

平成 25 -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

総合分担研究報告書
畜産食品における寄生虫性危害に関する研究

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）
三井 太平 （岩手県食肉衛生検査所）

本分担研究は、畜産食品の安全性確保を大きな目的とし、平成 25 年から 27 年にて、以下の項目を検討した。1) 原因食品として畜産食品を含め、我が国における寄生虫性食中毒の、統計的実態を明らかにした。寄生虫性食中毒が項目化されていなかった平成 23 年までは、寄生虫性食中毒は「その他」の食中毒に分類されていた。そのほとんどはアニサキスだった。平成 24 年の統計項目改正以降は、クドアとアニサキスが主な原因になっている。寄生虫性食中毒は、我が国において第 3 の食中毒として位置づけられた。2) 食中毒として診断することを目的としている、馬肉を検査対象とした住肉胞子虫の検査法を、食中毒危害性を評価できる方法として使用可能か検証した。遺伝子検査法として定性 PCR が策定されているが、DNA を抽出する検体量が 0.3 g と少なく、ばらつきが多かった。定量 PCR 法を検討したが、やはり 0.3 g の検体量では遺伝子コピー数はばらつき、少なくとも 10 g 以上の馬肉から DNA を抽出すべきであることが明らかになった。3) 家畜だけでなく野生動物も畜産食品として流通する。その流通は、駆除とリンクし、今後増加する可能性がある。野生シカ肉について、住肉胞子虫寄生状況を調査した。市場流通しているエゾジカ肉 50 検体について、住肉胞子虫遺伝子検査を実施したところ、48 検体が陽性となり、広く住肉胞子虫のシカへの寄生が確認され、その危害性を評価する必要性が認められた。4) 住肉胞子虫は牛の多くの部位の筋肉中に存在した。現在まで、日本において住肉胞子虫が寄生する牛肉での食中毒の発生は報告されていないが、牛肉における胞子虫の寄生状況を把握し、その食中毒危害性を評価する必要がある。

A. 研究目的

畜産食品の安全性を担保するのに大きく貢献している組織に食肉衛生検査所お

よび食鳥検査所がある。同検査所は、法的には牛、豚、馬、羊、山羊の家畜、ならびに鶏、アヒル、鴨を、一頭一羽ず

つ検査している。実際の検査対象の多くは、牛、豚、および鶏になる。それらの家畜・家禽は、肉眼による検査および必要に応じた精密検査を経たのち、市場流通する。畜産食品を通じて人に危害性を示す物質や微生物が、検査所での精密検査をすり抜け、あるいは途中で混入し、さらには増殖などして、人が畜産食品を喫食し、食中毒が発生する。食中毒に関する公的な記録は、厚生労働省が所轄している食中毒統計になる。平成 24 年に原因物質の追加がされ、食中毒統計は刷新され、より正確な、我が国の食中毒発生状況が把握できるようになった。この追加の契機となった事象の一つに、馬肉食中毒の原因が発見されたことがある。馬肉の生食、すなわち馬刺しを喫食すると、短時間で、下痢嘔吐を示し、1 日あるいは数日で回復するという病型を示す「馬肉食中毒」は、馬の筋肉内に寄生する *Sarcocystis* 属住肉胞子虫という寄生虫が原因だった(1)。他に、原因が長く不明だったヒラメ食中毒が解析され、これもクドア属粘液胞子虫が原因物質であり(2) これらの事実に基づき、上記食中毒統計の変更、すなわち、寄生虫(クドア、サルコシスティス、アニサキス、その他の寄生虫)が病因物質の項目として追加された。

馬肉食中毒を診断する際、厚生労働省はその検査法を通知している(3)。*Sarcocystis fayeri* フェイヤー住肉胞子虫を、患者喫食馬肉から検出するのであるが、顕微鏡を用いての方法と、住肉胞

