

険性を示唆している。そこで本研究では、日本国内各地に分布する野生動物の糞便試料からクリプトスポリジウムの検出を試み、クリプトスポリジウムの分布についての疫学的調査を行うとともに、検出された原虫の型を解析することにより、野生動物に起因する生活用水汚染の危害性を検討する。本研究においては、ヒトの生活用水の水源近辺に接触する可能性のある野生動物について、それらのクリプトスポリジウムの保有状況に加え各型の同定を行い、人に感染性を持つ *C. parvum* の分布状況を解析することにより汚染源の可能性を解析する。試料採取は年間を通して行い、季節変動など、環境の変化に伴う動態にも着目する。

これまで、クリプトスポリジウムについてはその感染事例の規模に相反し、総括的な疫学研究や、汚染源の特定について未だ解明されておらず、対処については浄水施設における消毒法にとどまる現状だが、塩素消毒に抵抗性のある本病原体に

ついてははまだ効果は表れていない。本研究は、クリプトスポリジウムが自然界から人間の生活に侵入する第一線を明らかにするものであり、全国的に分布している野生動物を広範的に疫学調査することで広大な生息域を持つ野生動物が水源の汚染源になり得る可能性を精査するという試みは今までに行われていないため、学術的価値は非常に高い。また、汚染源の特定および汚染経路の解明は、野生動物の行動規制・誘導等により水源をいかにして汚染から守り、集団感染を回避するかという防疫策の基盤となるほか、野生動物の腸内容物に触れる可能性のある狩猟者、解体事業者を感染から守るための規制にも非常に重要な情報となる。人獣感染症の中でも人の生活にとって不可欠である水を媒介する感染性原虫であることを鑑みると、日常生活、畜産業、農業、をはじめとするすべての人間生活に深く関係する水供給の面から、安全な家庭用水・飲料水の供給に寄与するという

点でも本研究の意義は国内外を問わず、非常に大きいと言える。

B. 研究方法

1. 試料からの核酸抽出

国立感染症研究所による「クリプトスポリジウム症・ジアルジア症等の原虫性下痢症」に準拠して糞便中のクリプトスポリジウム原虫を濃縮する。

1) 糞便からの分離

ポリプロピレン製栄研スピッツ管に糞便 1 g を入れ、精製水または PBS を 10 ml 加え、15 分間程度静置する。滅菌済みの綿棒の柄でよく攪拌する。ポリプロピレン製漏斗に綿製ガーゼを四つ折りにして浅く設置する。ガーゼの上から 500 円玉強の大きさに精製水または PBS を滴下して湿らせる。新しい栄研スピッツ管にガーゼをセットした漏斗を設置する。漏斗の上から試料懸濁液をポリプロピレンスポイトで滴下していく。全て注ぎ終

えたら、栄研スピッツ管を洗うように 5 ml の精製水または PBS を加え、再びスポイトで漏斗に注ぐ。綿棒の柄でガーゼを巻き付けて漏斗の中で絞り、試料溶液を全て集める (図 4)。

2) 酢酸エチル法による精製

試料懸濁溶液が入ったポリプロピレン栄研スピッツ管に最終濃度 20 % になるように酢酸エチルを加える。蓋を閉め、よく混和するように攪拌する。均一に混ざったら、ふたを一度開けて抜気する。その後、1000×g で 5 分間、室温にて遠心分離する。回転停止の際に沈査が浮き上がることを防ぐため、ブレーキはオフに設定する。遠心分離後、試料溶液が沈査、水溶媒層、有機溶媒層の 3 層に分かれたことを確認したら、上部の 2 層の交雑物をスポイトで吸引、またはデカンテーションで除去する。その際、管壁に付いた交雑物等は綿棒で拭き取る。タッピングかボルテックスを用いて沈殿物をほ

ぐした後、2 ml 程度の精製水で洗う。
1000×g で 3 分間、室温にて遠心分離し、
上清を除去する。残った沈査を用いてゲ
ノム抽出を行った (図 4)。

3) 沈査からの核酸抽出

上記の操作で得られた沈査から核酸抽出を最も効率よく行うため、凍結融解処理を繰り返して沈査を破碎する。凍結は液体窒素を用いて-196℃で行い、融解は85℃で行う。凍結融解処理を 5 回行った後、超音波処理を 5 分間かけ、最終濃度 10%の Protenase K 溶液で 56℃にて一晩の消化を行う。処理後の沈査からの核酸抽出は QIAGEN mini stool kit を用い、プロトコルに準拠して抽出する。抽出した核酸は-20℃にて保存した。

