

を検討した。いずれにおいても良好な増幅が得られたことから、Unicap18S\_03F を以後の 18S rDNA 5' 末端側の約 930-bp 長を増幅するプライマーペアとして用いることにした。

ニホンイトヨリダイ 2 尾からそれぞれ分離した *U. pyramidata* 2 分離株で 18S~28S rDNA の一連の塩基配列 5,249-bp を得た。18S rDNA は 1,710-bp、ITS1 領域は 408-bp、5.8S rDNA は 156-bp、ITS2 領域は 274-bp、28S rDNA は 2,701-bp から構成されており、2 分離株で ITS2 領域に 1 箇所(141 塩基目)、28S rDNA に 1 箇所(846 塩基目)に塩基置換があった。Miller & Andlard (2013)によりオーストラリア Lizard 島近海で捕獲されたヒトスジタマガリラ (*Scolopsis monogramma*) から分離された *U. pyramidata* の 18S rDNA および 28S rDNA 登録塩基配列 (KF184379; 1,020-bp、KF184371; 578-bp) と比較すると、18S rDNA (比較できる塩基部位は、今回得られた 18S rDNA 塩基配列の 513 塩基目から 1,532 塩基目に相当)では 100%同一で、28S rDNA (比較できる塩基部位は、今回得られた 28S rDNA 塩基配列の 89 塩基目から 666 塩基目に相当)では 6 箇所に塩基置換がみられたことで 98.96%の同一性であった。

瀬戸内海防府沖で捕獲されたマハゼから得られた *Unicapsula* sp. A については、2 尾から各々得られた 2 分離株について一連の 18S~28S rDNA 塩基配列 4,782-bp と 4,778-bp を得た。ITS1 領域での 4-bp の欠

失もしくは挿入があったことが、2つの塩基配列長の違いとなった。18S rDNA は 1,711-bp、ITS1 領域は 429-bp/425-bp、5.8S rDNA は 157-bp、ITS2 領域は 215-bp、28S rDNA は 2,270-bp から構成され、2 分離株で ITS1 領域に上述の 4-bp のギャップと 3 箇所の塩基置換、28S rDNA に 1 箇所(1,449 塩基目)に塩基置換が確認された。塩基配列が登録された種との比較では、18S rDNA では *Unicapsula* sp. CMW-2003 (AY302725)、*U. seriola* (KF184384)、*U. andersenae* (KF184378)、*U. pyramidata* (KF184379) と 92-97%の同一性を示し、28S rDNA でも比較できる 357-412-bp 長で 88-91%の同一性にとどまった。

カンパチから得た *Unicapsula* sp. B については、18S rDNA の 1,672-bp 長、28S rDNA は 2,273-bp 長を得た。18S rDNA はオーストラリア Moreton 湾産ヒラマサ (*Seriola lalandi*) からの *U. seriola* (KF184384) と 99.9% (1,369/1,371) の同一性、西オーストラリア Jurien 湾産ヒラマサからの *U. seriola* (KF184383) と 99.6% (998/1,002) の同一性、和歌山沖で漁獲されたヤイトハタ (*Epinephelus malabaricus*) から確認された *Myxosporea* cf. *Unicapsula* sp. EP-1 (= *U. seriola*) とは 100% (1,042/1,042) の同一性であった。本研究では 1,672-bp 長とほぼ 18S rDNA 全長に亘る塩基配列を得ているが、ここで比較した高い相同性を得た 3つの塩基配列は 5' 末端部の塩基配列が解明できていないために、一部 18S rDNA

の比較にとどまった。しかしながら、非常に高い塩基配列同一性から同一種と考えられた。28S rDNA についても、日本産ヤイトハタ寄生種(AB638618)と 100% (659/659)、オーストラリア産 *U. seriolae* (KF184377/KF184376)と 99% (609/613) もしくは 607/613)と高い同一性を示した。

## 2. *Kudoa* spp. の 18S/28S rDNA 解析

ウマヅラハギ No.1 の大きめのシュードシストから分離された胞子は形態学的に *K. septempunctata* と酷似していた。本種の 18S rDNA については 1,682-bp 長、28S rDNA は 2,457-bp 長を得たが、これまでに登録された塩基配列と同一であり、分子遺伝学的にも *K. septempunctata* と同一種であることが確認された。

同魚から得た小さめのシュードシストから分離された4つの極囊/殻片をもつ胞子 (*Kudoa* sp. A) の 18S rDNA については 721-bp 長、28S rDNA は 549-bp 長を得た。ウマヅラハギ No.2 から分離された4つの極囊/殻片をもつ胞子 (*Kudoa* sp. B) の 18S rDNA については 1,688-bp 長、28S rDNA は 2,512-bp 長を得た。これら2種の胞子は形態学的に区別されるとともに、18S rDNA で相同性の高い5'末端側681-bp長の比較で 98.24% の塩基配列同一性、28S rDNA で相同性の高い5'末端側540/529-bp長の比較で 89.04% の塩基配列同一性にとどまり、異種であることが確認された。

*Kudoa* sp. A の 18S rDNA はオーストラリ

ア・グレートバリアリーフ産ハタンポ科(スズキ目スズキ亜目) *Pempheris ypsilychnus* の体側筋にシュードシスト形成する *K. minithyrsites* (AY152749) と 99.1% (671/677) の同一性、続いて *K. thrsites* の複数の登録塩基配列とは 98.2-98.8% (669-673/681)、*K. permulticapsula* (AY078429) と 98.2% (669/681)、*K. megacapsula* (AB188529) と 98.2% (669/681)、*K. lateolabracis* (AY382606) と 97.4% (668/686) の塩基配列同一性であった。また、28S rDNA の塩基配列は、さまざまな起源の *K. thyrsites* と 98.9% (2,462/2,489)、*K. cheilodipteri* (JX090299) や *K. thalassomi* (AB844446)、*K. neothunni* (AB693049) 等との 97.0% (414/427) との同一性が最高であった。*Kudoa minithyrsites* は 28S rDNA の塩基配列が報告されていない。

