

平成26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）
畜産食品の安全性確保に関する研究

研究代表者 岡田 由美子（国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部）

分担研究報告書

畜産食品が原因の寄生虫性食中毒に関する研究：
遺伝子検査法の検証とエゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染調査

分担研究者 鎌田 洋一 （岩手大学農学部 共同獣医学科）

協力研究者 白藤 由紀子 （岩手大学農学部 共同獣医学科）

佐藤 弘隆 （岩手大学農学部 共同獣医学科）

畜産食品を汚染する危害の一つとして *Sarcocystis* 属住肉胞子虫の寄生がある。同寄生虫は、一過性の下痢を誘発することが証明されている。厚生労働省は、同寄生虫の暫定的検査法を通知した。同通知法における住肉胞子虫遺伝子検査法は定性 PCR 法を用い、また、少量のサンプル量であるため、検査の確実性に劣る懸念がある。また、定量的な遺伝子検査法の確立が望まれる。野生のエゾシカは、今後広く畜産食品として喫食されることが予想される。エゾシカ肉の住肉胞子虫汚染調査を行った。

S. fayeri の存在が確認された馬肉から 10 g、あるいは現行検査法で指定している 0.3 g を採取して、均質化し、それぞれの懸濁液 0.2 ml から DNA を抽出した後に、18S rRNA 遺伝子コピー数について検討した。均質化した馬肉量が 0.3 g の場合には陰性だったサンプルでも、10 g の均質化液の DNA を用いると標的遺伝子の増幅反応が検出された。また 0.3 g から DNA を得る方法で陽性だったサンプルについて、10 g から得た DNA を用いると 0.3 g の場合に比べ、より少ない相対標準偏差を示した。

均質化する馬肉量を増量し、DNA を抽出することにより、住肉胞子虫遺伝子検査法を改良できると考えられる。

エゾシカ肉 50 検体について、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子共通配列を標的に定性 PCR を行い、同寄生虫の汚染率を調査した。方法は馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法に準じた。48 検体に住肉胞子虫遺伝子を検出した。エゾシカは広く住肉胞子虫の寄生を受けており、今後、食中毒危害性を評価する必要がある。

A . 研究目的

馬肉の喫食後数、時間で一過性に下痢や嘔

吐などの消化器症状が起こり、その後短時間

で回復する事例が発生している。これまでの

研究で食中毒症状の原因が、馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* (以下、*S. fayeri*) であることが明らかになっている (1、2、3)。*S. fayeri* は馬を中間宿主、犬を終宿主としている住肉胞子虫である (1、3、4)。終宿主から排泄されたスポロシストが牧草等を汚染し、餌とともに取り込まれ、メロゴニー、その後目視できるほど大きな、多数のブラディゾイトを含むシストを筋組織に形成する。馬が終宿主に捕食され、シスト内のブラディゾイトが腸管上皮細胞でガメトゴニー、ザイゴート、その後オーシストを形成し、スポロシストとして排泄される。

馬肉喫食による有症苦情事例を検査する際に指針とされているのが、厚生労働省から通知されている遺伝子検査と顕微鏡検査を用いた検査法である。遺伝子検査は以下のように実施する。馬肉サンプルから肉片を3か所切り出し、刃物でミンチ状にする。0.3 g のミンチを採取し、TE Buffer で 1 mL にメスアップ、30 秒間激しく攪拌し、3000 rpm で 5~6 秒間、遠心分離をする。上清 200 μ L を採取し、市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。市販の PCR 用試薬キットを用いて、定性 PCR 陽性対象と抽出 DNA の定性 PCR を行い、結果をアガロース電気泳動によって確認する。住肉胞子虫 18S リボゾーム RNA 遺伝子 (以下、18S rRNA と略) を検出する定性 PCR 法である。rRNA は RNA の一種であり、その塩基配列が種の同定や分類に利用されている。定性 PCR 陽性対象において約 1100 bp の遺伝

子増幅を確認し、検体 DNA サンプルで遺伝子増幅が見られた場合、定性 PCR 陽性と判断する。検体が PCR 陽性と判定された場合に顕微鏡検査を実施する。

厚生労働省通知に基づく住肉胞子虫遺伝子の検査法は、サンプリングされた馬肉中のシストの有無が、結果に大きく影響してくる。シストが局在し、その中に極めて多量のブラディゾイトが含まれ、分布の差が著しい。現行検査法はサンプリング量が少量であるため、確実性に劣る懸念があり、安定かつ定量的な遺伝子検査法の確立が望まれる。

