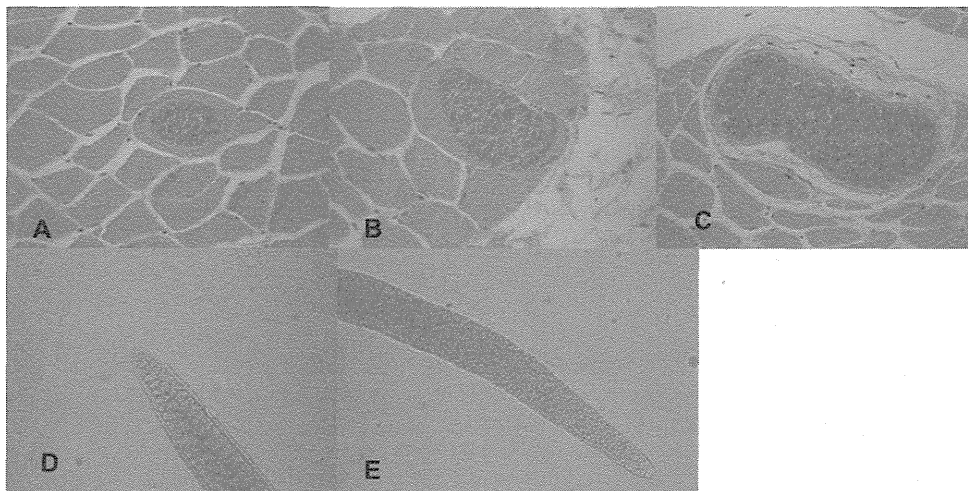


図3 シカ肉の組織標本中における住肉胞子虫と、単離した胞子虫のシスト

A、B : *Sarcocystis sybillencis*、C、B : *Sarcocystis wapiti*、D : *Sarcocystis* sp.