*Kudoa* sp. B の 18S rDNA 1,678-bp 長は日本産ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) から登録された *K. thyrsites* の 18S rDNA 塩基配列と 100% (1,678/1,678) の同一性を持ち、他の *K. thyrsites* 登録配列とは 98% (1,648-1,678~1,657/1,688) 程度の同一性であった。また、28S rDNA の塩基配列は、上述の国産ヒラメからの *K. thyrsites* (JQ302300) と 98.9% (2,462/2,489) の高い塩基配列同一性を示し、他の同種登録塩基配列とは 93.2% (994/1,066) ~ 95.1% (1,618/1702) の同一性であった。

## 3. *Unicapsula* spp. および *Kudoa* spp. の

## 18S/28S rDNA 系統樹解析

新しく得た 18S rDNA 塩基配列 7 ヶ、28S rDNA 塩基配列 8 ヶについて多殻目の *Unicapsula* 属ならびに *Kudoa* 属における位置づけを図 9・図 10 に示す。ウマヅラハギから得た *Kudoa* sp. A については 3' 末端側の 18S rDNA 塩基配列が未読であることから、図に示した系統樹には加えていない。マハゼから得た *Unicapsula* sp. A は 18S/28S rDNA いずれの系統樹でも *U. pyramidata* との近縁性が高く 1 つのクレードをつくった。本研究で検討したベトナム産ニホンイトヨリダイからの *U. pyramidata*、カンパチからの *U. seriola*、ウマヅラハギからの *K. septempunctata* と *K. thyrsites* の 4 種は図に示す通り、既知種の登録塩基配列とそれぞれ同一枝に位置し、大きな塩基配列上の変異はなかった。

## D. 考察

*Unicapsula* 属粘液胞子虫は現在 11 種が世界的に記録されている (Millar & Adlard, 2013)。特異な三角形の胞子をもつ *U. pyramidata* は Naidjenova & Zaika (1970) によってインド洋のニホンイトヨリダイから種記載された。最近になって、オーストラリア・グレートバリアリーフ産ヒトスジタマガリラ 14 尾の体側筋を調べ、そのうちの 1 尾 (7.1%) に寄生が確認された (Millar & Adlard, 2013)。本研究では、ベトナム北部のハロン湾沖カットバ島にて入手したニホンイトヨリダイ 5 尾を検索し、そのうち 3

尾 (60%) に寄生を確認した。また、検出したプラズモディウム (シュードシスト) は 1.20mm x 0.11mm (代表的 1 つの計測) と大きく、ヒトスジタマガリラでのそれが 0.140 x 0.066mm と報告されたことを考えると、自然宿主としてニホンイトヨリダイが大きな役割を果たしていることを推測させる。本研究を含め、*U. pyramidata* の分布が、インド洋のみならず、東シナ海にかけて太平洋南西部に広くみられることが明らかとなった。

瀬戸内海防府沖産マハゼから得られた *Unicapsula* sp. A は球形様の胞子をもち、*U. pyramidata* 以外の既知種 10 種との類種鑑別が必要であるが、体側筋寄生で同様の胞子・極囊の計測値をもち、また、地理的な分布が重なる種はないことから、未記載種と考えられる。今回、本種ならびに前述の *U. pyramidata* については ITS 領域を含めた 18S rDNA~28S rDNA の広域に亘り塩基配列を明らかにできたことから、類似した形態をもち、光学顕微鏡下での形態学的な種鑑別の難しい *Unicapsula* spp. について、今後は分子系統学的な種鑑別を行う基盤を確立できた。

集団食中毒事例で原因食の 1 つとして検討するために回収されたカンパチから得た *Unicapsula* sp. B については rDNA ITS 領域を得られていないが、18S rDNA と 28S rDNA については十分な塩基配列を明らかにできた。胞子の形態学的特徴と 18S/28S rDNA 塩基配列は、オーストラリア近海の太

平洋産ヒラマサ (Lester, 1982; Miller & Adlard, 2013)、あるいは最近になって本邦近海和歌山県沖のヤイトハタで確認された *U. seriolae* と同一種であることを示し、カンパチは新たな宿主記録となる。Miller & Adlard (2013) は、ヒラマサはオーストラリアで養殖対象魚として注目されていることから、同大陸近海に広がる *U. seriolae* 天然感染魚がレゼルボアとなって海上生け簀の養殖魚に影響を及ぼす可能性について指摘している。彼らの懸念は商品価値喪失に関わる異物としてのプラズモディウムの多発や死後筋肉融解であるが、本研究で扱った材料が集団食中毒発生事例からのものであること、他に有力視される原因病原体が確認されていないことを考慮すると、近縁の多殻目 *Kudoa* 属粘液胞子虫で確認されてきた人体での食中毒原因としての可能性をも十分に検討される課題と考えた方がよいだろう。

瀬戸内産ウマヅラハギから3種の *Kudoa* spp. が本研究で検出された。これまで特に粘液胞子虫感染を検討されて来なかった魚種であり、その感染種に強く興味をもたれるところであるが、その寄生種のうちの2種は食中毒原因として注目される *K. septempunctata* と死後筋肉融解の原因として注目される *K. thyrsites* であった。また、これら2種は集団食中毒発生事例で原因魚となっている養殖ヒラメでも頻繁に記録されている (Yokoyama et al., 2004; Matsukane et al., 2010; Harada et al.,

2012; Kawai et al., 2012)。他の1種、すなわち *Kudoa* sp. A は4つの極囊/殻片をもつ放射状の胞子であるが、極囊サイズが大きくばらつく。この性質をもつ *Kudoa* 属粘液胞子虫としては、*K. thyrsites*、*K. minithyrsites*、*K. lateolabracis* 等がよく知られているが、胞子形態の計測値において違いが指摘できること、また、18S/28S rDNA 塩基配列における変異が上記の種と同一種と考えるには大きすぎる。18S rDNA および 28S rDNA 塩基配列、いずれもまだ部分的な解読にとどまっており、分子遺伝学的特徴づけを更に検討する余地がある。未記載種としての可能性は高いことから、形態学的観察を含めて十分に生物学的情報を収集し、今後の種鑑別、自然界での感染状況調査に備える必要がある。

#### E. 参考文献

1. Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-552.
2. Arai Y, Matsumoto K (1953) On a new sporozoa, *Hexacapsula neothunni* gen. et sp. nov., from the muscle of yellowfin tuna, *Neothunnus macrop-terus*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 18: 293-299.
3. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic

