

平成 27 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

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：
牛肉中の食中毒危害性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 三井 太平 （岩手県食肉衛生検査所）

畜産食品には微生物や化学物質等、各種の有害物質の汚染がある。その一つとして、寄生虫が認識されている。草食および雑食動物である家畜においては、*Sarcocystis* 属住肉胞子虫が危害の一種となっており、馬肉食中毒に代表されるように、畜産食品による寄生虫食中毒が発生している。国民によく食されている牛肉について、その有害性を調査した研究がない。また、牛肉を対象とした住肉胞子虫検査法も検討されていない。薄切切片を観察する古典的な方法で、牛の可食部、その他の部位の肉を検索したところ、*S. cruzi* の寄生を否定できる部位がなく、牛肉について、住肉胞子虫の有害性を検証する必要性を認めた。牛の個体によって、また、部位によって、住肉胞子虫の多少が確認された。馬肉を対象としての住肉胞子虫遺伝子検査法が牛肉に適応できるか検証した。牛肉から抽出した DNA をテンプレートに、住肉胞子虫の 18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR を行った。その結果、馬に寄生していた *S. fayeri* 虫体から抽出した DNA と同様の結果を得、牛肉に、現行の住肉胞子虫定性 PCR 法が適応できることが確認された。

牛肉の薄切切片を観察してのシスト陽性率および陰性率を把握した後、遺伝子検査法結果の陽性率および陰性率をそれぞれ比較した。薄切切片でのシスト陽性件数のおよそ半分が遺伝子検査陰性だった。また、薄切切片でのシスト陰性件数もその半分が遺伝子検査陽性だった。シストの存在比率と、遺伝子検査陽性比率が大きくかい離していた。

以上の成績から、牛肉においては、寄生する住肉胞子虫の病原性の強さが不明であり、住肉胞子虫の有害性を排除できず、今後検証する必要があること、住肉胞子虫の検査法、特に遺伝子検査法について、食中毒原因を診断する方法として定性 PCR 法は問題ないと考えられた。一方、有害性を評価するには、病原性に関する知見の蓄積が必要であり、また検査法としては牛肉の処理量と、定量性を持った検査法が必要であることが示唆された。

A . 研究目的

馬肉食中毒が認知されてきた。馬肉の喫食後数、短時間で、一過性に下痢や嘔吐などの消化器症状が起こり、長くとも数日で回復す

る(1)。事例が分析され、馬肉中に存在する住肉胞子虫によって食中毒が発生することが明らかになった(1)。住肉胞子虫は草食動物である中間宿主の筋肉中にシストとして寄生する。

シスト中には多数の成熟虫体であるブラディゾイトが集積している。馬に寄生している住肉胞子虫は *Sarcocystis fayeri* とされている。患者喫食馬肉や単離した *S. fayeri* のシストを用いた分析から、ブラディゾイト中に含まれるタンパク質が、直接の下痢誘発物質として同定された(2)。

S. fayeri はイヌあるいはイヌ科の動物を終宿主、草食動物であるウマを中間宿主とする住肉胞子虫である(3 - 5)。終宿主から排泄されたスポロシストが牧草等を汚染する。ウマが牧草を食べる際にスポロシストが取り込まれ、メロゴニーが誘発され、その後、長さ1 cm 前後、幅1 mm 前後のシストを筋組織に形成する。シストを含んだ馬肉を終宿主のイヌあるいはイヌ科動物が捕食すると、シストは胃を通過し、腸内でブラディゾイトを放出する。腸管上皮細胞に侵入したブラディゾイトは、その後ガメートゴニーを経、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(5)。

厚生労働省が馬肉中の住肉胞子虫を検査する方法を通知している。住肉胞子虫の18S rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子検査と、顕微鏡を用いた検査法で、遺伝子検査は、定性法として、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 µL 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 rRNA 遺伝子を検出する定性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。