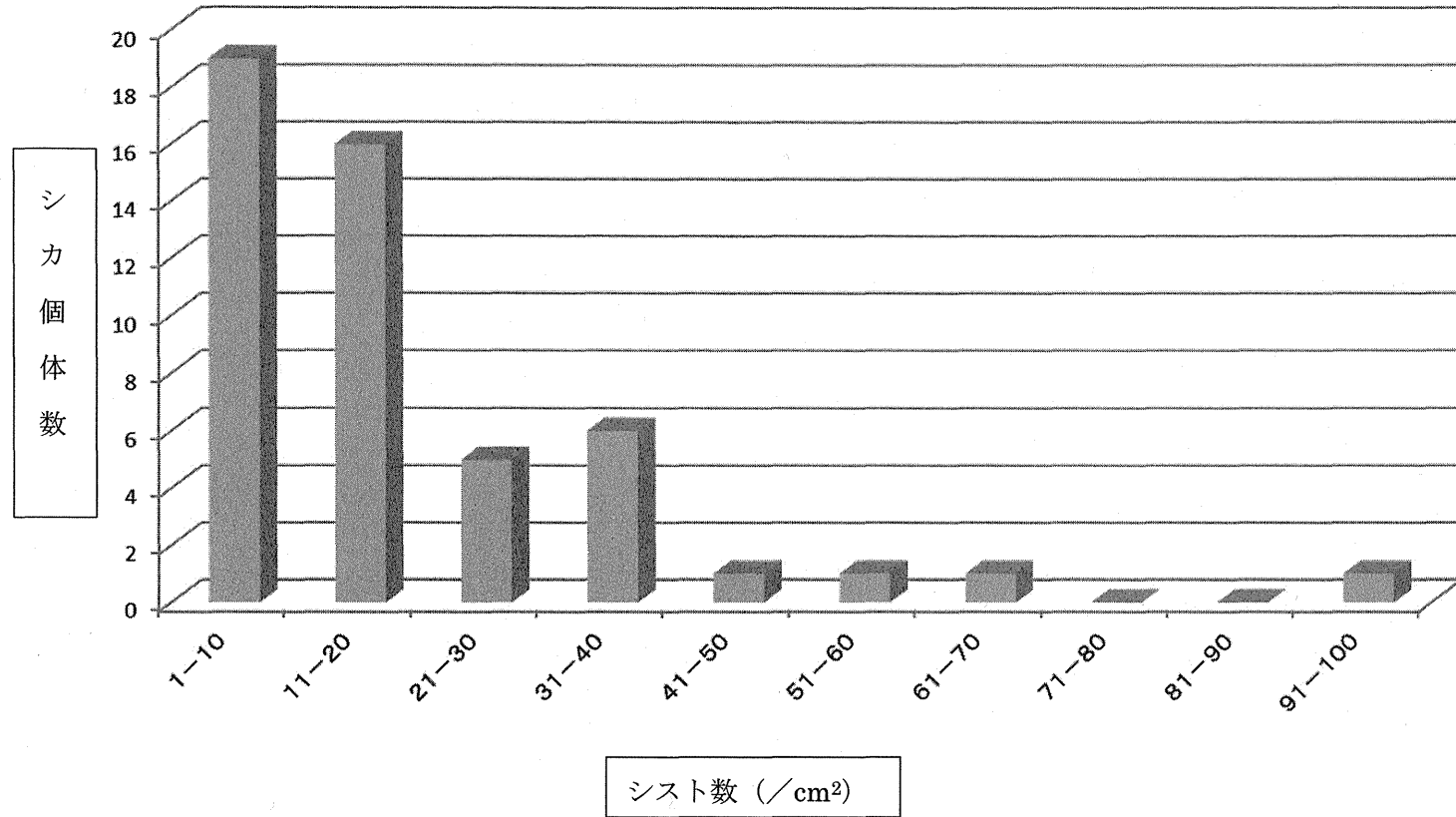


図4 ホンドジカ横隔膜肉片中の住肉胞子虫シスト分布図

シスト数平方センチメートルあたり 10 のピッチで、シカ肉中のシスト数分布を分析した。

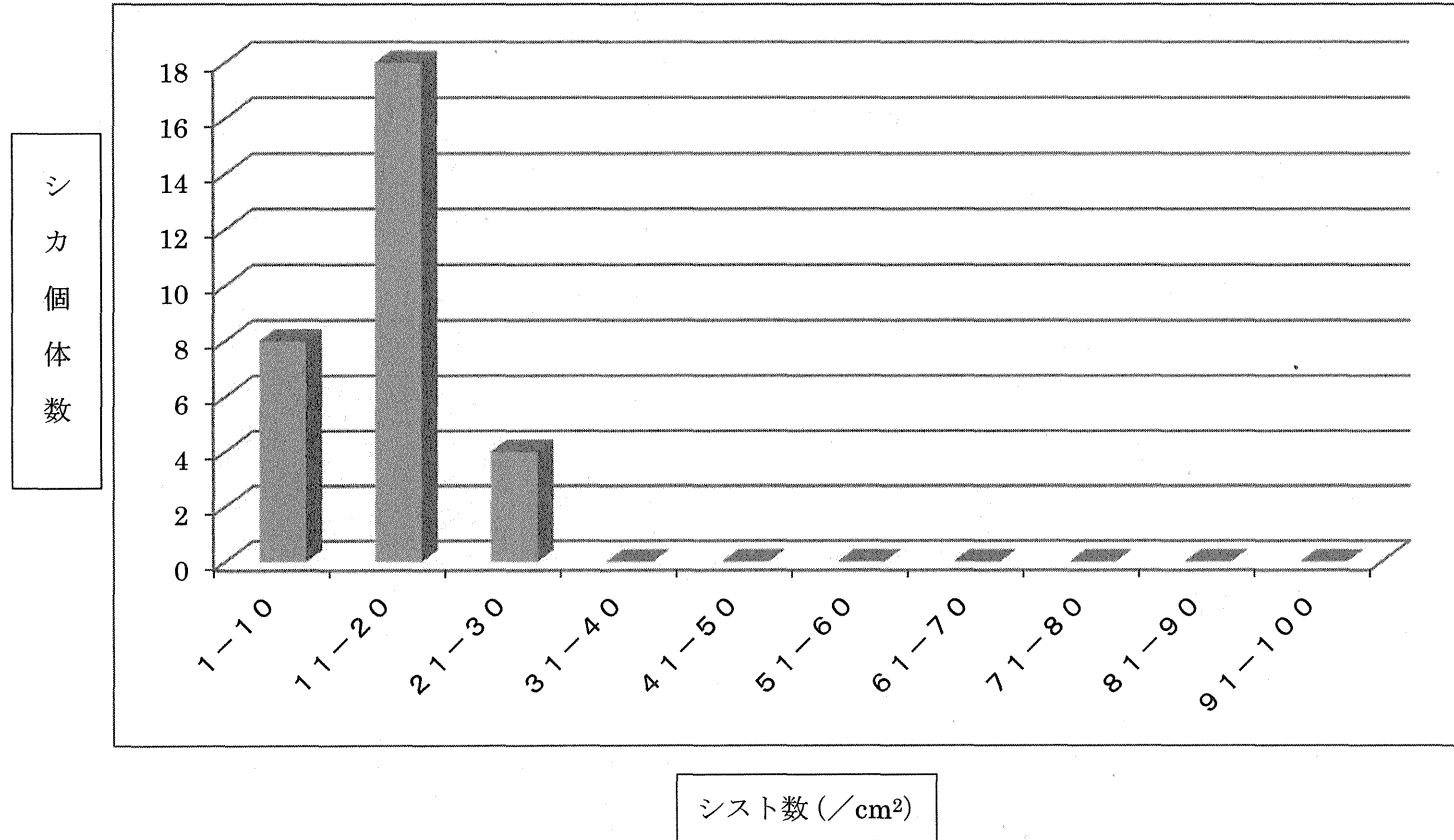


図5 別地域で捕獲されたホンドジカ横隔膜肉片中の住肉胞子虫シスト分布図

シスト数平方センチメートルあたり 10 のピッチで、シカ肉中のシスト数分布を分析した。

表1 住肉胞子虫が含まれるシカ肉を喫食しての有症苦情事例に関する疫学情報

喫食日時		発症日時		潜伏時間(hr)	症状(回数)					
					下痢	嘔吐	嘔気	腹痛	倦怠感	便材料の有無
2011/12/1	12:30	2011/12/1	18:00	5.5	○(8)	○(2)	○	○	○	○
2011/12/1	12:30	2011/12/1	20:00	7.5	○(1)			○		
2011/12/1	12:30	2011/12/2	3:00	14.5	○(10)			○		○
2011/12/1	12:30	2011/12/2	4:00	15.5	○(5)		○			○

表2 患者喫食シカ肉中の住肉胞子虫シスト数

検体番号	シスト数(/cm ²)			総数
	<i>S. sybillensis</i>	<i>S. wapiti</i>	<i>S. sp</i>	
1	11	14		25
2	6	12	1	19
3	2	7		9

表3 ホンドシカ横隔膜肉片中の住肉胞子虫シスト数

シカ肉番号	総シスト数(/cm ²)	シカ肉番号	総シスト数(/cm ²)
1	10	26	33
2	11	27	41
3	13	28	93
4	22	29	29
5	15	30	28
6	14	31	4
7	4	32	11
8	6	33	5
9	33	34	70
10	39	35	6
11	10	36	8
12	16	37	38
13	15	38	11
14	13	39	3