子虫に共通な、18S rRNA 遺伝子を標的とした定性 PCR 法が提示されていた。馬肉を喫食しての事例を、*Sarcocystis* 属寄生虫が原因であることを確定させる方法である。提示された方法は、事例の診断に適応させたもので、馬肉を含め、住肉胞子虫を含んだ畜産食品の、食中毒危害性を評価できる方法かは検証されていない。

住肉胞子虫は肉食動物を終宿主とし、草食動物あるいは豚のような雑食動物が中間宿主となって、その寄生環を維持している(図 1)。住肉胞子虫は、その名が示すように、中間宿主の筋肉内に寄生する。終宿主に感染能力のある成熟虫体をブラディゾイトとよび、それが多数、袋に包まれて、筋肉内に存在する。袋はシストと称され、住肉胞子虫の種に応じた種々の個性ある構造を示す。畜産食品のもととなっている家畜には、住肉胞子虫が寄生する。家畜以外の野生動物も例外でなく、シカ、イノシシには住肉胞子虫の寄生が報告されている。

本研究は、畜産食品の安全性確保を大きな目的とし、以下の項目が具体的な目的となっている。

1) 原因食品として畜産食品を含め、我が国における寄生虫性食中毒の、統計的実態を明らかにする。平成 23 年までは寄生虫性食中毒が項目化されておらず、それは「その他」に分類されていた。平成 24 年度からは、届出があった中での実態が把握できるので、寄生虫性食中毒の位置づけを明らかにする。

2) 食中毒診断を目的としている馬肉を

検査対象とした住肉孢子虫の検査法を、食中毒危害性を評価できる方法として使用可能か、検証する。また、改良する。

3) 家畜だけでなく野生動物も畜産食品として流通する。その流通は、駆除とリンクし、今後増加する可能性がある。野生シカ肉について、住肉孢子虫寄生状況を把握する。

4) 住肉孢子虫が寄生する動物種は多い。中間宿主の一つとしてウシがある。現在まで、日本において牛肉に寄生する住肉孢子虫が原因で食中毒が発生した事例は報告されていない。牛肉における住肉孢子虫の寄生状況を把握する。

B. 実験方法

B-1 食中毒統計における寄生虫性食中毒

厚生労働省監視安全課食中毒被害情報管理室より、2003年から2012年までの、「その他」が原因物質の食中毒情報を、各事例について提供を受けた。

2003年から2012年の間に発生した食中毒について、事例数および患者数について解析した。食中毒統計において、総数、細菌、ウイルス、化学物質、その他、不明の項目について、年次推移を解析した。「その他」の占める割合について検討した。

「その他」について、原因物質項目2009年から2010年にかけて、ヒラメおよび馬肉食中毒の原因が明らかになり、情報が周知され始めた。厚労省に届け出される記述には形式が指定されておらず、同一性がない。解析のため、適切な「整

理項目名」を定め、記述のものと解析用の項目名を対比して示した。

B-2 馬肉と *S. fayeri* 遺伝子検査法

厚生労働省が通知した検査法(3)に従い、馬肉各検体から0.3g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 µLを取り、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen)を用いてDNAを抽出した。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℃、3分を1ステップ、94℃、30秒、53℃、30秒、1分を30サイクル、72℃、5分を1ステップとした。用いた試薬は10 × Ex Taq Buffer (TaKaRa)、dNTP Mixture (TaKaRa)、Ex Taq (TaKaRa)である。

同じそれぞれの検体から、馬肉を10g、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。均質化後、粥状になった馬肉サンプルを200 µL採取し、DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen)を用いてDNAを抽出した。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製した(表1)。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 (NIPPON GENE)である。StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

B-3 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。

B-4 牛肉における住肉胞子虫検査

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ヵ月齢、すべてメスであった。各牛からそれぞれ筋肉8~9ヵ所、計52ヵ所を採材した。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。

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。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をシストとして確認し計数した。