上述したように、住肉胞子虫は、草食動物

と肉食動物で寄生環が維持されている(図1)。家畜も例外なく住肉胞子虫の寄生を受ける。ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジにそれぞれ、固有の住肉胞子虫と、それら胞子虫が次世代を作る終宿主が明らかになっている(表1)。馬肉食中毒の原因が住肉胞子虫であることが明らかになった後、食中毒危害性の観点から、ウシにおける住肉胞子虫寄生状況を調べた報告がある(6)。岐阜県のと畜場での成績であるが、分離したシストの形態情報と、18S rRNA 遺伝子の塩基配列解析から、分離した住肉胞子虫が *S. cruzi* であることを確認後、顕微鏡検査によって、乳廃用牛ホルスタイン種53頭、肥育牛黒毛和種56頭、交雑種62頭が調べられた。検査部位は心筋で、実体顕微鏡および薄切切片のヘマトキシリン・エオシン(HE)染色標本中にシストが確認できればシスト陽性とし、HE染色標本では、シストの個数も計数している。シスト陽性率は、乳廃用牛94.3%、肥育黒毛和種牛53.6%、交雑種32.3%となっている。標本中の *S. cruzi* は、上述した毒性タンパク質の抗体で染色され、*S. cruzi* は、*S. fayeri* が持つ毒性タンパク質と免疫学的に交差性のあるタンパク質を保有することを明らかにしている。心筋における *S. cruzi* の汚染頻度は高く、また、毒性タンパク質が保有されていることから、*S. cruzi* の危害性を明確化する必要がある。一方、海外のウシにおける *S. cruzi* の寄生について文献を検索したところ、*S. cruzi* が寄生した牛肉の喫食が原因と断定された食中毒は報告されていない。また、*S. cruzi* の病原性の強さに関する報告もなされていない。

本年度は、牛の可食部やその他の部位の肉について、住肉胞子虫の遺伝子検査法を適応し、*S. cruzi* の汚染状況を調査し、牛肉の、住肉胞子虫による危害性を調査する際の方法論を整備することを目的とする。

B . 研究方法

B-1. 牛肉における住肉胞子虫検査

平成25年11月中旬に、岩手県食肉衛生検査所

に病畜として搬入されたウシ 6 頭を用いた。ウシの品種はホルスタイン種で、月齢は 44 ~ 101 カ月齢、すべてメスで、岩手県産である。各牛からそれぞれ筋肉 8 ~ 9 カ所、計 52 カ所を採材した。

採取部位は、心筋、横隔膜筋、咬筋、ネック、カタ、リブローズ、ヒレ、モモ、舌を選出した。

1) 組織標本中の住肉胞子虫検出

材料 1 検体あたり 2 x 2 x 2 cm のブロックを切り出し、10%中性ホルマリン緩衝液で固定した。固定したブロックについて、筋肉の走行に垂直に切り出し、常法に従ってパラフィン包埋した。薄切し、HE 染色を施した。染色後の切片 1 x 1 cm 中の、住肉胞子虫シストを計数した。住肉胞子虫のシストは、内部に、ヘマトキシリンに染まるブラディゾイトを多数含んだ袋状の構造物として検出される。

2) 住肉胞子虫遺伝子検査法

厚生労働省が通知した、馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法(7)を参照した。採材した肉検体から 0.3 g を取り出し、ミンチ状とした。ミンチを 1.5 ml のエッペンチューブに移し、TE 緩衝液を加えて 1 ml とした。チューブを 30 秒間激しく振盪させた。卓上の遠心分離器を用いて 3,000 rpm で約 10 秒間遠心分離し、上清を回収した。この軽度の遠心分離によって、肉片は沈殿し、ミンチ中に含まれるブラディゾイトあるいはシストは、上清に回収される。0.2 ml の上清から、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて、DNA を抽出精製した。

以下の方法で、住肉胞子虫 18S rRNA 遺伝子を標的とする DNA 断片の増幅と、アガロースゲル電気泳動を行い、住肉胞子虫の定性 PCR 法による試験を行った。

プライマーは厚生労働省通知のものを用いた。PCR 条件も含め、表 2 に記載した。用いた試薬は 10 x Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa)である。得た PCR 産物について、研究室保有の *S. fayeri* 18S rRNA 遺伝子増幅断片陽性コントロ