15	8	40	31
16	2	41	7
17	12	42	52
18	2	43	9
19	4	44	35
20	5	45	3
21	26	46	5
22	18	47	6
23	11	48	14
24	12	49	19
25	11	50	23

表4 別地域で捕獲されたホンドシカ横隔膜肉片中の住肉胞子虫シスト数

シカ肉番号	総シスト数(/cm ²)	シカ肉番号	総シスト数(/cm ²)
1	32	16	14
2	7	17	18
3	6	18	20
4	10	19	17
5	29	20	16
6	15	21	17
7	12	22	16
8	18	23	5
9	14	24	8
10	13	25	16
11	15	26	7
12	18	27	8
13	21	28	6
14	20	29	11
15	18	30	22

分 担 研 究 報 告 書

馬肉生食による食中毒の病因物質とされる
ザルコシスティス *Sarcocystis fayeri* のゲノム解析

野崎 智義

平成 24 年度 厚生労働科学研究（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

馬肉生食による食中毒の病因物質とされるサルコシステイス *Sarcocystis fayeri* のゲノム解析

研究分担者 野崎 智義（国立感染症研究所寄生動物部）
研究分担者 黒田 誠（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）
研究協力者 八木田健司（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 竹内史比古（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）
研究協力者 関塚 剛史（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）
研究協力者 泉山 信司（国立感染症研究所寄生動物部）