2. クリプトスポリジウム属の検出

試料中のクリプトスポリジウム属の検出にはリアルタイム PCR 法を用いた。
クリプトスポリジウム 18S リボソーム

RNA を標的とした Cycleave® RT-PCR *Cryptosporidium* 18S rRNA Detection kit (Takara) を用いて、プロトコルに従って逆転写リアルタイム PCR を行った。逆転写反応は、5×PrimerScript RT Master Mix を核酸試料と混和し (表 1 4)、37℃にて 15 分間で行った (表 1 5)。逆転写反応の後、得られた反応液を試料としてリアルタイム PCR を行った。2× Cycleave Reaction Mixture と *Crypto*. Primer/Probe Mix を試料と混和して反応溶液を調整し (表 1 6)、プロトコルの反応条件に従ってターゲット領域の遺伝子増幅と検出を行った (表 1 7)。得られた陽性検体については、18S リボソーム RNA の塩基配列の解析を外部委託し、その遺伝子配列について National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて相同性検索を行い、種を同定した。

C. 研究結果

上記の方法に従い、糞便中のクリプトスポリジウム原虫の濃縮、核酸抽出、18S リボソーム RNA (18SrRNA) を標的としたクリプトスポリジウム属原虫の検出を行った。その結果、いくつかの自治体からの試料中にクリプトスポリジウム属原虫特異的 18SrRNA 遺伝子の増幅が確認された (図 4)。各自治体によって陽性検出率には相違があった。千葉県では 9.1 % (1/11)、静岡県 15.6 % (7/45)、山梨県 2.4 % (1/42)、滋賀県 0 %、京都府 17.2 % (5/29)、三重県 0 %、熊本県 0 %、宮崎県 20.0 % (1/5)、長崎県 0 % (1/51) という陽性率が確認された。雌雄間では雄 8.9 % (11/123)、雌 4.1 % (5/122) であった。これらの陽性検体について塩基配列を解析したところ、*Cryptosporidium sp. deer genotype*, *C. ryanae*, *C. bovis* の三種が BLAST による相同性検索で 100 % の相同性を示した。これらのうち、*C. sp. deer genotype*

はシカ固有種であるが、*C. ryanae*, *C. bovis* はウシ由来の種であることが分かった。陽性検体は 1 月、5 月、6 月、10 月、12 月に捕獲されたものであった。

D. 考察

クリプトスポリジウムは、塩素に耐性を持つ水媒介性の微生物である特性から、非常に大きな規模の発症事例を特徴とする。人の生活、ひいては生物の生命維持に欠かせない水を媒介することにより、消毒以外に回避する手段はないが、塩素消毒が有効でないために完全に殺菌するには紫外線照射以外の手段は現在のところない。ところが、国内の住宅に水を供給するすべての水道に紫外線殺菌を施すには費用が掛かりすぎるため、現在は多くの水道施設がクリプトスポリジウム検出の際には紫外線殺菌を施すという条件付き規制にとどまっている。山間部の小さな集落では戸数の少なさに応じて簡易水道が設置されている。また、このよう

な集落では私有地の畑で小規模な農業を営んでいることが多く、その際には自宅の井戸水や、川の水などを使用している場合がほとんどである。ニホンジカとの遭遇や被害が頻発する場所はまさに上記のような場所であり、現に井戸の水をシカが飲んでいて、井戸の周りにシカの糞が大量に落とされている、などの訴えが多くあり、生活水の安全性や衛生面での不安が自治体に寄せられていた。本研究は、ジビエとしての食肉利用の安全性担保に関する研究から派生した、野生動物によるヒトへの危害性に焦点を当てている。

これまで、我が国の野生ニホンジカからクリプトスポリジウムの検出報告はなかった。ところが、本研究では千葉県、静岡県、山梨県、京都府、宮崎県、長崎県の6県から検出された。自治体によって試料数が少ないことも原因の一つであると考えられるが、少なくとも我が国の野生ニホンジカにはクリプトスポリジウ

ムを保有している個体があり、地域によって保有率には最大10倍の相違があることが証明された。今回の調査地域について試料採取個体の捕獲場所を検討すると、陽性個体が検出された自治体の捕獲区域内に牧場又は仔牛の哺育施設があった。本研究では我が国全ての野生ニホンジカを調査していないので、断定は出来ないが、陽性検体の過半数が *C. ryanae*、*C. bovis* というウシを優先宿主とする種であったことから、野生ニホンジカとウシ間におけるなんらかの相互関係が示唆される。また、同時に、今回検出された全ての種についてはヒトに対する病原性が確認されていないので、これらの野生ニホンジカによる水源汚染がヒトへの危害に直結するとは考えにくい、今後とも注意喚起は必要である。