- S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J-M, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36: 465-469.
4. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.
5. Harada T, Kawai T, Sato H, Yokoyama H, Kumeda Y (2012) Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int J Food Microbiol* 155:161-167.
6. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T (2012) 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* 54: 1046-1052.
7. 小西良子 (2012) クドア食中毒総論. *IASR* 33: 149-150.
8. Lester RJG (1982) *Unicapsula seriolae* n. sp. (Myxosporea, Multivalvulida) from Australian yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *J Protozool* 29: 584-587.
9. Li Y-L, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Parasitol Res* 112: 1991-2003.
10. Lom J, Arthur JR (1989) A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J Fish Dis* 12: 151-156.
11. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2010) *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol Res* 107: 865-872.
12. Miller TL, Adlard RD (2013) *Unicapsula* species (Myxosporea: Trilosporidae) of Australian marine fishes, including the description of *Unicapsula andersenae* n. sp. in five teleost families off Queensland,

- Australia. Parasitol Res 112: 2945-2957. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680.
13. Naidjenova NN, Zaika VE (1970) Three new genera of Myxosporidia-fish parasites from the Indian Ocean. Zool Zh 49: 451-454.
14. 大西貴弘 (2012) 食中毒原因物質としての“クドア”に関する最新の知見. モダンメディア 58: 205-209.
15. 佐藤 宏 (2011) 食中毒の新たな寄生虫性病原体として注目される粘液胞子虫の生物学. 山口獣医誌 38: 1-26.
16. Sato H, Li Y-C, Jimenez LA, Tsuduki H, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y (2013) Two genetic lineages of *Kudoa neothunni* in tunas (*Thunnus* spp.) distributed in the western Pacific Ocean and consumed in Asian countries. In: Aquaculture 2013 Abstract [P2.061], Las Palmas, Gran Canaria, Spain, Nov. 3-6, 2013.
17. 白樫 正 (2013) 養殖マグロにみられる寄生虫. 獣医寄生虫誌 12: 95-104.
18. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
- F. 研究発表  
論文発表
1. Li Y-C, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporidia: Myxosporidia) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol Res 112: 1991-2003.
2. 佐藤 宏 (2013) 粘液胞子虫類の種鑑別・分類体系が直面する課題. 獣医寄生虫誌 12(2): 105-116.
3. Li Y-C, Sato H (2014) Two novel myxosporidian species (Myxosporidia: Bivalvulida), *Myxobolus marumotoi* n. sp. and *Cardimyxobolus japonensis* n. sp., from the dark sleeper, *Odontobutis obscura*, in Japan. Parasitol Res [Published online: 31 January 2014, DOI 10.1007/s00436-014-3776-1]
- 学会発表
1. 李 迎春, 都築秀明, 佐藤 宏, Lea Jimenez, 大西貴弘, 小西良子: キハダマグロ寄生 *Kudoa neothunni* にみられた rDNA 二型性. 第 156 回日本獣医学会学

- 術集会, 岐阜大学, 2013. 09. 20-22.
2. 李 迎春, 友知久幸, 迫田菜摘, 山木誠也, 佐藤 宏: 山口市内のドンコに寄生する *Myxobolus* 属粘液胞子虫. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜大学, 2013. 09. 20-22.
3. Binh Thi Tran, 李 迎春, Patrice Makouloutou, 山木誠也, 友知久幸, 迫田菜摘, 佐藤 宏: ベトナム産ニホンイトヨリダイから検出された粘液胞子虫 *Unicapsula pyramidata*. 第156回日本獣医学会学術集会, 岐阜大学, 2013. 09. 20-22.
4. 李 迎春, 都築秀明, Lea Jimenez, 大西貴弘, 小西良子, 佐藤 宏: キハダマグロ筋肉寄生の *Kudoa neothunni* および *Kudoa thunni* の種内 rDNA 遺伝子の変異について. 第69回日本寄生虫学会 西日本支部大会, 香川県高松市, 2013. 10. 19-20.
5. Sato H, Li Y-C, Jimenez LA, Tsuduki H, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y: Two genetic lineages of *Kudoa neothunni* in tunas (*Thunnus* spp.) distributed in the western Pacific Ocean and consumed in Asian countries. Aquaculture 2013, Poster presentation [P2.061], Las Palmas, Gran Canaria, Spain, November 3-6, 2013.
6. 佐藤 宏, Ying-Chun Li, Bin Thi Tran, 大西貴弘: 瀬戸内産マハゼからの国内未記録 *Unicapsula* sp. ならびにベトナム産ニホンイトヨリダイからの *Unicapsula pyramidata* について. 第83回日本寄生虫学会大会, 愛媛大学, 2014. 03. 27-28.
7. Ying-Chun Li, 友知久幸, 山木誠也, 佐藤宏: 山口市内の淡水魚ドンコの筋肉寄生 *Myxobolus* sp. と腸壁寄生の *Cardimyxobolus* sp. について. 第83回日本寄生虫学会大会, 愛媛大学, 2014. 03. 27-28.