研究要旨

馬肉生食による食中毒の病因物質と考えられている *Sarcocystis fayeri* に関して、その毒性関連因子を中心とした遺伝子情報を網羅的に得るために、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。昨年度に実施した結果はリード数不足であったことから、本年度は新しい生鮮馬肉からサルコシストを得て作成したライブラリより、Illumina HiSeq2000 シーケンサーを用いて大量のリードを取得した。まず、馬肉から抽出した DNA は微量だが、GenomiPhi による増幅を避けて、ChipSeq の変法を用いてライブラリを構築した。Illumina MiSeq シーケンサーによる試験的な配列の読み込みを行い、*Sarcocystis fayeri* の配列取得を確認後、HiSeq による本番の読み込みを行った。結果として、MiSeq からは 1060 万リード、1.59Gbase の配列、HiSeq からは 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。CLC Genomics Workbench を用いて de novo assemble を行った結果、最終的に N50 が 3,349bp、最大コンティグ長が 220,145bp、総塩基長が 126,606,435bp、コンティグ数 68,209 本が得られた。近縁の *S. neurona* の 124Mbase に対して、同等のデータ量が取得できた。カバレッジは 50 倍あり、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されており、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma* のアピコプラストに相同性の高い配列が含まれていた。

A. 研究目的

近年、国内において、馬刺しの喫食による一過性の嘔吐下痢症を主徴とした食

中毒が問題となっている。原因として、これまでヒトへの健康危害が知られていなかった、ウマに寄生した *S. fayeri* の関与が疫

学調査の結果として示唆された。現在までに、*S. fayeri* の毒性に関しては、下痢原性の毒性タンパク質の関与が示唆されているのみであり、本種の毒性あるいは寄生虫学的特性に関する研究の進展が求められている。しかし、サルコシステイス感染症の報告は多くなく、他の原虫類に比べて研究が少なく周回遅れとなっている。一方、近年大きく発展したゲノム解析手法は、比較生物学的な解析を可能とし、研究リソースの限られた条件下においても、病原体研究の有効な方法の一つと考えられる。当該研究では、*S. fayeri* の病原体を研究する目的で、全ゲノム解析を行うこととした。

しかし、昨年度は、リード数が不足した結果であった。すなわち、生鮮馬肉から得た 12 サルコシストより核酸を抽出したが、核酸 DNA が少なかったため GenomiPhi で増幅を行った後に、ライブラリを構築した。このライブラリより Illumina GAIIx シーケンサを用いて 3600 万リード、2.9Gbase を取得した。ABYSS を用いて de-novo assemble を行った結果、最終的に N50 が 57bp、最大コンティグ長が 7,639bp、総塩基長が 19,245,883bp、コンティグ数 318,497 本が得られていた。近縁の *Toxoplasma* のゲノムサイズ 60Mbase に比べて、1/3 の 20Mbase 弱に留まり、データ量が不足していた。その後未報告の公表資料ではあるが、*S. fayeri* に近縁の *S. neurona* のゲノムプロジェクトが米国で進行していることが判明し、そのゲノムサイズは 124Mbase であると見積もられていた¹⁾。また、GenomiPhi による増幅のバイアスも心配された。

従って、当該研究では、新鮮馬肉から新たにサルコシストを得て、GenomiPhi に頼らないライブラリの構築と、十分量のデータ取得を目指すこと

とした。

B. 研究方法

サルコシステイスが含まれる馬肉試料として、熊本県の馬肉生産事業者より新たに生鮮馬肉を取得した。ここから切り出した一部馬肉より、昨年度と同様に、22G 注射針を用いて馬肉を切削し、実体顕微鏡下でサルコシストを取り出した。シストは生理食塩水中において形態的特徴を、一部を用いてシスト内のブラディゾイトを確認した。2 名がおよそ 1 週間をかけて、300 シストを回収し、小分けした状態で冷凍保存した。一部試料より核酸抽出を行い、残りは将来の RNA 解析に使用予定とした。