雌雄別に解析したクリプトスポリジウムの陽性率が雄で8.9%であったのに対して、雌では4.1%と半分程度の感染率であったことに関しては非常に興味深い

結果である。これまで、家畜を対象としたクリプトスポリジウムの調査では決定的な雌雄差の報告はなく、雌雄よりも年齢による影響が多くを占めていた。本研究で示されたシカでのクリプトスポリジウム保有状況は家畜との共通の種を保有しながら、家畜では見られない性別による影響を受けていることから、シカ特異的な感染動態が推測できる。一方、季節による陽性率の変動は認められなかった。このことに関しては、狩猟や捕獲による試料採取にはどうしても法律で決められた猟期が関係してくるため、年間を通して満遍なく試料を採取することが難しいことから、正確な解析が叶わなかったことが背景にある。また、夏季の狩猟ではSFTSV 陽性マダニやその他の衛生動物による刺咬が増えるため、危険回避のために採取試料数が減ることなども関係する。そのため、野生ニホンジカにおけるクリプトスポリジウム陽性率の季節変動を確認するには、上記のような背景の解

決と四季を通して満遍なく試料採取が行われることが必要である。

本研究では本州のホンシュウジカ、九州のキュウシュウジカ由来の試料での調査になったが、どちらの種についても検出された種は同じものであったが、北海道に生息するエゾシカではまた異なる結果が出される可能性は大きい。逆に、陽性率に相違があっても検出された種が同じであったという今回の結果から類推すると、宿主と地域の相違により、陽性率には違いが反映されるが感染するクリプトスポリジウムの種に関しては本州、九州で違いはないことが考えられる。

E. 結論

本研究により、日本に生息する野生ニホンジカには地域によってクリプトスポリジウムに感染している現状が明らかになった。その陽性率には地域によっては10倍、性別によっては2倍ほどの違いが確認されたが、感染している種は、*C. sp.*

deer genotype, *C. ryanae*, *C. bovis* と、
全て同じであったことから、本州、九州
という土地柄、また、ホンシュウジカ、
キュウシュウジカという宿主の種の違い
は *C. sp. deer genotype*, *C. ryanae*, *C.*
bovis の3種の感染動態については影響
しないことが分かった。さらに、*C.*
ryanae と *C. bovis* はウシを優先宿主と
することが報告されているため、野生ニ
ホンジカが家畜であるウシと同種の寄生
虫に感染すること、ひいては、家畜に有
害な病原体のベクターにもなりうる可能
性が示唆される。