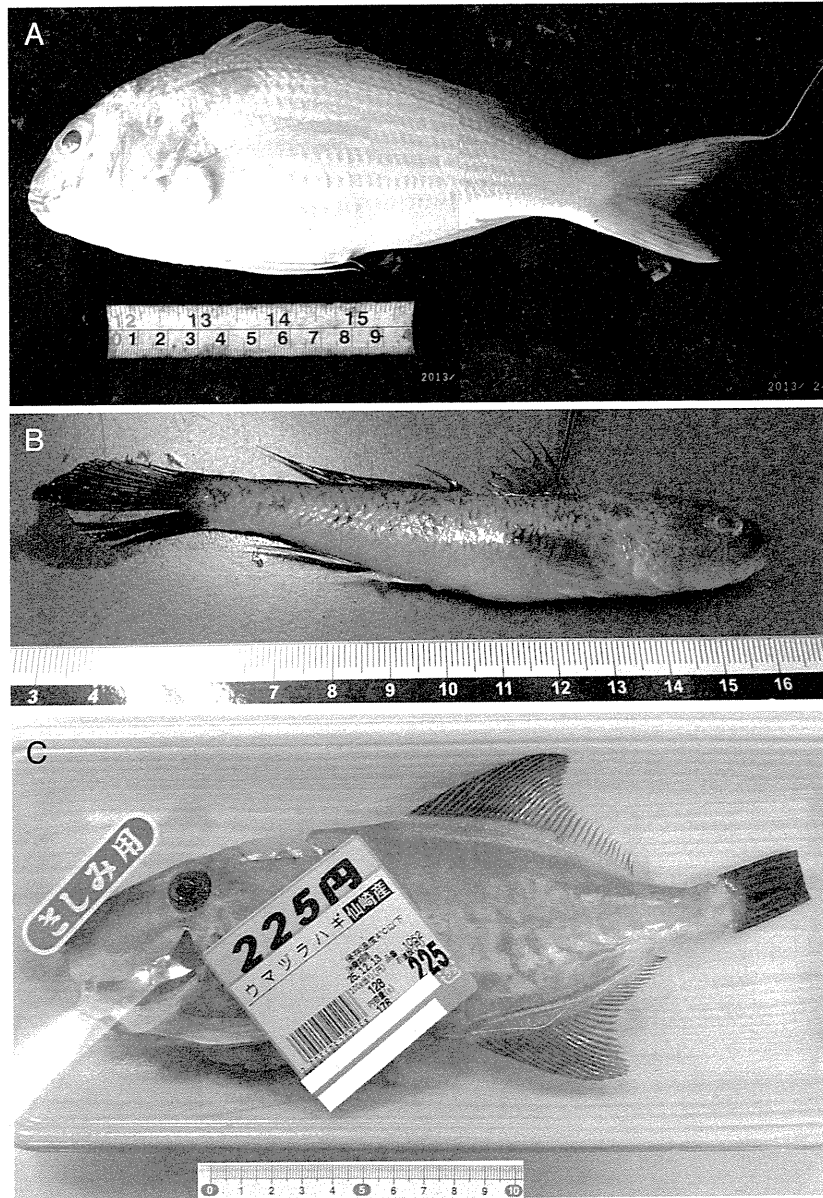


図 1 本研究で調べた海産魚。(A) ベトナム北部のハロン湾沖カットバ島にて入手したニホンイトヨリダイ(*Nemipterus japonicus*) ; (B) 瀬戸内海防府沖で漁獲されたマハゼ(*Acanthogobius flavimanus*); (C) 山口県仙崎沖日本海で漁獲されたウマツラハギ(*Thamnaconus modestus*).



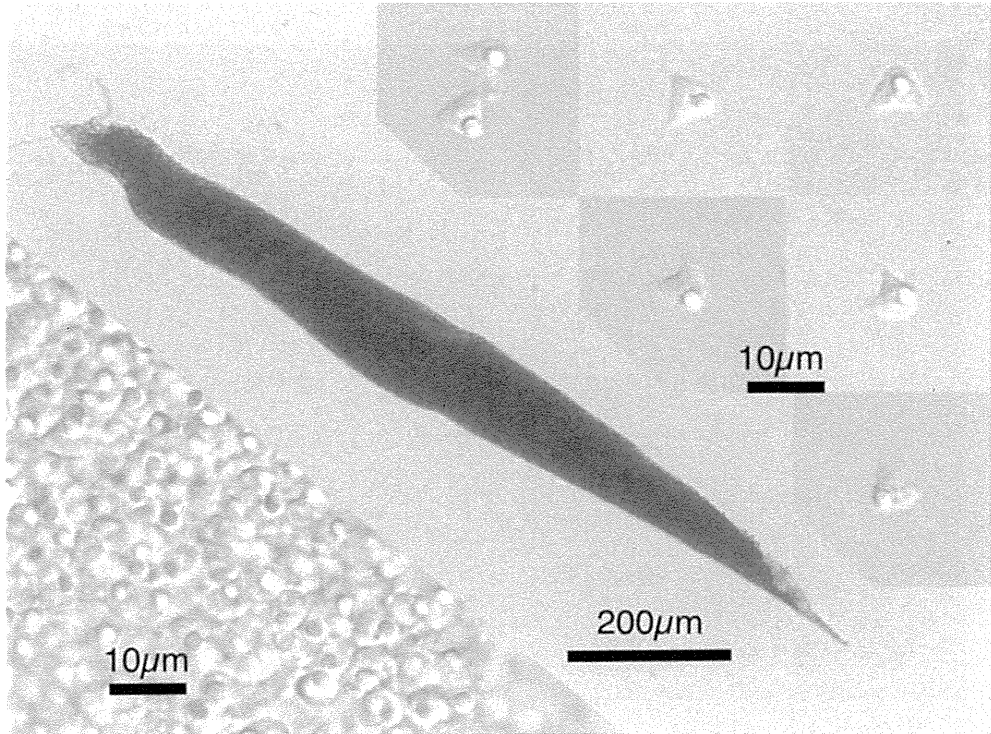


図2 ベトナム産ニホンイトヨリダイから分離した *Unicapsula pyramidata*. (右上) 胞子; (中央) 筋線維から取り出したプラズモディウム; (左下) プラズモディウムの強拡大. ホルマリン固定材料.