ールとともに、Mupid-2 plus (ADVANCE) でアガロースゲル(2%)電気泳動を行った。DNA サイズマーカーには 100bp plus DNA ladder (BIO CRAFT)を、検体の添加には 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、ATTO) で結果を観察した。陽性の判断基準として、約 1,100 bp の遺伝子増幅産物が確認されることとした。

B-2 住肉胞子虫毒性タンパク質の検出

S. fayeri が持つ下痢誘発毒性タンパク質に対する抗体を用いて、検査筋肉中のシストの、免疫学的交差性のある毒性物の存在を検証した。同抗体は、国立医薬品食品衛生研究所でウサギを用いて作成されたポリクローナル抗体で、*S. fayeri* 虫体から分離された 15kDa タンパク質への抗体を示している。

上に記載したパラフィン切片について、脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体(Sigma)、および発色剤としてペルオキシダーゼ染色 DAB キット Brown Stain (ナカライテスク)の順で反応させた。封入後、光学顕微鏡下で、陽性の指標として褐色反応があるかどうか確認した。

C. 研究結果

C-1 牛肉中の住肉胞子虫顕微鏡検査

咬筋の薄切 HE 染色標本中に、エオシンに強く染まる筋線維のなかで、同じくエオシンに染まるシスト壁に囲まれ、ヘマトキシリンに強く染色される構造物を認めた。同構造物はブラディゾイトを包有した住肉胞子虫のシストと判定された(図 2)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。

C-2 抗 *S. fayeri* 毒性タンパク質抗体を用いた住肉胞子虫シストに対する免疫組織学的検証

咬筋のパラフィン切片標本を脱パラフィンし、抗毒性タンパク質抗体で処理した。光学

顕微鏡で観察したところ、前述の、住肉胞子虫のシストと認識される構造物が、褐色に染色された。シストを観察すると、褐色に染色されるのはシスト内の多数の構造物であり、ブラディゾイトが染色されていた。この染色状態は、これまで報告されている馬肉(1)、および牛肉(心筋)(6)と同一だった。以上の結果は、馬に寄生する *S. fayeri* が持つ下痢誘発毒性タンパク質と免疫学的に交差する物質が、ウシに寄生している住肉胞子虫にも存在すること、また、心筋だけでなく咬筋を寄生部位とする住肉胞子虫にも同タンパク質が存在する可能性が高いことを示している。また、咬筋に寄生する構造物が、*S. cruzi* であることを裏付ける。

C-3 顕微鏡下で計数した牛肉中住肉胞子虫シスト数

6頭の牛の9部位における、住肉胞子虫のシストを計数した(図3)。6頭の牛のいずれかの部位に、住肉胞子虫シストを確認した。シストが最も効率に検出される部位は心筋で(100%)、次に横隔膜筋および咬筋(83.3%)だった。9カ所すべての部位からシストが検出されたのは6頭のうち、2頭だった。

シストの数を測定した。個体によって変動がみられたが、心筋では、1cm²当たりの平均シスト数は、0.1から3.5を示した。心筋が最もシスト数の多い部位だった。次にシストが多く観察された部位はヒレで、以下ネック、舌と続いた。

C-4 牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査

ウシの筋肉各部位から抽出したDNAをテンプレートとして、住肉胞子虫遺伝子検出操作を実施した。住肉胞子虫遺伝子用のPCRの条件は馬肉について検討されたものであるため、馬肉より抽出した *S. fayeri* 虫体から抽出したDNAを陽性対象とした。図3に示すように、30サイクルのPCRで、*S. fayeri* 由来DNAでは、約1,100bpの位置に非常に明瞭なDNA断片のバンドを検出した。陽性対象ほ

どではないが、ウシのネック部、横隔膜、舌からのDNAについて、約1,100bpのDNAの増幅が確認された。DNAサイズが同様で、明確にバンドが検出されたことから、食中毒診断を目的としての馬肉中の住肉胞子虫(*S. fayeri*)を対象とした遺伝子定性検査法は、牛肉より抽出したDNAへの応用が可能であると判ぜられた。