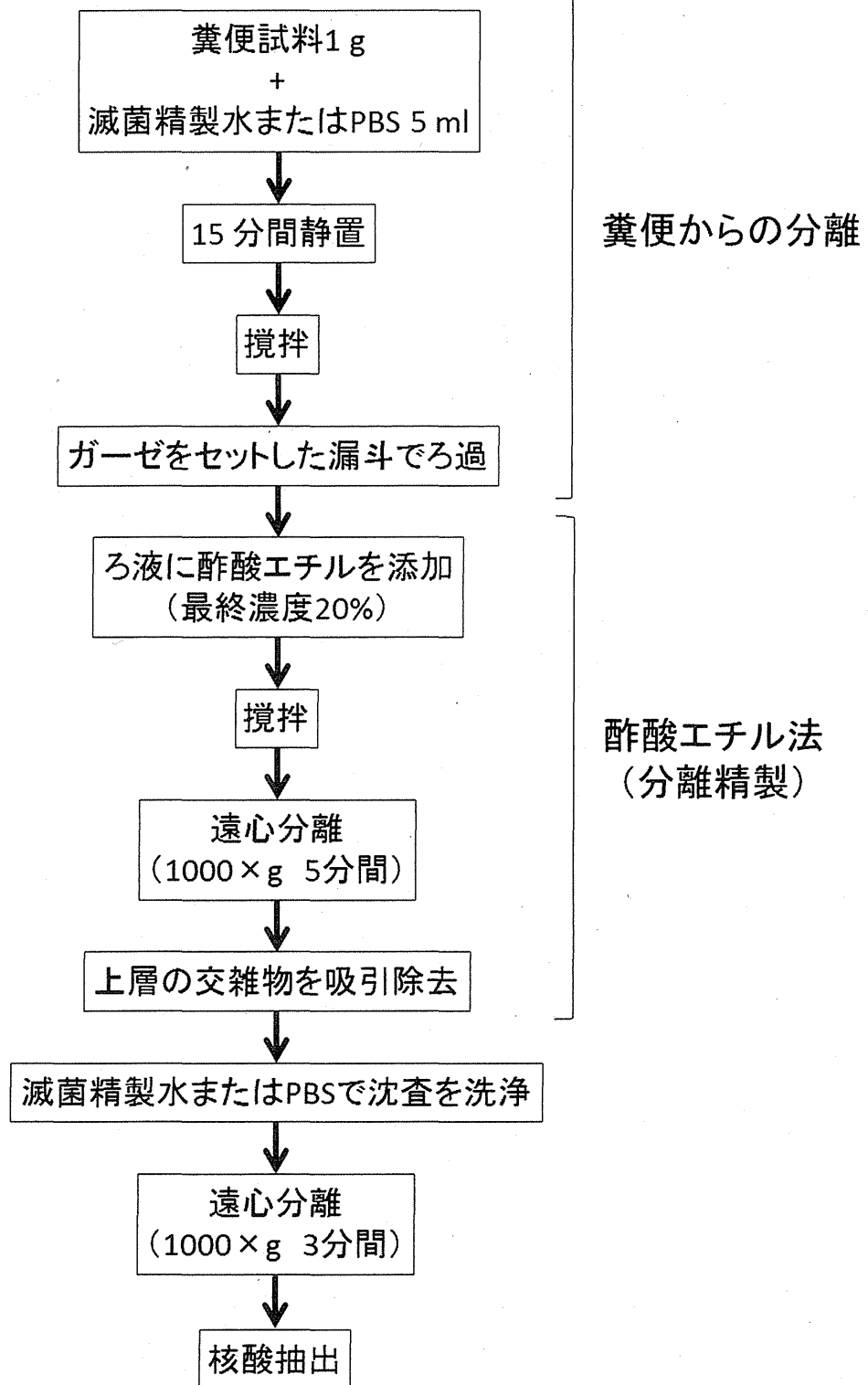


図3. 糞便試料からの原虫分離法

表 1 4. クリプトスポリジウム逆転写反応液構成

5 × PrimerScript RT Master Mix	2 μ l
サンプル核酸溶液	1~5 μ l
RNase Free dH ₂ O	Up to 10 μ l

表 1 5. クリプトスポリジウム逆転写反応条件

Reverse transcription	37°C	15分間
inactivation	85°C	5秒間
Cooling	4°C	Keeping

表 1 6. クリプトスポリジウムリアルタイム PCR 反応液構成

5 × PrimerScript RT Master Mix	2 μ l
サンプル核酸溶液	1~5 μ l
RNase Free dH ₂ O	Up to 10 μ l

表 1 7. クリプトスポリジウムリアルタイム PCR 法反応条件

Initial denaturation	95°C	10秒間
Denaturation	95°C	5秒間
Annealing	55°C	10秒間
Extention	72°C	20秒間