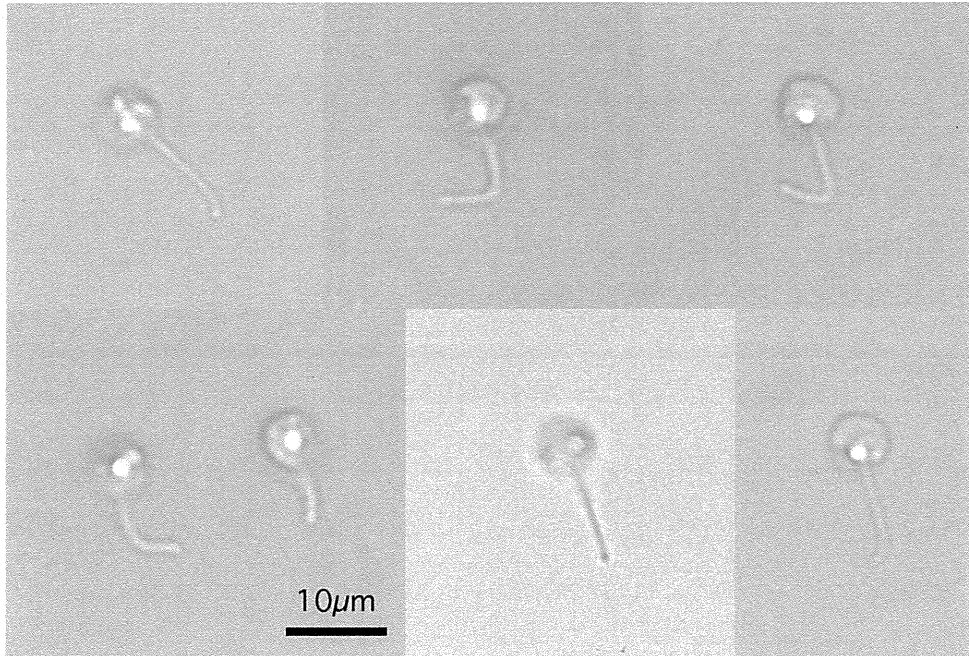


図3 瀬戸内海防府沖産マハゼの体側筋から分離された *Unicapsula* sp. A の孢子

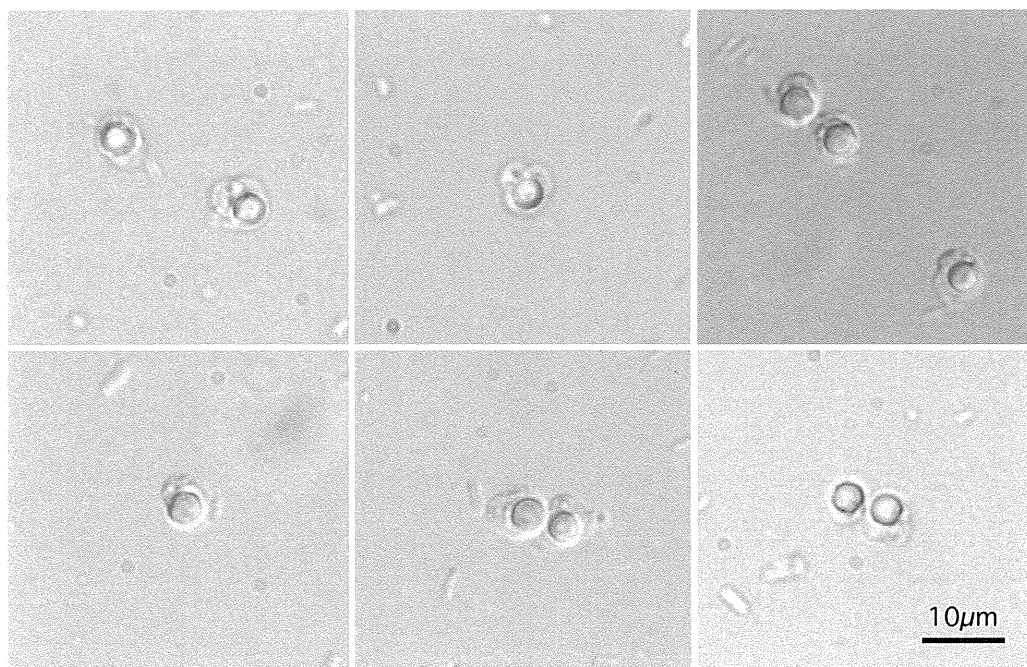


図 4 カンパチの体側筋から回収分離された  
*Unicapsula seriolae* 孢子.

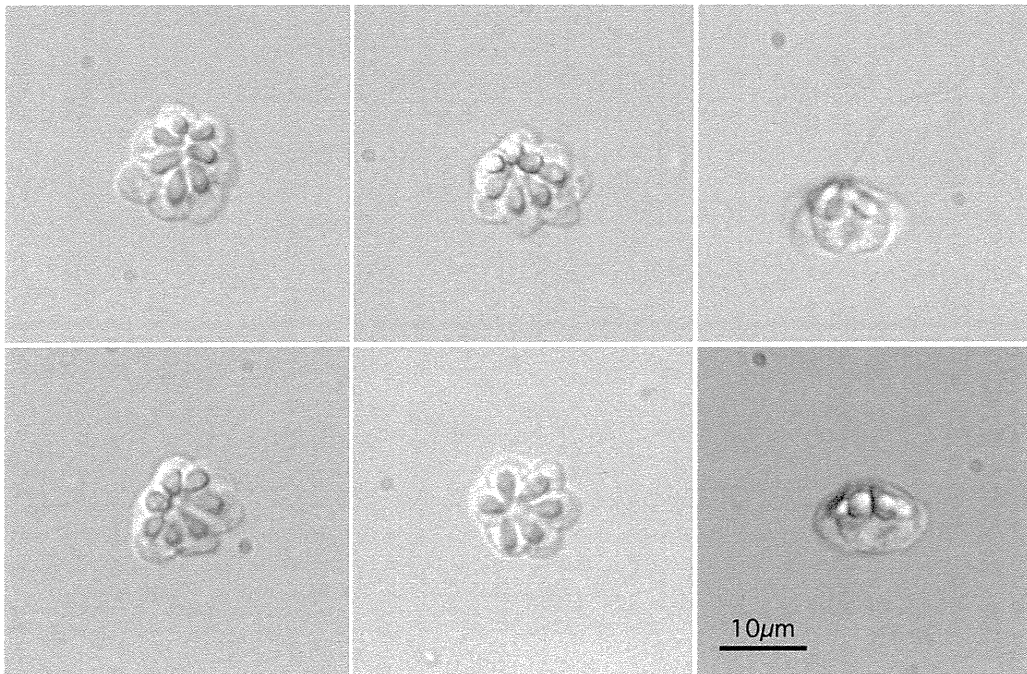


図5 山口県下関沖で漁獲されたウマヅラハギの体側筋から分離された *Kudoa septempunctata* 孢子.