馬肉と同様に位置付けられる畜産食品として、シカ肉がある。「鹿刺し」と称され、馬刺し同様に喫食されてきた我が国の食文化の一つとして位置づけられる。シカは現在、家畜として管理肥育しているわけではなく、野生に生息しているシカを捕獲し、食品として提供される。そのため、既知および未知の病原体が捕獲シカに含まれる。したがって、何らかの制御がなければ人が喫食し、食中毒危害性を示す危険性を有する。一方、野生鳥獣肉はジビエと称され、最近注目されており、有害野生動物の駆除と関連して、今後、シカ肉を含めた野生動物肉は、畜産食品として我が国に普及してゆくと予想する。そのため、シカ肉の危害性を調査することは重要となる。その危害の1種として、住肉胞子虫がある。2012年に、エゾシカ肉を喫食しての、有症苦情事例が起こり、シカ肉中に住肉胞子虫の1種が発見された(5)。シカ肉中の住肉胞子虫の危

害性が具体的に示された事例となり、住肉胞子虫調査の必要性が明瞭となった。

予備試験の結果、シカ肉中の住肉胞子虫の遺伝子は、*S. fayeri* 遺伝子検査法が適応できることが明らかとなった。

本研究では同遺伝子検査法について、定量的な PCR 法を適応するのに加え、サンプリングする馬肉量について検討した。*S. fayeri* 遺伝子コピー数を、ばらつきが少なく、かつ、定量的に検出する遺伝子検査法を確立することを目的とした。さらに、市販エゾシカ肉中の住肉胞子虫汚染を、遺伝子検査法を用いて調査した。

B．研究方法

B-1. 馬肉と住肉胞子虫遺伝子検査法

本研究に用いた馬肉サンプルは、7 検体分の横隔膜を株式会社 千興ファーム（熊本県）から購入した。馬肉検体は 1～7 の番号を付けて管理した。

S.fayeri 遺伝子陽性、陰性の判定を行った。現行検査法（6）に基づき、DNA を抽出し、各検体から 0.3 g を 2 か所採取し、ミンチ状とした。TE Buffer でミンチしたサンプルを回収し、1 mL にメスアップした後、30 秒間激しく攪拌、3000 rpm で 5～6 秒間、遠心分離した。上清 200 μ L を取り、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen) を用いて DNA を抽出した。手順は Kit 付属のプロトコールに従った。抽出した DNA を用いて、定性 PCR を行った。プライマーは厚生労働省通達の現行検査法で使

用されているものを用いた（表 1）。定性 PCR の PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C、3 分を 1 ステップ、94 $^{\circ}$ C、30 秒、53 $^{\circ}$ C、30 秒、1 分を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C、5 分を 1 ステップとした。用いた試薬は 10 \times Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa) である。得た PCR 産物について、当研究室保有の *S. fayeri* 遺伝子陽性コントロールとともに、Mupid-2 plus (ADVANCE) でアガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動には 2 % アガロースゲルを用いた。DNA サイズマーカーは 100bp plus DNA ladder (BIO CRAFT)、試薬は 6x GR Green Loading Buffer (BIO CRAFT) を用いた。電気泳動後、イルミネーター (TYPE-FX $^{\circ}$ C、ATTO) で結果を観察した。約 1100 bp の遺伝子増幅産物が確認されたものを陽性と判定した。

遺伝子陰性と判定された 1 検体と陽性と判定された 2 検体で、定量 PCR を行った。各検体から、現行法に基づき 0.3 g の馬肉を 2 か所採取し、前述の方法と同様に DNA を抽出した。また、同じそれぞれの検体から、馬肉を 10 g（図 1）、2 か所採取し、ぶつ切りにしたものに PBS 30 mL を加え、ホモジナイザー (Excel Auto Homogenizer, NiSSEi) で均質化した（図 2）。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを 200 μ L 採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen) を用いて DNA を抽出した。手順はキット付属のプロトコールに従った。抽出した DNA を用いて定量 PCR を行った。使用したプライマーは、八木田 健司 博士（国立感染症研究所）が設計した *Sarcocystis* 属共