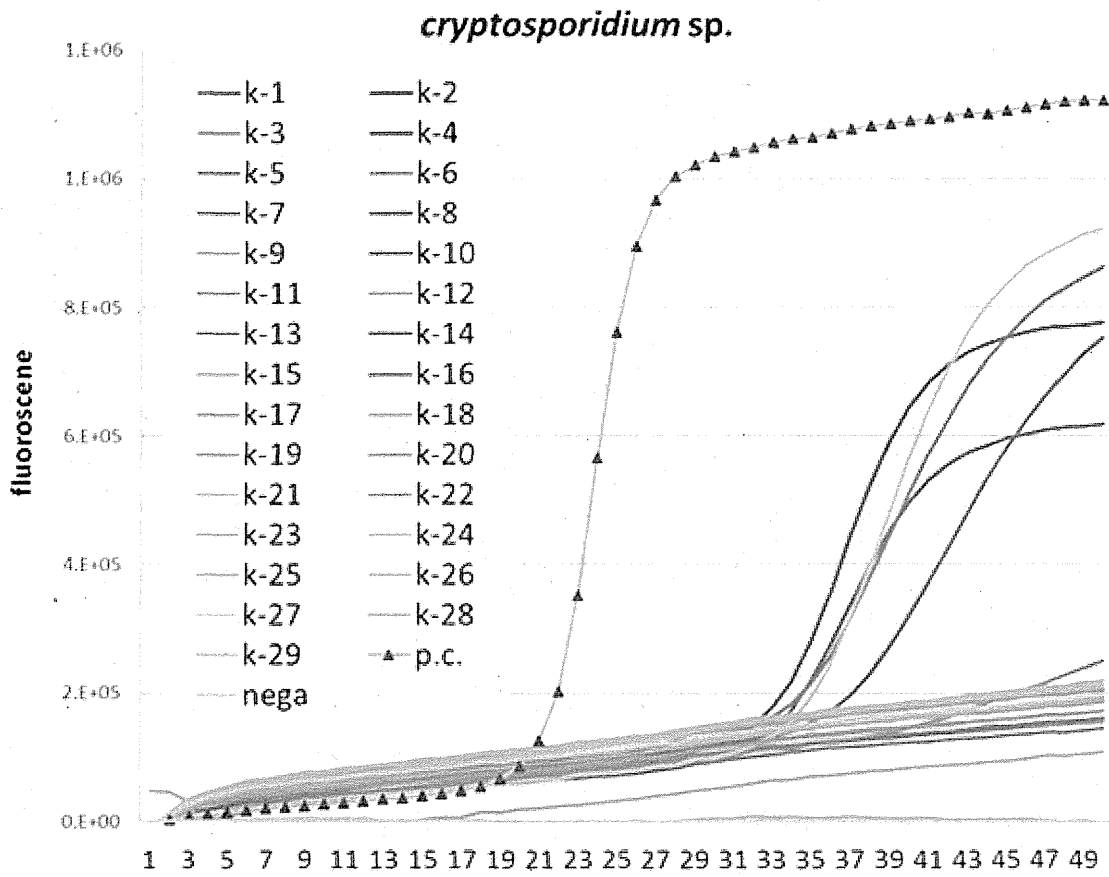


図4. クリプトスポリジウム検出リアルタイム PCR

表18. 野生ニホンジカにおけるクリプトスポリジウム調査

2012～2014 クリプトスポリジウム調査結果

		陽性率(%) (陽性個体数/総個体数)		
採取地	千葉	鴨川	9.1	(1/11)
	静岡	天城・富士宮	15.6	(7/45)
	山梨	早川	2.4	(1/42)
	滋賀	蒲生	0.0	(0/23)
	京都	丹後	17.2	(5/29)
	三重	名張	0.0	(0/25)
	熊本	五木村	0.0	(0/19)
	宮崎	東臼杵	20.0	(1/5)
	長崎	長崎	2.0	(1/51)
性別	♀		4.1	(5/122)
	♂		8.9	(11/123)

陽性検体についての遺伝子配列解析結果

Cryptosporidium ryanae isolate 18366

Cryptosporidium bovis isolate DDC-3

Cryptosporidium sp. Deer genot

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)

研究報告書

代表研究者 山崎朗子 (岩手大学 農学部獣医公衆衛生学研究室)

野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の疫学調査：

18SrRNA を標的にした定量的リアルタイム PCR 法の確立

要旨

家畜に比べ、成育環境・解体環境ともに大きく異なる野生鳥獣は、家畜が通常保有する食中毒病原性微生物以外にも食中毒誘起因子となりうる多くの有害微生物に感染している可能性が高い。ところがこのような事実は世間一般的に認知度が低く、野生獣肉喫食による事例は既に数件報告されている。その一つである住肉胞子虫 (*Sarcocystis* 属) は平成 21 年頃から起こった生食用馬肉を原因食品とした食中毒事例により全国的に広く知られ、新規病原性寄生虫の出現として注意喚起されるに至った。にもかかわらず、近年、新たに報告された住肉胞子虫による食中毒事例の原因が野生シカ肉の生食であったことは、一般社会における野生獣肉に関する危害性認識の低さを顕著に表している。

我が国の野生シカにおける住肉胞子虫については、北海道のエゾシカにおいて 96 %、本州のホンシュウジカにおいて 90 % という極めて高い保有率が報告されたが、生食用馬肉で発見された住肉胞子虫については、事例後の調査により食中毒危害の基準値が定められたのに対して、同様に食中毒事例を起こしたニホンジカ由来の住肉胞子虫については、これほどの高い陽性率でありながら食中毒発症基準も明確にされていない。

本研究は、野生ニホンジカ由来住肉胞子虫の詳細な疫学解析を遺伝子情報に基づいて行い、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫の定量することにより未だ明らかにされていないニホンジカ寄生性住肉胞子虫のヒトへの危害性について検討した。その結果、ニホンジカには 1 個体に複数種が混合感染している事が明らかになったため、本研究にて *Sarcocystis* 属の複数種を広く検出できる定量的検査法を確立した。