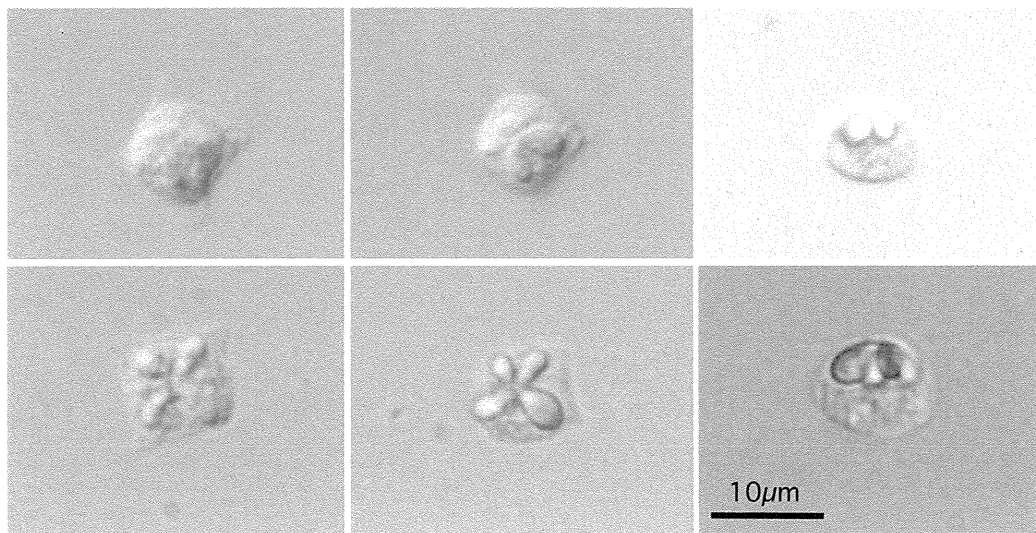


図6 山口県下関沖で漁獲されたウマヅラハギの体側筋から分離された *Kudoa* sp. A 孢子.

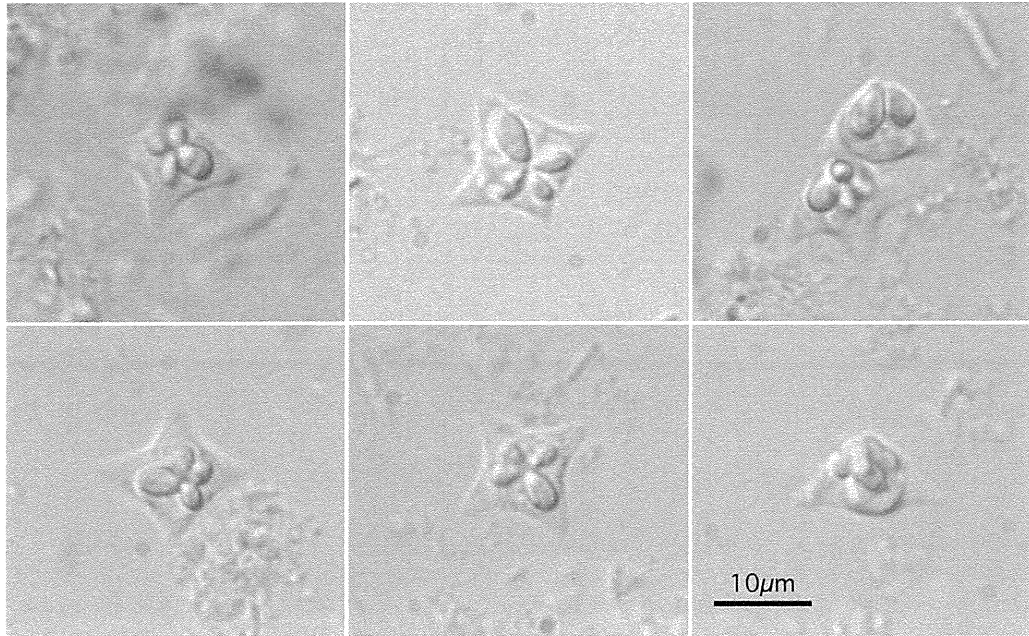


図7 山口県下関沖で漁獲されたウマヅラハギの体側筋から分離された *Kudoa thyrsites* 孢子.

```

CTGGTTGATCCTGCCAGT Kudoa-18E>>> By Whipps et al (2004)
ACCTGGTTGATCCTGCCAG Euribl>>>
CTGGTTGATCCTGCCAGT NSF4/18>>>
Unicap18S_03F      GGTGATTCTGCCAGTGATC
Unicap18S_04F      GTTGATTCTGCCAGTGATCAT
Unicap18S_05F      TCTGCCAGTGATCATATGCT
Unicap18S_06F      CCAGTGATCATATGCTCGTC

Unicap.sp.CMW2003 -----GATCATATGCTCGTCTCAAAGATTAAGCCATGCAAGTCTAAGTTCACATCAATTAAGAT
U. pyramidata-1    GGTGATTCTGCCAGTGATCATATGCTCGTCTCAAAGACTAAGCCATGCAAGTCTAAGTTCACATCATTTAAGAT
U. pyramidata-5    GGTGATTCTGCCAGTGATCATATGCTCGTCTCAAAGACTAAGCCATGCAAGTCTAAGTTCACATCATTTAAGAT
*****

```

図8 *Unicapsula* spp.の18S rDNA 5'末端側の塩基配列増幅のために検討したプライマーの相互位置を示す. 上の3つのプライマーが粘液胞子虫を含めた真核細胞ユニバーサルプライマーとして頻用されるが、*Unicapsula* spp.においては増幅がみられなかった. Unicap18S\_01F~06Fが本研究で新たに検討したプライマーであり、いずれも増幅に適していた。