通遺伝子配列を利用したプライマーを参考に作成した(表2)。また、定量PCRのPCR条件は95℃、10分を1ステップ、95℃、30秒、60℃、1分を45サイクルとした。用いた試薬はGeneAmp SYBR qPCR Mix α (NIPPON GENE)である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems)で実験をした。NIPPON GENEから供与された*S. fayeri*遺伝子陽性コントロールを用いて、絶対定量を行った。

遺伝子陽性と判定された検体から、馬肉0.3gを8か所、馬肉10gを8か所採取した。前述の方法と同様にDNAを抽出し、遺伝子定量用のプライマーで定量PCRを行った。PCR条件は95℃、10分を1ステップ、95℃、30秒、60℃、1分を45サイクルとした。また、この結果を用いて、馬肉10g均質化検体に1~8の番号をつけ、乱数発生ソフトウェア(<http://tools.huu.cc/rand/>)によって乱数を発生させ、馬肉を20g、30g、40g用いて実験をした場合の相対標準偏差(以下、rSD)を推察した。馬肉20gを用いた場合の実験結果を推察する場合、2つの乱数を8回発生させ、出た乱数の番号の検体遺伝子コピー数に基づき標準偏差(以下、SD)およびrSDを算出した。

B-2. エゾシカ肉の住肉胞子虫遺伝子検査

エゾシカ肉50検体(横隔膜部分)は北海道のシカ肉販売業者より分与を受けた。各シカの推定年齢を調査した。

エゾシカ肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法は、

厚生労働省が通知した*S. fayeri*定性遺伝子検査法を適応した。PCR産物についてアガロースゲル電気泳動を行い、遺伝子陽性か否か判断した。

C. 研究結果

C-1 馬肉の住肉胞子虫遺伝子検査法改良の検討

定性PCR遺伝子増幅の結果から馬肉No.1~7のうち、1番は採取した2か所とも遺伝子増幅は確認されなかった(図3)。検体2番および7番は2か所採取したうち、片方のみ遺伝子増幅が確認された。また、3~6番では採取した両方で遺伝子増幅が確認された。これらの結果から、1番の馬肉検体は*S. fayeri*遺伝子陰性、2~7番の馬肉検体は*S. fayeri*遺伝子陽性と判断した。遺伝子増幅は、約1100bpの位置にバンドが確認でき、目標遺伝子増幅産物が得られていることが確認された。

*S. fayeri*遺伝子陰性検体1番と陽性検体3番および4番を用いて定量PCRを行った。馬肉0.3gを用いる方法と10gを均質化して検査に供する方法の比較を行った(表3)。遺伝子陰性と判定された1番の検体で、馬肉0.3gを用いる方法では遺伝子増幅が検出されなかったが、馬肉10gを用いる方法では遺伝子増幅が検出された。また、3番および4番の検体では、馬肉10gを均質化する方法で、0.3gを用いる方法より低いrSDが得られた。

陽性検体3番から馬肉10gを8か所採取し、均質化後、DNAを抽出した。陽性検体7番か

らは馬肉 0.3 g を 8 か所採取し、現行検査法と同様に DNA を抽出した。それぞれの抽出 DNA を用いて定量 PCR を実施した (図 4)。馬肉 10 g を均質化する方法では、馬肉 0.3 g を用いる方法よりも、低い rSD を示した。乱数発生ソフトウェアを用いた解析の結果では、想定サンプル馬肉量を増量することで、標準偏差および相対標準偏差がともに低下した (表 4)。

C-2 エゾシカ肉における住肉胞子虫汚染状況

厚生労働省が通知した住肉胞子虫遺伝子定性検査法が妥当かどうか、シカ肉よりシストを取り出し、DNA 抽出を行った。住肉胞子虫遺伝子定性 PCR を、抽出 DNA に適応したところ、明瞭に遺伝子増幅が確認された (図 5)。以上の結果は、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子定性検査法が、シエゾシカ肉中の同寄生虫遺伝子検査に適應できることを示している。

エゾシカ肉より DNA を抽出し、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子共通配列について、PCR を行った。50 検体の PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像の結果を図 6 - 1 ~ 6 - 4 に示す。50 検体のうちの 48 検体から、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子の増幅が確認された。