害獣対策としてジビエ産業の振興が望まれる現状において、ジビエの安全性の担保は必須であり、既にシカ肉での食中毒事例が発生している今、住肉胞子虫の疫学調査は早急に行われるべき重要課題と考えられる。本研究成果は、国内野生ニホンジカにおける初の疫学研究報告として学術的に非常に大きな意義があるだけでなく、ジビエの安全な食肉利用を目的とする今後の食用野生獣肉衛生管理策を講ずるにあたって、多大な貢献が期待できる。

A. 研究目的

昨今、害獣駆除目的で捕獲された野生鳥獣の肉をジビエとして食肉活用する地域振興事業が盛んに行われている。しかし、整った衛生管理下で肥育・食肉加工されている家畜に比して、成育環境・解体環境ともに大きく異なる野生鳥獣は、家畜が通常保有する食中毒病原性微生物以外にも食中毒誘起因子となりうる有害細菌類や、ウイルス類、寄生虫類など多くの有害微生物に感染している可能性が高い。事実、野生鳥獣からは、サルモネラ、カンピロバクター、ベロ毒素遺伝子陽性大腸菌等の細菌類、E型肝炎ウイルス由来遺伝子に加え鞭虫、回虫、鉤虫等の寄生虫卵および住肉胞子虫、線虫、肝蛭などの寄生虫類が検出されている(平成23～25年度厚生労働科学研究「野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究 研究代表者：高井伸二)。

これは、多種多様な動物との接触機会が多い自然環境での成育に大きく寄与するものと考えられ、野生鳥獣の大きな特徴であるが、この観点からの野生鳥獣肉喫食危害についてはこれまでに十分な研究が行われていない。ところがこのような事実は世間一般的に認知度が低く、野生獣肉喫食による事例は既に数件報告されている。

その一つである住肉胞子虫(*Sarcocystis* 属)は平成21年頃から起こった生食用馬肉を原因食品とした食中毒事例により全国的に広く知られ、これまでの家畜肉による食中毒事例の主な原因とされてきた細菌類やウイルス類に加えて新たに食中毒を起こしうる新規病原性寄生虫の出現として注意喚起されるに至った。にもかかわらず、近年、新たに報告された住肉胞子虫による食中毒事例の原因が野生シカ肉の生食であったこ

とは、一般社会における野生獣肉に関する危害性認識の低さを顕著に表している。

住肉胞子虫は、主に草食性の哺乳類を中間宿主に、肉食性の哺乳類を終宿主に持つ二宿主性の原虫で、家畜ではウマ、ウシ、ヒツジ、ブタなどが中間宿主となる。ヒトへの感染は、中間宿主の骨格筋組織に寄生したサルコシストを摂食することにより成立する。

我が国の野生シカにおける住肉胞子虫については、北海道のエゾシカにおいて96%、本州のホンシュウジカにおいて90%という極めて高い保有率が報告され、食肉利用にあたって迅速に対応すべき問題点となっている。ところが、生食用馬肉で発見された住肉胞子虫については事例後の調査により、*Sarcocystis fayeri* と種同定され、さらに、食中毒事例における喫食検出量が18SrRNA 遺伝子コピー数

$1.2 \times 10^6 \sim 6.6 \times 10^6 / g$ であったことから食中毒危害の基準値が定められたのに対して、同様に食中毒事例を起こしたニホンジカ由来の住肉胞子虫については、これほどの高い陽性率でありながら、光学顕微鏡による組織切片の検査にとどまり、遺伝的な種同定も、食中毒発症基準も明確にされていない。その最も大きな理由は、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫を定量する方法が確立されていないことである。

野生動物としての成育環境や、ニホンジカが保有する微生物の多様性から考えると、住肉胞子虫についても他の微生物と同様、これまでに家畜で発見された種と同一種が感染している可能性は低く、未知なる新種が寄生している可能性すら考えられるが、現在までに国内野生ニホンジカでの詳細な住肉胞子虫の疫学調査は行われて

いない。

本研究は、野生ニホンジカ由来住肉胞子虫の詳細な疫学解析を遺伝子情報に基づいて行い、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫を定量することにより未だ明らかにされていないニホンジカ寄生性住肉胞子虫のヒトへの危害性について検討する。

害獣対策としてジビエ産業の振興が望まれる現状において、ジビエの安全性の担保は必須であり、既にシカ肉での食中毒事例が発生している今、住肉胞子虫の疫学調査は早急に行われるべき重要課題と考えられる。本研究成果は、国内野生ニホンジカにおける初の疫学研究報告として学術的に非常に大きな意義があるだけでなく、ジビエの安全な食肉利用を目的とする今後の食用野生獣肉衛生管理策を講ずるにあたって、多大な貢献が期待できる。