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(3)を牛肉に応用した。住肉胞子虫の18S rRNA 遺伝子を標的とした定性PCRを実施した。

C. 結果

C-1 「その他」に分類される食中毒の位置づけ、その原因物質の分析

寄生虫性食中毒が包有される「その他」に分類される食中毒は、2007年までは年間で一桁の発生件数を示したにすぎない。2008および2009年は17件と、いずれも少ない発生数になっている。2010年に28件となり、増加傾向を示し、2011年は68、2011年に至っては100件を越える事件数を示した。ヒラメ及び馬肉食中毒の原因が明らかになったこともあり、2010から2011年を境に、急激な「その他」の食中毒が増加していることが読み取れる(表2)。

10年間で266件の発生がみられているが、そのうち、寄生虫が原因となっているのは258件あり、97%を占めた。細菌性、毒素性、混合した原因によって「その他」に分類された食中毒はわずかに3%に過ぎなかった。

2003年から2010年までは、3事例を除き、すべてが、アニサキス属が原因となっていた。2011年になると、アニサキス属を越えるクドアの報告、また、サルコシスティスが原因になっている事例の発生がみられている。2012年は、アニサキスは倍増し、また、クドアも発生件数が増加した(表3)。

C-2 馬肉の住肉胞子虫遺伝子検査法改良の検討

S. fayeri の18S rRNA 遺伝子を標的とする定量PCRを行った。馬肉0.3gを用

いる方法と 10 g を均質化して検査に供する方法の比較を行った(表4)。遺伝子陰性と判定された1番の検体で、馬肉 0.3 g 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 10 g 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 10 g を均質化する方法で、0.3 g 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 10 g 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。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(図2)。

C-3 エゾシカ肉における住肉胞子虫汚染状況

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。

C-4 牛肉中の住肉胞子虫の顕微鏡および遺伝子検査

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3)。シストの形態は *S. cruzi* を推定させた。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た部位は心筋で(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、1 cm² 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。

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。馬肉について検討された現行法を応用したところ、約 1,100 bp の DNA の増幅が確認された。DNA サイズが同様に、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た住肉胞子虫の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。

牛肉中の住肉胞子虫について、顕微鏡による検査と遺伝子検査結果の相関を検討した。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、顕微鏡検査結果と遺伝子検査結果が大きくかい離していた。

D. 考察と結論

畜産食品の寄生虫に関連する危害性の分析を行った。

食中毒統計が改正される平成 23 年までは、寄生虫性食中毒は「その他」に分類されていた。個票を検索してその他を分析したところ、97%が寄生虫を原因としていて、そのほとんどがアニサキスだった。統計の項目の改正後は、アニサキスが原因の食中毒が増加していたとともに、クドアが原因である事例も多く発生していた。アニサキス食中毒は、単に発生が増加しているとは考えにくい。寄生虫性食中毒に関心が集まり、医師、保健所および衛生検査所の担当員による、検査体制の整備と精度が向上し、アニサキス食中毒事件数の実態が把握できている可能性がある。事件数においては、寄生虫性食中毒は、ウイルス性、細菌性に次いで多く発生している食中毒となっている。

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。

コンピュータソフト上で、20、30、あるいは 40 g と、検体の重量を増やし、同様な解析を行ったところ、ばらつきは減少した。検体量の増加は、可食部を少なくすることに直結し、また、作業上の困難さを増やすので、適正な判断が要

求される。

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。実際、加熱が不十分のエゾシカ肉を喫食して、有症苦情事例が発生し、患者喫食エゾシカ肉中には住肉胞子虫が検出されていることを踏まえて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(4)。

現行の馬肉を対象とした住肉胞子虫検査法を、牛肉に適応し、その妥当性を検討した。

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。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。

牛肉中の住肉胞子虫についての遺伝子検査法を検討した。馬肉を対象とした現行法を応用した場合、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、牛肉にも適応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、適応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ず、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。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、DNAを抽出する検体の量を増加させ。また、定量性のある遺伝子検査法の必要性が示唆された。

平成26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、大量の検体を均質化することの有効性を示した。牛肉についても、*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。*S. cruzi*の病原性に関する知見の集積も今後必要である。

E. 参考文献

- 1) Kamata, Y., Saito, S., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., Inui, T., Watanabe, M., Sugita-Konishi, Y. 2014. A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. *J. Food Prot.* 77, 814-819.
- 2) Kawai, T., Sekizuka, H., 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.
- 3) *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
- 4) 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.