核酸抽出に、NucleoSpin TriPrep kit (MACHEREY-NAGEL)、QiaAmp DNA mini kit (Qiagen) を使用した。核酸定量には Qubit dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen) を使用した。試料に含まれる SSU rRNA のコピー数をリアルタイム PCR 法で確認した²⁾。

ライブラリ構築に、ChIP-Seq DNA Sample Prep Kit (Illumina) を使用した。ただし、ゲノム DNA とタンパク質の相互作用、クロスリンク固定、免疫沈降の処理を行わず、単にゲノム DNA の分断とライブラリ構築のために使用した。これはゲノム DNA の使用量を抑えるためで、通常のライブラリ構築方法では多量(数 μ g)の DNA を必要とするが、今回使用した ChIP-Seq 変法は、DNA100ng からライブラリ構築が可能であった。結果としてライブラリのインサート長は、150bp をピークとした 100 ないし 300bp の分布であった。

次世代シーケンサーに MiSeq ならびに HiSeq2000 (いずれも Illumina) を使用した。ライブラリ構築とシーケンスリード読み取りは、Operon にて行った。MiSeq の読み取り結果に対する Blast 検索は、nt データベースを対象とした Blastn、ならびに

nrデータベースを対象としたBlastxを、E値に 10^{-3} を指定して実施した。

De novo assembleにCLC Genomics Workbench (Ver.5.5)を使用した。計算条件は、当初は初期設定で行ったが、最終的には最小コンティグ長を500bpとし、アセンブル前のウマゲノムの除去は行わなかった。また、配列のトリム処理を厳密に行い、品質0.01(塩基の確度99%)を指定し、長さ50未満の配列を破棄した。アセンブルには、ペアードエンドリードを限定して使用した。HiSeqの100+100のペアードエンドリード、MiSeqの150+150のペアードエンドリードを同時に用いて、混合アセンブルを行った。

当初行なっていたウマゲノムの除去操作は、GenBankよりダウンロードした登録配列(NC_009144~NC_009175並びにNC_001640)に対するマッピング操作により行い、マップされなかったリードをサルコシステイスの配列として回収した。この時、Length fractionとSimilarity fractionには0.9を指定し、リード長の9割が90%以上の一致率でマップされるように、厳密な条件を設定した。

SSU rRNAのPCRには、Prittら(2008)の報告したプライマー³⁾を使用し、昨年度に使用した事例残品と、今年度に抽出したゲノムDNAを鋳型に使用した。古典サンガーシーケンスにより直接塩基配列決定を行った。病原性との関連が推測されている15kDaタンパク質の配列を本研究班の共同研究者より入手した。

C. 研究結果および考察

核酸抽出を最適化するため、2つの核酸抽出キットと、ProteinaseKを用いた溶解処理の追加の予備検討を行い、最大限のDNA抽出効率が得られる条件を求めた。最終的にQiaAmp DNA mini kitを標準条件で使用した場合にDNAの回収

量が多く、30シストから1.5 μ gのゲノムDNAを得た。一方、従来使用していたNucleoSpin TriPrep kitは、ProteinaseK処理を追加しても、10シストから40ないし60ngのゲノムDNAと収量が少なかった。なお、結果には示さないが、SSU rDNAのコピー数が試料DNA濃度に対応することを、リアルタイムPCRにて確認した。

NucleoSpin TriPrep kitでの収量が少なかった問題は、RNAとタンパク質の同時精製を可能とするといった、製品の目的が異なることが理由と考えられた。昨年度は、ProteinaseK処理を行わない、化学的溶解方法のみで核酸を抽出していたことから、12シストから20ng程度の収量しかなく、ライブラリ構築には不足で、GenomiPhiでの増幅を強いられていた。

今回、ゲノム配列決定に使用するサルコシステイスが、食中毒の事例残品と同じでなければ困ることから、SSU rRNAの一部配列500bp弱を用いて、配列の異同を確認した。結果には示さないが、配列が100%一致したことから、今回取得したサルコシステイスは以前のものと同等とみなし、以降のゲノム決定を進めた。