エゾシカの推定年齢と、遺伝子陽性率との関係を表 5 に示す。遺伝子陽性率が非常に高いため、推定年齢との関係は不明だった。

D . 考察

現行の住肉胞子虫遺伝子検査法に基づき 0.3 g の馬肉を採取し、DNA を抽出、定量 PCR に用いる場合、遺伝子コピー数のばらつきは非常に大きいことがわかった。馬肉 10 g を均質化後、DNA を抽出し、定量 PCR に用いる方法で、よりばらつきの少ない結果が得られた。また、サンプリング量を 10 g、20 g、30 g、40 g と増量した場合のばらつきを推定すると、増量とともに相対標準偏差が低下した。この結果は、遺伝子コピー数のばらつきを減少させるためには、検体から DNA を抽出する前に、多量の検体を均質化することが有効であることを示している。しかしながら、多量の馬肉サンプルを用いて検査することには困難が伴うこともある。単純に増量していくだけではない工夫が求められる。

北海道に生息するエゾシカについて、住肉胞子虫の汚染状況を調査した。その結果、96% のエゾシカ肉中から住肉胞子虫遺伝子が検出され、同胞子虫の汚染が蔓延している危険性が推察された。エゾシカ肉が食用に転用される実績がすでにあり、今後、大きく発展する可能性がある。エゾシカ肉中における住肉胞子虫の危害性を評価する必要がある。

住肉胞子虫は、ウマやシカの筋肉中にシストとして寄生する。住肉胞子虫の寄生は宿主の健康に影響を与えず、シスト中のブラディゾイトは、宿主が死なない限り、シスト内に最大数まで増殖する。ウマやシカの年齢が高まるにつれ、住肉胞子虫の寄生率が上昇するこ

とが推察される。また、スポロシストを継続的に摂取すれば、住肉胞子虫の汚染は深刻化する。本報告で示したように、定性 PCR では、エゾシカの年齢と住肉胞子虫寄生との関係は非常に頻度の高いものではあるが、汚染の濃淡は判断できない。年齢との関係も不明である、今後、住肉胞子虫遺伝子の定量的解析をする必要がある。

E . 参考文献

- 1) 斉藤 守弘. *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒. 2012. 獣医疫学雑誌 . 16(2) , 114-125
- 2) 鎌田 洋一. *Sarcocystis fayeri* を含んだ馬肉による食中毒. 食品衛生研究 .61.11 ,21-27. 2011.
- 3) Dubey,J.P., Streitl,R.H., Stromber,P. Toussan,C.M.J. *Sarcocystis fayeri* sp. n. From the horse. J. Parasitol . 63 , 443-447 . 1977 .
- 4) Fayer , R., Dubey, J. P. Development of *Sarcocystis fayeri* in the equine . J. Parasitol . 68 , 856-860 . 1982.

5) 青木佳代、石川和彦、林 賢一、斉藤守弘、小西良子、渡辺麻衣子、鎌田洋一：シカ肉中の *Sarcocystis* が原因として疑われた有症苦情、食品微生物学雑誌、90、28-32、2013.

6) *Sarcocystis fayeri* の検査法について(暫定版)
厚生労働省 .
http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/110823_01.pdf

F . 研究発表

1) 鎌田洋一他、2014 . 厚生労働省食中毒統計にみる寄生虫性食中毒 . 食品衛生研究 投稿中。

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 . 馬肉サンプリング量 10 g (左)と 0.3 g (右)



図 2 . 実験に使用したホモジナイザー (Excel Auto Homogenizer, NiSSEi)