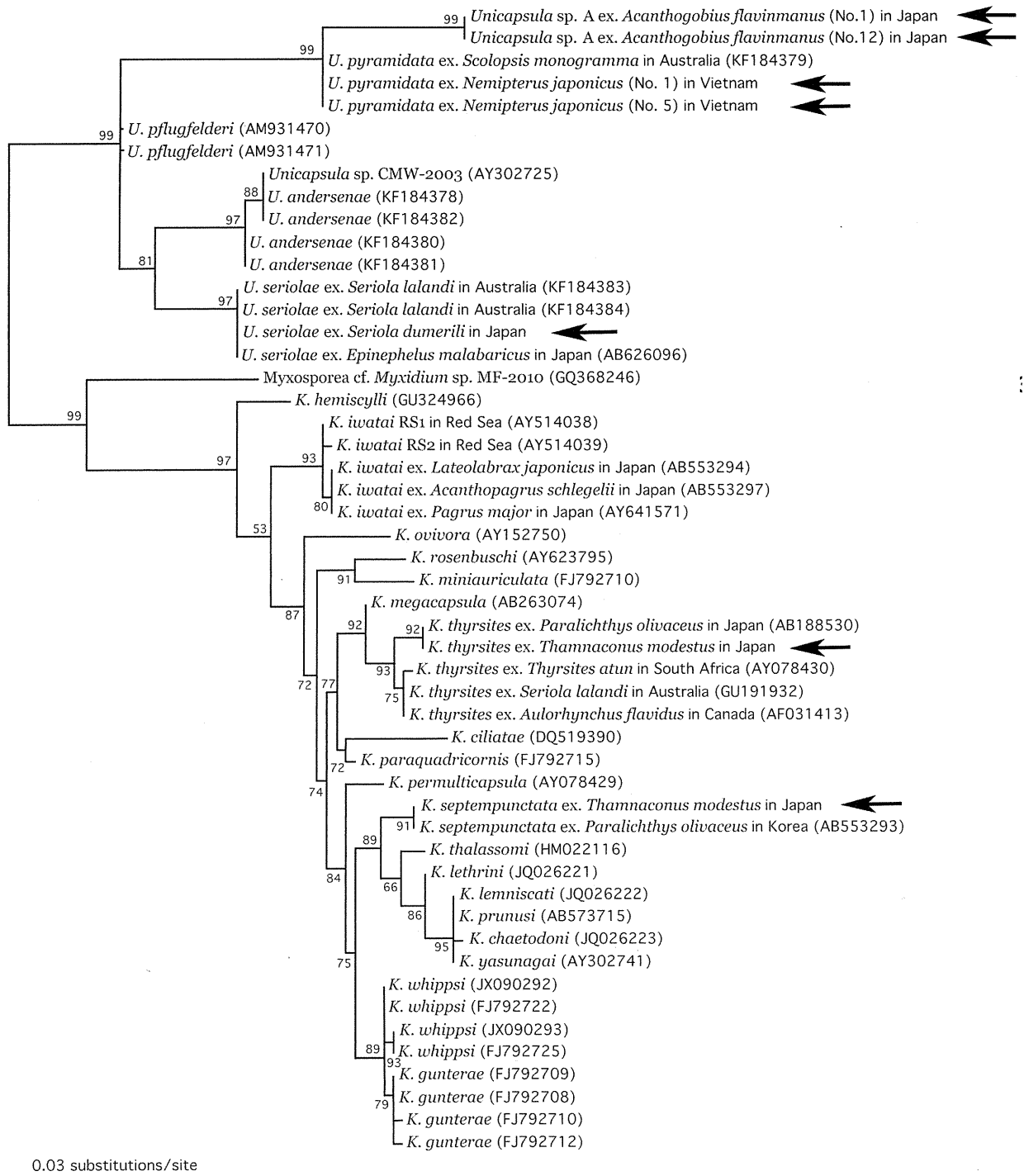


図9 本研究で分離した *Unicapsula* spp.および *Kudoa* spp.の 18S rDNA に基づく最尤法系統樹. 矢印は本研究で分離した種(分離株)を示す.



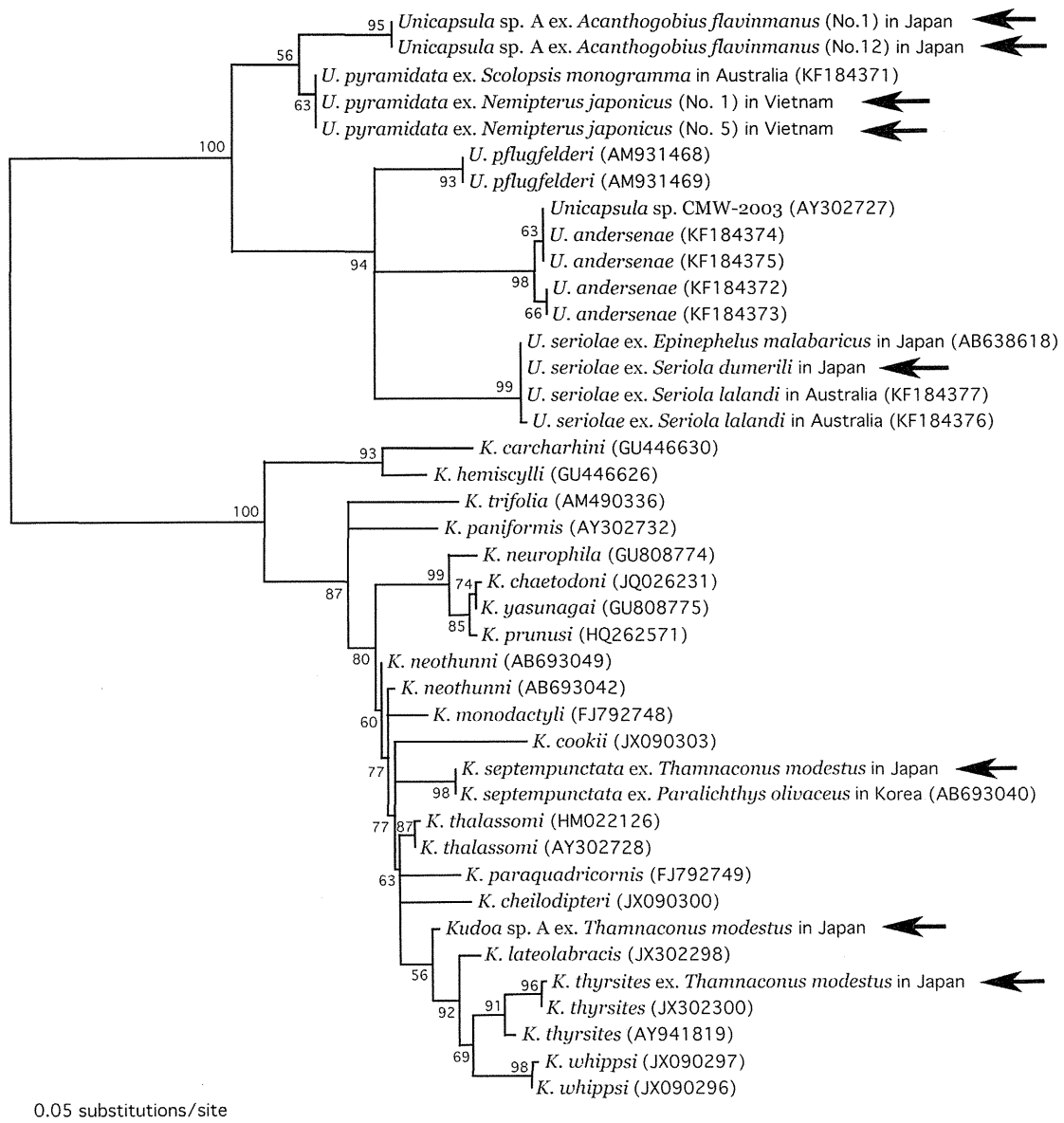


図10 本研究で分離した *Unicapsula* spp. および *Kudoa* spp. の 28S rDNA に基づく最尤法系統樹。矢印は本研究で分離した種(分離株)を示す。