方法に従い、ライブラリ構築を行い、MiSeqにより試験的に配列を取得した。MiSeqからは1060万リード、1.59Gbaseの配列が得られた。この内容の真偽を確認するのに使用可能な*S. fayeri*の今ある配列はわずか2つ、15kDaタンパク質遺伝子とSSU rRNAに限られたが、これら配列へのマッピングによりカバレッジを算出した結果、それぞれx5、x24であった。これとは別に、リードを一部抜粋してGenBankデータベースに対してBlastn検索、Blastx検索した結果、それぞれ13%(215/1594)、12%(=184/1594)が左右相称動物(Bilateria)にヒットし、ウマゲノムの混入と考えられた。

他の大部分は No hit で、一部が近縁で Sarcocystidae の *Toxoplasma* や *Neospora* 等にヒットした。以上の結果、取得した配列は目的のサルコシステイスの配列と考えられ、続けて HiSeq による読み取りを実施した。同じライブラリより、HiSeq からは 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。

得られたリードより、当初は初期設定のトリム処理を行い、品質 0.05 (確度 95%)、長さ 50 未満の配列残す条件で計算し、de novo assemble も初期設定で行い、この時の Contig の最小の長さは 200bp の設定であった。シングルリードも利用した。また方法に従い、厳密な条件でウマゲノムの除去操作を行った。

その結果、

N50(bp): 1,646

Max(bp): 234,183

Total (bp): 161,774,164

Contigs: 195,823

の結果が得られた。サルコシステイス 15kDa 配列は x60 のカバレッジが得られ、悪くない結果であった。一方、*S. neurona* のゲノムサイズ 124Mb に対しては、トータルの塩基数が過剰に感じられ、ウマの配列が除去しきれない疑いが生じた。ウマの登録配列は、ある一系統のウマの配列であって、ウマの多様性を考慮することができず、遺伝子の変異が予想される。もちろん、*S. neurona* のゲノムサイズの予想が正しいという保証はないが、否定する根拠もない。積算コンティグ長からは、ウマゲノムが完成するまで長さが伸びるのではないか、という印象を持った (図 1A)。

ウマゲノムへのマッピング状況を確認すると、ミトコンドリアはコピー数が多いので比較的綺麗なマッピング状況であったが、ペアードエンドリードのペアーの関係が崩れて、マップされない隙間部分が生じていた (図 2A)。常染色体上では、x5 程度の

カバレッジでまばらなマッピングの結果が続いていたが (図 2B)、所々で非特異的なマッピングが生じていた (図 2C)。特に、遺伝子内での非特異的なマップがあり、この場合は例えば遺伝子の保存領域、あるいは類似の領域の存在が示唆された (図 2D)。この状況を見ると、サルコシステイスもウマも同じ真核生物であることから、類似の配列が存在し、誤って吸収されてしまうことが懸念された。

その後、de novo assemble の条件設定で最小コンティグ長の設定に着目した所、初期設定では 200bp から、500bp に変更すると、先の初期設定に比べて良好なアセンブル結果が得られることに気がついた。この時は、得られたリードのトリム処理を厳密に行い、品質 0.01 (確度 99%)、長さ 50 未満の配列を削除する条件で計算した。ペアードエンドリードのみをアセンブルに使用し、シングルリードは破棄した。この条件では、

N50(bp): 3,349

Max(bp): 220,145

Total (bp): 126,606,435

Contigs: 68,209

の結果が得られた。サルコシステイス 15kDa 配列は x50 のカバレッジが得られ、若干の減少で済んだ。一方、*S. neurona* のゲノムサイズ 124Mb に対しては、トータルの塩基数がほぼ同程度になった。積算コンティグ長は、増加が止まった印象を持った (図 1B)。もちろん、ウマゲノムの混入でサイズが大きくなる可能性、一方で繰り返し配列部分の配列が不足、などが考えられることであった。この問題は計算ではなく、ギャップクロージングの過程で解消されるべきと考え、以降の内容検討を進めた。