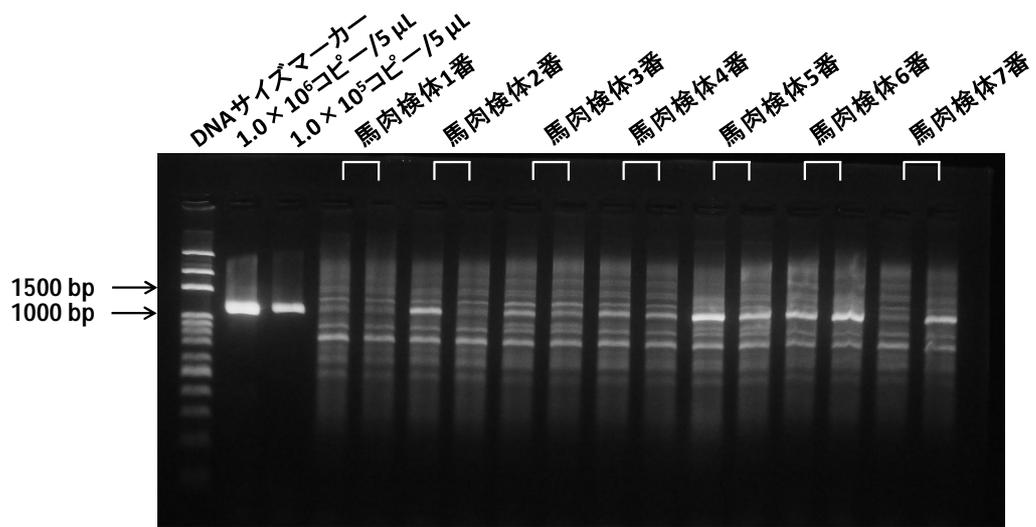


図3 . 馬肉の *Sarcocystis fayeri* 18S rRNA 遺伝子検出定性 PCR

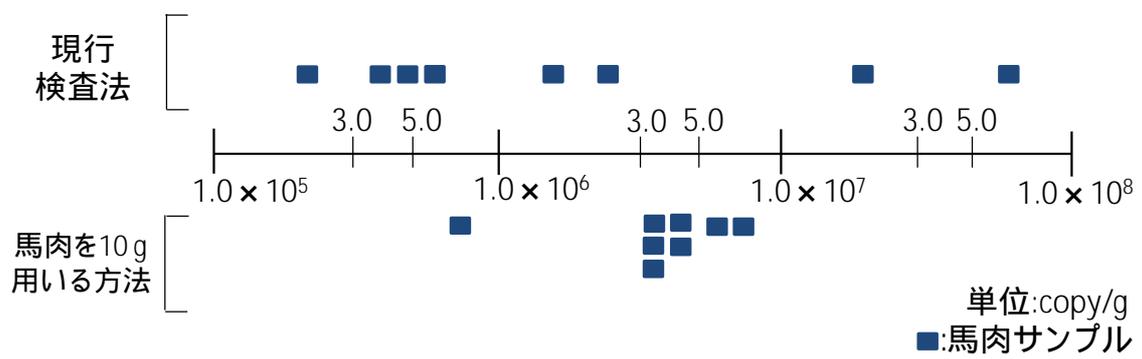
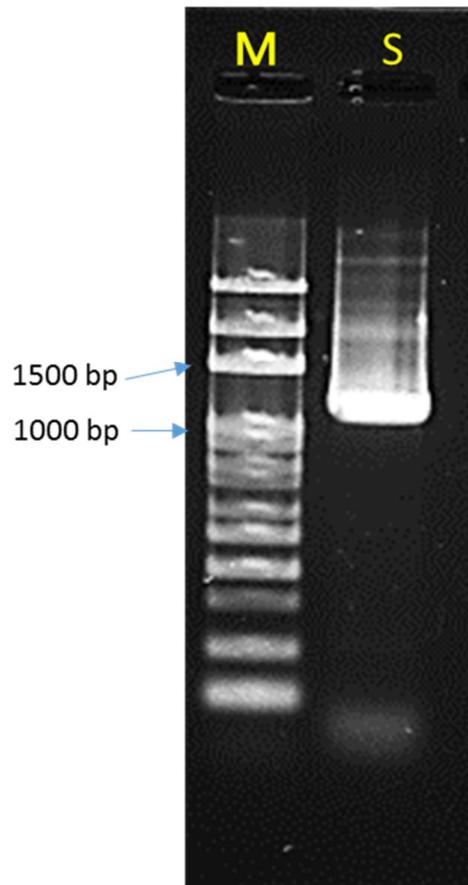