分 担 研 究 報 告 書

住肉胞子虫の遺伝子検査法と毒性タンパク質遺伝子の  
性状に関する研究

鎌田 洋一

平成 25 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

住肉胞子虫の遺伝子検査法と毒性タンパク質遺伝子の性状に関する研究

研究分担者 鎌田 洋一（岩手大学農学部 共同獣医学科）

研究協力者 白藤由紀子（岩手大学農学部 共同獣医学科）

馬肉を喫食しての食中毒の原因が、*Sarcocystis fayeri* 住肉胞子虫であることが明らかになっている。*S. fayeri* の特定のタンパク質が食中毒症状を誘起する直接の原因物質であるとも明らかとなっている。2012 年には、厚生労働省より、馬肉中の住肉胞子虫の遺伝子検査法が通知されている。その検査法の対象となる遺伝子は、病原性には無関係の 18S rRNA 遺伝子で、毒性に関わる物質（遺伝子）ではない。本年度は、毒性タンパク質遺伝子をゲノムから検出する PCR 法と、18S rRNA 遺伝子の双方を同時に検出する PCR 法の開発を試みた。毒性遺伝子は 2 個のエクソンから構成されていた。PCR におけるアニーリング温度の検討を行い、3' 端側のエクソンと、18S rRNA 遺伝子の断片を増幅できる PCR 条件を設定できた。同条件の PCR により、3' 端側エクソンの増幅は明瞭であるが、18S rRNA 遺伝子の増幅が弱く、今後、最適化させる必要が認められた。シカ肉中に含まれた住肉胞子虫によって発生した有症苦情事例が報告されている。シカ由来の住肉胞子虫に対する遺伝子検査法の開発が必要となる。馬肉を対象とした遺伝子検査法である定性 PCR 法を、シカ肉に応用したところ、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子の共通配列部分の増幅が認められた。シカ肉における住肉胞子虫遺伝子検査法の確立が可能と考えられた。

#### A. 研究目的

最近まで不明だった、馬肉を喫食して起こる食中毒の原因物質が、フエイヤー住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* であることが明らかになった<sup>1)</sup>。毒性学的に検討した研究から、フエイヤー住肉胞子虫のシスト抽出タンパク質中の、分子量 15 KDa を示すタンパク質に下痢を誘発する毒性があることが明らかになっている。2012 年に発出され

た、馬肉の冷凍処理を義務付けた厚生労働省の通知によって、有症苦情事例として多数発生していた馬肉食中毒は、制御が進んでいる。馬肉食中毒事例の確定のため、また、制御施策を検討するため、厚生労働省は馬肉からの住肉胞子虫検査法を通知した<sup>2)</sup>。同検査法では、顕微鏡での虫体の検査に加え、遺伝子検査法を示している。同遺伝子検査法は、住肉胞子虫が持つ、18S rRNA

遺伝子を標的とした PCR 法で、定性的検出が可能となる。この PCR 法は、住肉胞子虫全般が持つ、18S rRNA 遺伝子の共通配列部分を増幅する。

感染性病原体の検出を目的とした遺伝子検査法を考える場合、通常は、その病原体の、症状を誘発する直接の物質の遺伝子、あるいは、その病原体のみが持つ特異的な遺伝子を標的にする。しかしながら、上述したように、馬肉からの *S. fayeri* 遺伝子の検出の場合、18S rRNA 遺伝子という、種の分別に用いる遺伝子を標的にしており、特異性に欠ける。さらに、同遺伝子の種特異的な部分を検出するのではなく、住肉胞子虫に共通の配列を標的としており、病因物質を検出するという感染症学の原則に一致しない検出法となっている。一方、同法は、厚生労働省が指定した方法で、行政的には重要な意味を持つ。したがって、住肉胞子虫の遺伝子検査法については、従来の 18S rRNA を標的にする方法に加え、病原物質を標的とする遺伝子検査を両立させることが望ましい。

住肉胞子虫は草食動物を中間宿主とする。住肉胞子虫に病原性があるとすると、草食動物であるウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等の家畜について、住肉胞子虫の危害性を考える必要がある。野生動物についても同様に考えることとなる。2013 年、シカ肉が原因とされる有症苦情事例が発生した<sup>3)</sup>。共通食のシカ肉を検査すると、住肉胞子虫が検出され、同有症苦情事例の原因物質と推定

された。シカに寄生していた住肉胞子虫の種は、馬のそれと異なっていた。一方、抗体を用いた検査から、シカ肉を汚染している住肉胞子虫のシストには、病原性タンパク質の存在が示された。これらの事実は、シカ肉に存在する住肉胞子虫の遺伝子検査法については、厚生労働省が示した検査法を順守しつつ、症状を誘発する病原物質をコードする遺伝子を検出する方法を確立すべきであることを示唆する。すなわち、住肉胞子虫の共通配列であるところの 18S rRNA 遺伝子と、毒性タンパク質遺伝子を標的とする遺伝子検査法が開発されることが望ましい。

本年度の研究目的は、フェイヤー住肉胞子虫の遺伝子検査法を、厚労省が指示する方法に準拠しつつ、病因論的に妥当な遺伝子検査法を検討するとともに、シカ肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法を確立するための基礎的検討を行うことにある。

## B. 研究方法

### 1. 住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子検査法

馬肉より、Qiagen 社の DNAeasy Blood & Tissue Kit を用い、DNA を抽出した。18S rRNA 遺伝子の共通配列 1,100 bp を増幅する PCR を行った。PCR 条件は、厚生労働省が通知した暫定法に準じた<sup>2)</sup>。

### 2. 住肉胞子虫の毒性タンパク質遺伝子検査