B. 研究方法

1. ニホンジカ肉試料の乳化

厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法に準拠し、国内の野生ニホンジカ由来の横隔膜又は骨格筋から住肉胞子虫の核酸を抽出する。全国から試料提供を受けた野生ニホンジカの横隔膜、骨格筋から脂肪、筋を除去し、筋肉繊維を 10 g 切り出す。包丁などを用いてまな板上で細かく破碎し、ミンチ状にする。PBS 30 ml と共にホモジナイザーカップに入れ、5000 rpm で1分間ホモジナイズして均一の乳剤状にする。乳化した乳液を 200 μ l 取り、1.5 ml マイクロチューブに取る (図5)。

2. DNA の抽出精製

乳液状となったシカ肉試料から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN

51304、51306) を用いてプロトコルに準拠して核酸を抽出精製し、-20℃で保存する。

3. 住肉胞子虫の定性試験法

住肉胞子虫の定性試験については、馬肉での *S.fayeri* 検査法に準拠する。住肉胞子虫の 18S リボソーム DNA を標的とした polymerase chain reaction (PCR) 法により検出する。プライマー配列、および遺伝子増幅反応条件は表 18、表 19、表 20 に示すとおりである。

4. 住肉胞子虫のシーケンス解析法

3. の定性試験で増幅された住肉胞子虫の 18SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。pMD20-T ベクターを用いて、住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子をライゲーションし、T-A クローニングを行った。完成したプラスミドベクター

を DH5 α コンピテントセルに導入し、形質転換した。LB 培地上に形成されたコロニーを 10 個釣菌し、抽出精製したプラスミドをシーケンス解析に用いた (図 7)。解析結果は、BLAST を用いた相同性検索によって 98 % 以上の相同性を示す種を同定した。

5. 住肉胞子虫の定量法の確立-標的領域の選出-

4. で得られた個々の 18SrRNA 遺伝子配列に共通する配列を探索し、標的配列領域とした (図 10)。その領域を増幅できるプライマーを Primer 3 を用いて設計した (図 11)。

6. 住肉胞子虫の定量法の確立-リアルタイム PCR 法の反応条件の決定

設計したプライマーにあわせてアニリング温度を決定し、標的遺伝子領域の塩基数を増幅するのに適した

伸張反応時間を決定した。酵素は SYBR qPCR kit (GeneAce SYBR qPCR Mix α)を用い、プロトコルに準拠して初期変性温度、反応時間、伸張反応温度を設定した(表21)。

7. 住肉胞子虫の定量法の確立—陽性対照の決定—

定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照は、住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子をライゲーションしたプラスミドを用いた。制限酵素 *Hind* III を用いてプラスミドを切断し、段階希釈したものをサンプルとしてリアルタイム PCR 法で検出した(図12)。各濃度の試料における Ct 値をもとに検量線を作成し、R 二乗値を求めた(図13)。

C. 研究結果

本研究では採集したニホンジカ試料のうち、まず北海道のエゾシカ試料

89 検体を用いて上記のとおり実験を行った。馬肉と同様の実験手法でエゾシカ肉から核酸抽出を行う事が出来た。*S. fayeri*と同様の検出プライマーを用いて、定性 PCR 法を行った結果、住肉胞子虫由来の 18S リボソーム RNA 遺伝子領域 1100 bp の増幅が確認された(図6)。

ここで増幅された 18SrRNA 遺伝子領域をアガロースゲルから抽出し、pMD20-T ベクターにライゲーションして T-A クローニングを行った。DH5 α コンピテントセルにクローニングしたプラスミドを導入して形質転換を行ったところ、LB 培地上に多数のコロニーが確認された。その中から 10 個のコロニーを選び、個々に培養した後、プラスミドを抽出・精製した。釣菌したコロニーから抽出したプラスミド 10 個のうち、6 個のプラスミドに挿入した遺伝子配列が解析された。

解析が出来た領域はプラスミドによって異なり、最短 360 bp から最長 800 bp であった (図 8)。ここで得られた塩基配列について、NCBI の BLAST を用いた相同性検索を行った結果、各クローンについて、数種類の種が 98 % 以上の相同性を示した。コロニー番号 DM-1-1 では *S. tarandi*, *S. elongata*, *S. truncata*, DM-1-2 は *S. tarandi*, *S. elongata*, DM-1-5 も同じく *S. tarandi*, *S. elongata*, DM-1-6 は *S. tarandi*, *S. elongata*, *S. truncata*, *S. silva*, sp.HM050622, DM-1-9 は *S. hjorti*, DM-1-10 で *S. tarandi*, *S. elongata*, *S. truncata*, sp.HM050622 が同定され、総合すると、一個体の試料から合計 6 種の *Sarcocystis* 属が同定された。