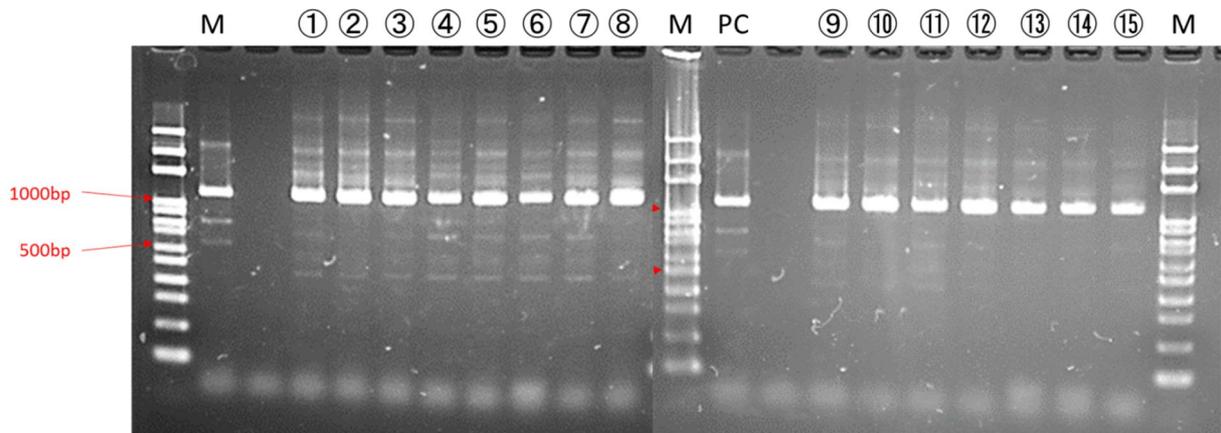
図4 . 現行検査法および馬肉 10 g 用いる方法での定量 PCR の結果のばらつき



M₁ : 100bp Plus DNA Ladder

S: Sarcocystis

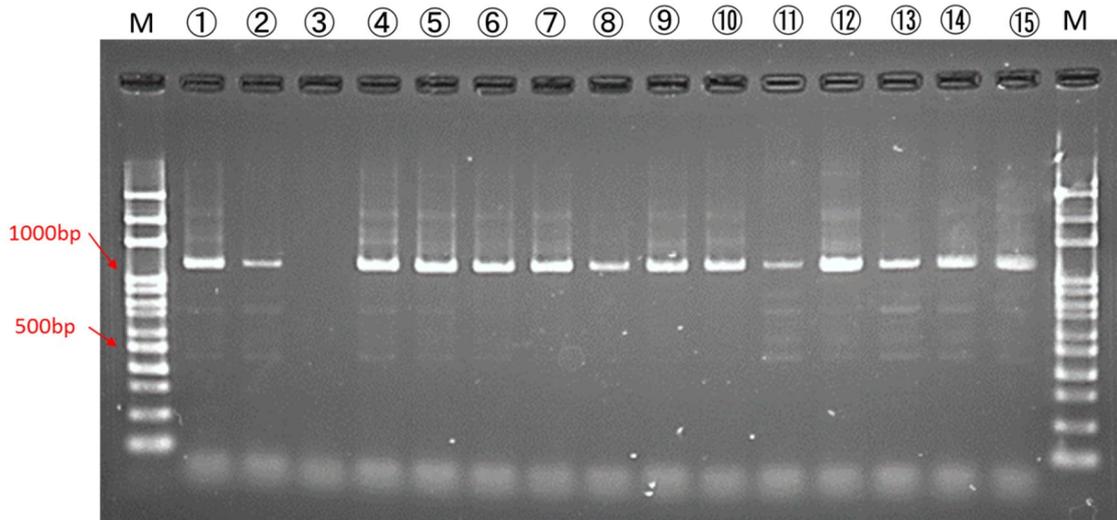
図5 . エゾシカ肉より分離した単一シストから抽出した DNA の
馬肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査法への適応



M: Marker PC: Sarcocystis cyst

- | | | | |
|--------------|--------------|---------------|---------------|
| ①: deer No.1 | ⑤: deer No.5 | ⑨: deer No.9 | ⑬: deer No.13 |
| ②: deer No.2 | ⑥: deer No.6 | ⑩: deer No.10 | ⑭: deer No.14 |
| ③: deer No.3 | ⑦: deer No.7 | ⑪: deer No.11 | ⑮: deer No.15 |
| ④: deer No.4 | ⑧: deer No.8 | ⑫: deer No.12 | |