C-5 牛肉中の住肉胞子虫検出に関する顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関

顕微鏡下による住肉胞子虫シストの確認と、同一筋肉部位から抽出したDNAをテンプレートとした、住肉胞子虫遺伝子検査結果の相関を検討した。表3にその結果をまとめた。顕微鏡下で陽性だった38検体のうち、遺伝子検査陽性だったのは20、陰性は18だった。顕微鏡下でシストが確認できなかった14検体については、それらのうちの7検体から住肉胞子虫の遺伝子増幅が確認された。以上の結果は、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が、大きくかい離することを示している。

D. 考察

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適用し、その妥当性を検討した。また、牛6頭の、各々8~9カ所の筋肉部位について、住肉胞子虫を検出する顕微鏡検査と遺伝子検査の両方を実施し、その検出率の優劣と相関を検討した。同寄生虫の寄生の程度について考察した。

現行の住肉胞子虫を顕微鏡下で確認する方法は、筋肉片の均質化液を光学顕微鏡で観察し、遊離してくるブラディゾイトを確認するか、実体顕微鏡を用いて筋肉片からシストを摘出してシストを確認、その後シストから遊出するブラディゾイトを確認するとなっている。この方法では、ブラディゾイトを検出するのに習熟した技術を要求され、顕微鏡検査を正当に行えない危険性がある。そのため、古典的で、かつ、手間暇を要求されるが、薄切切片を作製し、ヘマトキシリンに濃染する

ブラディゾイトの集団と、それらを取り囲むシストを光学顕微鏡下で確認する方法を採用した。

牛の咬筋を観察したところ、明瞭なブラディゾイトの集団とそれらを取り囲むシストを確認した。シスト壁の構造から、検出した住肉胞子虫は *S. cruzi* と判定された。結果には示していないが、遺伝子検査で実施して得た PCR 産物の塩基配列を調べたところ、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子と相同性があることが確認された。

同シストに対し、*S. fayeri* から分離された下痢誘発性毒性タンパク質への抗体による免疫染色を行ったところ、陽性反応が得られた。ウシについては、心筋において、毒性タンパク質を保有する *S. cruzi* の存在が報告されている。本研究では、咬筋においても下痢誘発性毒性タンパク質を有する *S. cruzi* の寄生が確認された。

牛の咬筋あるいは、可食部の筋肉の全てから、住肉胞子虫のシストが顕微鏡下で確認された。そのシスト数には多少があり、検出されない部位もあった。しかしながら、検査を行った 6 頭すべてにおいて、共通してシストが検出されなかった部位はなく、住肉胞子虫の危害について牛体の中で例外部位はないと考えるべきと推察する。

厚生労働省が通知する、馬肉を対象とした遺伝子検査法を牛肉に適用できるか検討した。馬肉から抽出した *S. fayeri* 虫体からの抽出 DNA と同様、牛の咬筋や舌から抽出した DNA をテンプレートに PCR を行ったところ、同じ DNA サイズのバンドが、牛由来 DNA でも明瞭に観察された。副次的なバンドも多少あるものの、検査結果の評価に支障はなく、馬肉における住肉胞子虫遺伝子検査法が、牛肉にも適用可能なことが確認された。

牛肉中の住肉胞子虫について、薄切切片でシストを確認する方法と、適用可能なことが明らかになった遺伝子検査法との相関を検討した。薄切切片でシスト陽性が確認された検体のおよそ半分しか遺伝子検査陽性とならな

かった。さらに、薄切切片でシスト陰性となった検体の半分は、遺伝子検査陽性となり、遺伝子検査結果と顕微鏡検査の結果が大きくかい離した。

筋肉の薄切切片を染色し、住肉胞子虫のシストを確認する方法の信頼度は高い。シストを 1 つでも確認できれば陽性を示すことができる。しかし、同法はブロック状の筋肉組織の、数 μm における検査である。一方、遺伝子検査においても、DNA を抽出するのは検体のわずか 0.3 g に過ぎない。今回調査した牛肉、および食中毒の原因となった馬肉を顕微鏡で観察すると、住肉胞子虫のシストは、筋肉に均質に分布していなかった。一方、シストの中には、非常に多数のブラディゾイトが集合しており、住肉胞子虫の DNA は、筋肉のなかで極めて局在化している状態になっている。以上から、牛肉における住肉胞子虫の危害性を評価するには、現行の住肉胞子虫食中毒を診断する顕微鏡検査法および定性 PCR 法を改良する必要があると考える。