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。

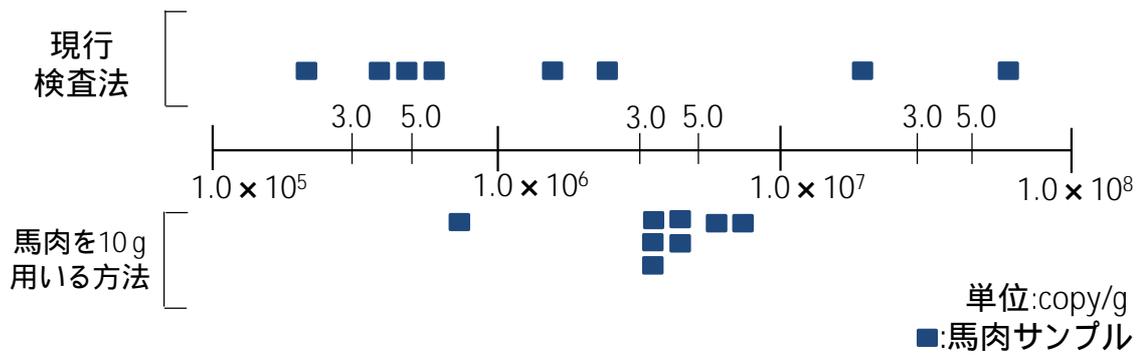


図2 . 現行検査法および馬肉 10 g 用いる方法での定量 PCR の結果のばらつき



図3 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。

表 1 . 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2 厚生労働省食中毒統計 事件数の推移

| | 事件数 | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
| 総数 | 1,585 | 1,666 | 1,545 | 1,491 | 1,289 | 1,369 | 1,048 | 1,254 | 1,062 | 1,100 |
| 細菌 | 1,110 | 1,152 | 1,065 | 774 | 732 | 778 | 536 | 580 | 543 | 419 |
| ウイルス | 282 | 277 | 275 | 504 | 348 | 304 | 290 | 403 | 302 | 432 |
| 化学物質 | 8 | 12 | 14 | 15 | 10 | 27 | 13 | 9 | 12 | 15 |
| 自然毒 | 112 | 151 | 106 | 138 | 113 | 152 | 92 | 139 | 69 | 97 |
| その他 | 1 | 5 | 8 | 7 | 8 | 17 | 17 | 28 | 68 | 107 |
| 不明 | 72 | 69 | 77 | 53 | 78 | 91 | 100 | 95 | 68 | 30 |

表3 寄生虫性食中毒の発生件数の推移

| | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 寄生虫性 | 1 | 5 | 7 | 5 | 7 | 14 | 17 | 28 | 67 | 107 |
| アニサキス属 | 1 | 4 | 7 | 5 | 6 | 14 | 16 | 28 | 32 | 65 |
| クドア | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33 | 41 |
| サルコシステイス | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| ウェステルマン肺吸虫 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 旋尾線虫 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

表 4 . 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 | | |
| | 2* | Undetected | | 11651 | 7277790 | 141.1% |
| 3 | 1* | 7015800 | | 13265600 | | |
| | 2* | 4330920 | 1898497 | 20798400 | 5326494 | 31.4% |
| 4 | 1* | 4370520 | | 13830400 | | |
| | 2* | 6993360 | 1854628 | 14838400 | 712763.6 | 5.0% |

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