図 6 - 1 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査



M : 100bp Plus DNA Ladder

①: deer No.16

⑤: deer No.20

⑨: deer No.24

⑬: deer No.28

②: deer No.17

⑥: deer No.21

⑩: deer No.25

⑭: deer No.29

③: deer No.18

⑦: deer No.22

⑪: deer No.26

⑮: deer No.30

④: deer No.19

⑧: deer No.23

⑫: deer No.27

図6 - 2 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査

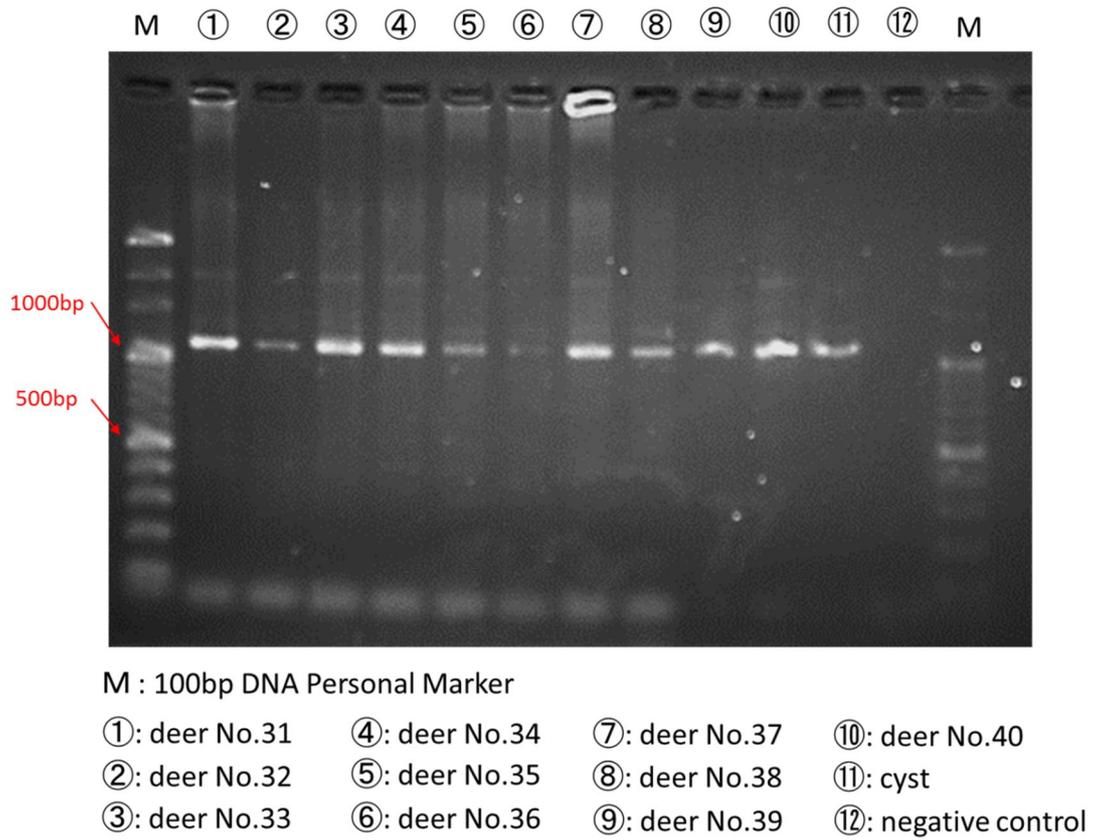
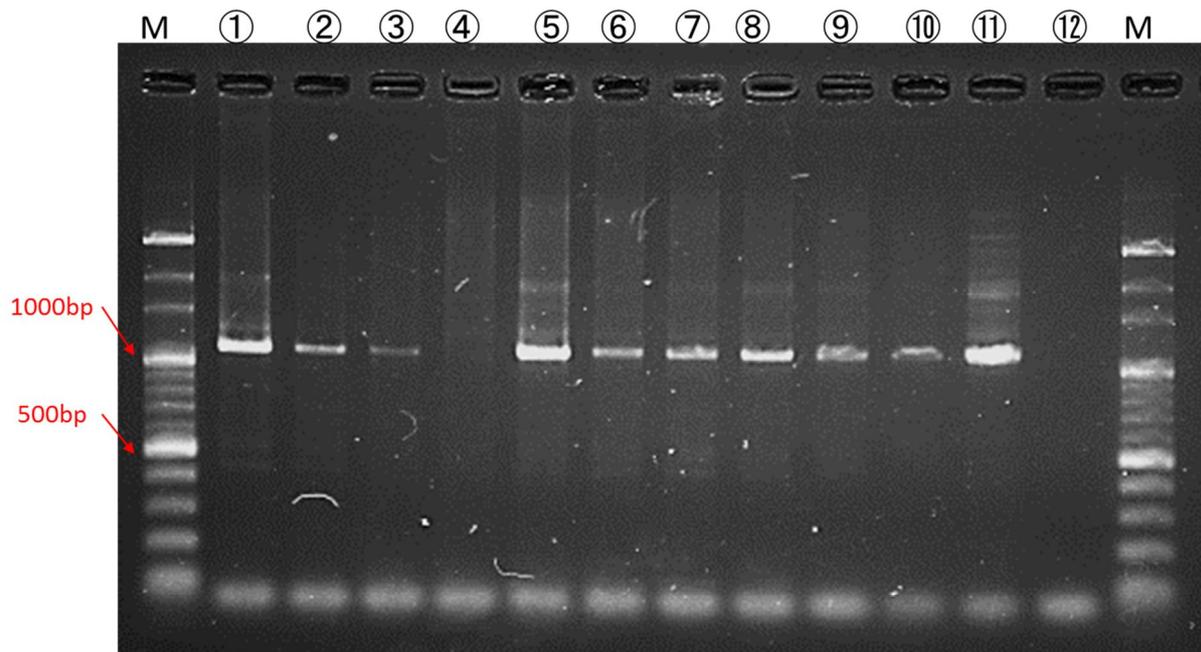