得られたアセンブルの内容が正しいことを検証するため、以下の検討を行った。まず、個々のコンティグのカバレッジとコンテ

ィグ長の関係をプロットしてみた(図 3)。50 倍のカバレッジのコンティグ長が大きく伸びている様子が得られた。前述の、15kDa タンパク質の配列のカバレッジも、50 倍と揃っていた。このことから、ライブラリの構築は物理的なゲノム DNA の断片化により均一に行われ、アセンブルされたサルコシステイスの配列は一定のカバレッジに集まっていること、ウマゲノムの 5 ないし 10 倍程度のカバレッジ付近に長いコンティグはなく、ウマゲノムが無視できていることが判明した。ペアードエンドリードのペアーがよく維持されているコンティグが 50 倍のカバレッジに多数存在する一方で、50 倍から外れるほどペアーが維持できず、ペアーの関係がほとんどないシングルリードばかりのコンティグも存在した(図 4、表 1、2)。外れたコンティグほどコンティグ長も短くなり、アセンブル困難な繰り返し配列や、ウマゲノム等のノイズと考えられた。

コンティグ長が 10kb 以上と長く、カバレッジが数千倍と大きい 2 点については(図 3)、*Toxoplasma* のアピコプラストゲノムに近縁の配列であること、ウマのミトコンドリアゲノムであることが相同性検索の結果判明した(図 4A、B)。それぞれカバレッジとサイズは $\times 1,700$ 倍で 20kb、 $\times 2,500$ 倍で 16kb であった。アピコプラストゲノム(U87145)には rDNA の配列が複数含まれており、それが理由でサルコシステイスでも 1 本につながらなかったと推測され、PCR と古典サンガーシーケンスによるギャップクロージングが必要であった。ウマミトコンドリアゲノムについては、一部非特異配列があって完全な環状 DNA にはならなかったが、登録配列(JN398450)を基準としたマッピングでは 100% (16657bp/16657bp) の配列が一致した。このウマミトコンドリアゲノム配列は、馬肉の由来の推定に有用と考えられた。興味深いことに、現時点でサルコシステイスのミ

トコンドリアゲノムを検出しておらず、ギャップクロージングの過程で、慎重にミトコンドリアの配列の有無を検討していく必要があった。

病原性疑いの 15kDa タンパク質の配列は、12kb 強のコンティグとして、アセンブルの結果に含まれていた(図 5A)。上流側、下流側に十分な長さの配列が続いており、ペアードエンドリードのペアーの関係が良好に維持されており(図 5B)、本遺伝子の検討に有用と考えられた。

D. 結論

新しい生鮮馬肉からザルコシストを得て新しくライブラリを作成した。次世代シーケンサーによりリードデータを取得し、MiSeq からは 1060 万リード、1.59Gbase、HiSeq からは 1.67 億リード、16.7Gbase の配列が得られた。CLC Genomics Workbench を用いて de novo assemble を行い、最終的に N50 が 3,349bp、最大コンティグ長が 220,145bp、総塩基長が 126,606,435bp、コンティグ数 68,209 本が得られた。近縁の *S. neurona* の 124Mbase に対して、同等の配列長であった。カバレッジは 50 倍あり、ペアードエンドリードのペアーがよく維持されており、ゲノム全域の配列がほぼ取得できたと考えられた。得られた配列には、下痢症状の誘発が推測される 15kDa タンパク質の配列や、近縁の *Toxoplasma* の Apicoplast に相同性の高い配列が含まれていた。今後は、ギャップクロージングとアノテーションが課題と考えられた。

E. 参考文献

- 1) DK. Howe. Sarcocystis neurona Genome Sequencing Project. http://www.ca.uky.edu/gluck/Howe/DK_Proj_GenSeq.asp (2013 年 4 月

15日確認)

- 2) 食品中の有害微生物を対象としたライブラリーシステム等の構築、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(研究代表者小西良子)、平成 23 年度総括・分担研究報告書、p151-161、2012.
- 3) Pritt B. et al.,(2008) Detection of *Sarcocystis* parasite in retail beef: A regional survey combining histological and genetic detection methods. J. food Protection. 71(10):2144-2147

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

八木田健司、内田雄治. 国産重種馬肉における *Sarcocystis fayeri* 汚染実態調査. 第 82 回日本寄生虫学会大会、平成 25 年 3 月 29-31 日、東京.