昨年度の馬肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法に関する検討で、定量 PCR の有用性を示した。また、DNA を抽出する検体量の増加、ならびにその均質化が検査結果のばらつきを少なくするのに有効であることを示した。*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列は、*S. fayeri* のそれと部分的に一致し、また、それぞれに固有の部分がある。それらを利用し、DNA 抽出のための牛肉の量を増やし、均質化した後に DNA を抽出すること、さらに、*S. cruzi* の 18S rRNA 遺伝子をクローニング後、その標準 DNA と検量線を用いての定量 PCR 法を構築することが推奨される。

E . 参考文献

- 1) Harada, S., Furusawa, M., Tokuma, E., Matsumoto, K., Yahiro, S., Miyasaka, J., Morihiro, S., Kamata, Y., Watnabe, M., Irikura, D., Matsumoto, H., Sugita-Konishi, Y. Control Toxicity of

Sarcocystis fayeri in Horsmeat by Freezing Treatment and Prevention of Food Poisoning Caused by Raw Consumption of Horsemeat. Food Hyg. Safety Sci. 54, 198-203. 2013

- 2) Kamata, Y., Saitou, S., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe. M., Sugita-Konishi, Y. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsmeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. 77, 814-819, 2014.
- 3) 齊藤 守弘. *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒. 2012. 獣医疫学雑誌 . 16 , 114-125
- 4) 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, 21-27. 2011.
- 5) 板垣 博、大石 勇監修：最新家畜寄生虫病学、朝倉書店、東京、2009.
- 6) 松尾加代子、佐藤 宏：岐阜県内だと畜された牛の住肉孢子虫調査、日獣会誌、65, 791 - 794, 2012.
- 7) *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、わが国における寄生虫性食中毒の発生状況 厚生労働省食中毒統計からの解析、食品衛生研究 65, 25 - 31, 2015 .