図6 - 3 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査



M : 100bp DNA Personal Marker

①: deer No.41

④: deer No.44

⑦: deer No.47

⑩: deer No.50

②: deer No.42

⑤: deer No.45

⑧: deer No.48

⑪: cyst

③: deer No.43

⑥: deer No.46

⑨: deer No.49

⑫: negative control

図6 - 4 エゾシカ肉中の住肉胞子虫定性遺伝子検査

表 1 . 定性 PCR で用いた *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子を検出用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 サイズ (bp)
<i>Sarcocystis</i> 18S-1F	GGATAACCGTGGTAATTCTATG	約 1100
<i>Sarcocystis</i> 18S-11R	TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG	

表 2 . 定量 PCR で用いた *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子を検出用プライマー

プライマー	塩基配列 (5'-3')	PCR 産物 サイズ (bp)
<i>Sarcocystis</i> qRT-1F	GATACAGAACCAATAGGGACATCAC	140
<i>Sarcocystis</i> qRT-3R	ACTACCGTCGAAAGCTGATAGG	

表3 . 現行検査法と馬肉 10 g を均質化する方法での定量 PCR

Sample No.	現行検査法			馬肉 10 g を用いた方法		
	18S rRNA gene (copy/g)	SD	rSD	18S rRNA gene (copy/g)	SD	rSD
1	1*	Undetected	---	10304000	7277790	141.1%
	2*	Undetected	---	11651		
3	1*	7015800	1898497	13265600	5326494	31.4%
	2*	4330920		20798400		
4	1*	4370520	1854628	13830400	712763.6	5.0%
	2*	6993360		14838400		

*1 サンプルあたり duplicate で実験し、SD および rSD を算出した。

表 4 . 馬肉中住肉胞子虫定量的遺伝子検査における
馬肉サンプル量についての統計学的解析

方法	サンプル量	標準偏差	相対標準偏差
実測	0.3 g	23927779	210.5 %
実測	10 g	1934402	44.7 %
乱数法	20 g	1710256	38.5 %
乱数法	30 g	1201308	26.7 %
乱数法	40 g	882867	21.1 %

表5 . エゾシカ中の住肉胞子虫検出率とシカの年齢との関連

年齢	検出	年齢	検出
0	6/7	5	7/7
1	6/6	6	1/1
2	2/2		
3	11/11	8	2/2
4	13/14		

陽性数 / 検体数