G. 知的所有権の取得状況

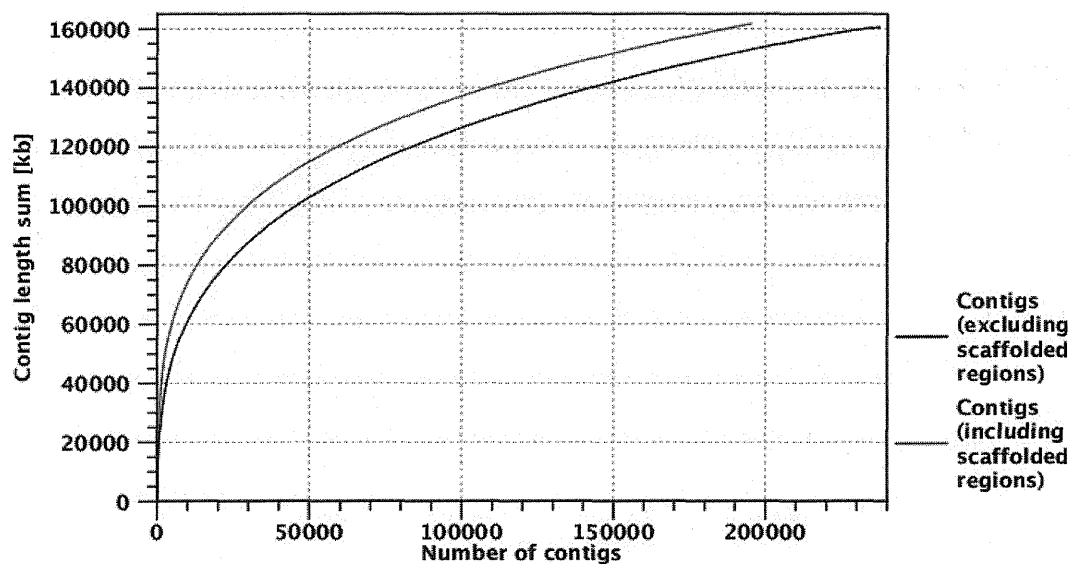
1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

A) 初期検討結果



B) 最終条件

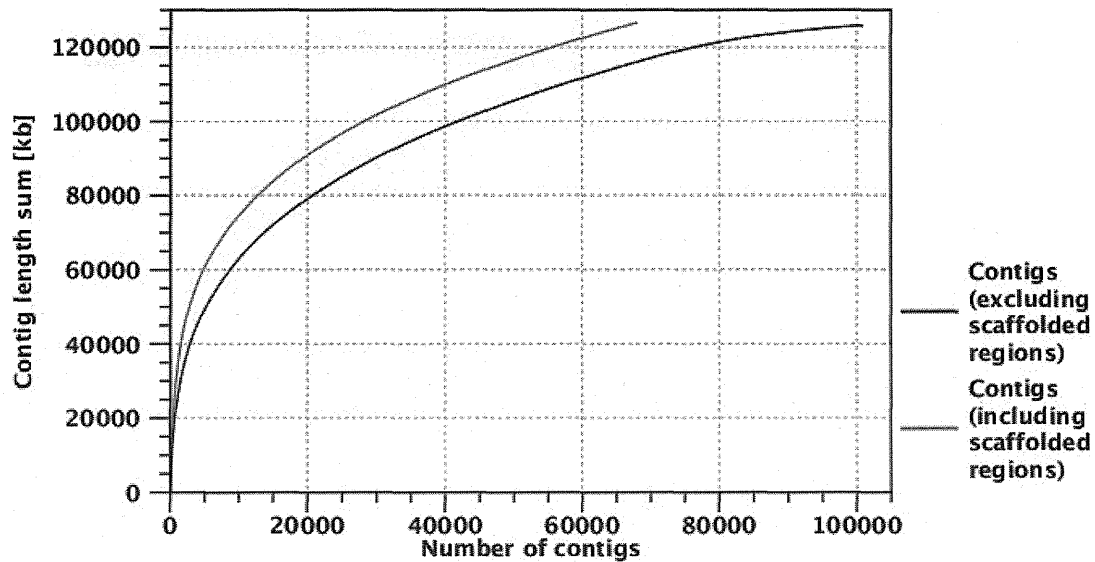


図1 積算コンティグ長