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2 牛咬筋のH E 染色像

シストと、ヘマトキシリンに濃染されるブラディゾイトが確認される。

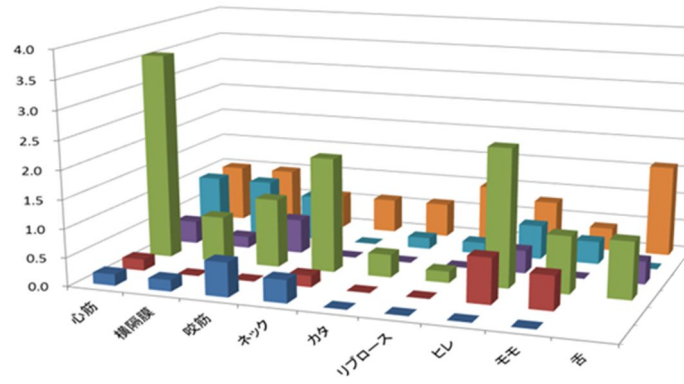


図3 牛6頭の筋肉各部位における住肉胞子虫シスト数

縦軸は顕微鏡下で計数した1 cm²当たりのシスト数を示す。各色は、牛の個体を示す。

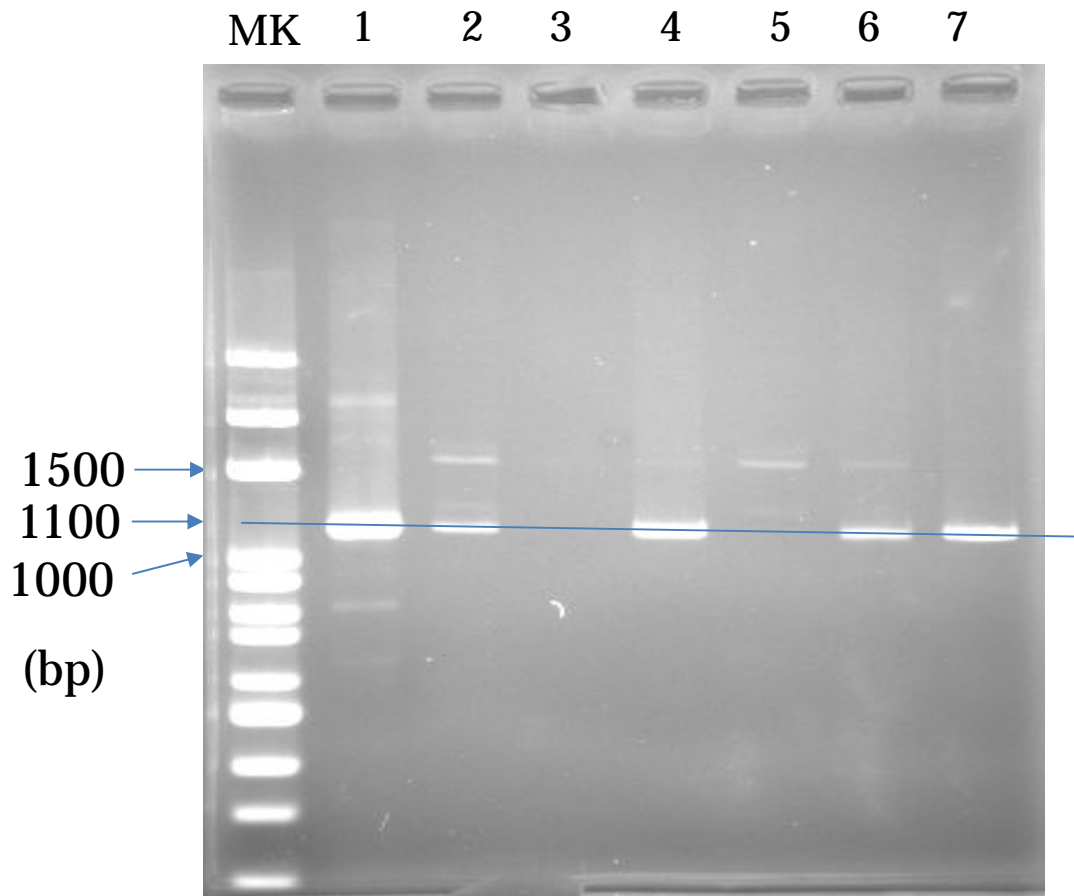


図4．牛肉から抽出した DNA をテンプレートとした時の住肉胞子虫遺伝子検査

M K : DNA サイズマーカー

レーン 1 ; 馬肉由来 *S. fayeri* シスト抽出 DNA

レーン 2 : 牛 ネック抽出 DNA

レーン 3 : 牛 咬筋抽出 DNA

レーン 4 : 牛 横隔膜筋抽出 DNA

レーン 5 : 牛 カタ抽出 DNA

レーン 6 : 牛 タン抽出 DNA

レーン 7 : 牛 タン抽出 DNA

表1 *Sarcocystis* 属の宿主

中間宿主	<i>Sarcocystis</i> 属	終宿主
ウシ	<i>S. cruzi</i>	イヌ
	<i>S. hirsuta</i>	ネコ
	<i>S. hominis</i>	ヒト
ブタ	<i>S. miescheriana</i>	イヌ
	<i>S. porcifelis</i>	ネコ
	<i>S. sui hominis</i>	ヒト
ヒツジ	<i>S. ovis canis</i>	イヌ
	<i>S. renella</i>	ネコ
ウマ	<i>S. bertrami</i>	イヌ
	<i>S. fayeri</i>	イヌ

表2 牛肉中の住肉胞子虫遺伝子検査法：PCR条件

プライマー			
フォワード		5' -GGATAACCGTGGTAATTCTATG-3'	
リバース		5' -TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG-3'	
PCR条件			
変性		94	3分
サイクル数		30	
	変性	94	30秒
	アニーリング	60	60秒
	伸長	72	60秒
伸長		72	5分

表3 牛肉中の住肉胞子虫検出における
顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果の相関

顕微鏡検査	検体数	遺伝子検査	
		陽性	陰性
		27	25
シスト陽性	38	20	18
シスト陰性	14	7	7