ここで得られた 6 種の 18SrRNA 遺伝子領域に共通する配列を定量的リアルタイム PCR 法の標的とした。そ

の結果、住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子領域の 853 番 bp から 1251 番 bp までの 399 bp が共通領域であった。その中で、定量的リアルタイム PCR 法による増幅に適した長さで配列を持つ領域を探索し、1135 番 bp から 1205 番 bp までの 71 bp を標的領域に決定した (図 10)。標的領域の増幅に適したプライマーは primer3 を用いて設計した。その結果、3 組のプライマーペアを候補とした (図 11)。これらの候補プライマーの GC 含有率からアニーリング温度を 60 °C に決定した。また、増幅配列の bp 数から、伸張反応時間を 60 秒間とした。全ての増幅反応条件は、初期変性を 95 °C にて 10 秒間、変性を 95 °C にて 30 秒間、アニーリングを 60 °C にて 60 秒間、伸張を 72 °C にて 60 秒間で行い、サイクル数は 45 とした (表 2 1)。

陽性対照は、住肉胞子虫 18SrRNA

を組み込んだプラスミド DNA を用いた。制限酵素 *Hind* III で切断した後、3 種類のプライマーペア候補を用いてリアルタイム PCR 法にて遺伝子増幅を試みた (図 1 2)。結果から得られた Ct 値と遺伝子コピー数の近似曲線を作成したところ、決定係数 R^2 値が 0.998 を示し、信頼度の高い検量線が得られた (図 1 3)。この結果から、最も Ct 値の誤差が少ないプライマーペアを選定した結果、図 1 1 に示した DMScommon 1 の Sarco. Deermeat 1-F
5'-CGACTTCTCCTGCACCTTATGA
-3'、Sarco. Deermeat 1-R
5'-TTCAGCCTTGCGACCATACTC-
3'に決定した。

これらの条件を用いて段階希釈した住肉胞子虫ゲノム核酸を試料として定量的リアルタイム PCR 法を行った結果、ピークの揃った融解曲線が示

され (図 1 4)、また、得られた Ct 値と試料の遺伝子コピー数には高い相関性を示す一時曲線が認められた (図 1 5)。

D. 考察

住肉胞子虫による食中毒に関しては、生食用馬肉での事例が発生した際に行われた危害性解明調査の結果、筋肉組織中に形成されたサルコシスト、ひいてはサルコシストに内包されたブラディゾイト量の摂取量に依存することが明らかにされている。有症事例試料から、遺伝子コピー数について 10^6 /g を上回るものについては危害性が想定されるという基準も設けられ、その後の生食用馬肉については、冷凍処理にて住肉胞子虫の食中毒危害性を消失させるよう定められた。生食用馬肉での事例からわずか一年後に同じく住肉胞子虫による食中毒事例を

起こしたシカ肉については、原因微生物が同じであることまで明らかにされたにも関わらず、安全性管理に関する詳細な調査はまだ完了していない。そのため、シカ肉による食中毒がどの程度の住肉胞子虫の摂取量で発症するかということも明らかにされていない。

これまでに野生ニホンジカでの住肉胞子虫調査はいくらか行われてきたが、その全てが組織切片内のサルコシストの顕微鏡検査にとどまっている。顕微鏡検査で検出される住肉胞子虫の判断基準は染色された虫体壁の厚みや、虫体の大きさを判断することが大部分を占め、それ以上の解析には限界がある。また、鑑別点を判断するには熟練を要するため、誰もが診断を出来る方法でないことに加え、検査者の主観が反映される可能性も拭いきれない。本研究では、今後食肉として

社会一般的に提供されることが強く推進されている野生シカ肉の安全性の担保に貢献するべく、食中毒危害性の検査法として住肉胞子虫の定量法の確立を試みた。

大まかには、野生ニホンジカに寄生している住肉胞子虫の塩基配列を決定し、その配列内から定量的リアルタイム PCR 法に適した標的塩基配列を決定、続いて標的塩基配列の増幅に適切なプライマーを設計し、定量のため信頼性の高い検量線を示す陽性対照を作製して検査法を考案した。野生ニホンジカ肉の住肉胞子虫の検出に厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法を用いたところ、1100 bp の遺伝子が増幅されたが、この塩基配列を解析したところ、*S. fayeri* は検出されなかった。代わりに、*S. tarandi*、*S. elongata*、*S.*