

平成 30 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）
「野生鳥獣由来食肉の安全性確保とリスク管理のための研究」
分担研究報告書

サルコシスティスとの鑑別が必要なヘパトゾーン属原虫の研究

分担研究者 杉山 広（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 常盤俊大（日本獣医生命科学大学獣医学部獣医寄生虫学研究室）

研究要旨 ニホンイノシシに寄生するヘパトゾーン属原虫に関する調査を実施した。白血球内にガメトサイトを、また筋肉内にメロントを見出し、後者について病理組織標本上におけるサルコシスト（サルコシスティスのシスト）との形態学的相違点を明らかにした。徳島県のイノシシでは 181 頭中 96 頭（53%）から原虫遺伝子が検出された。原虫遺伝子が検出された個体は若獣以降（95 頭）であり、胎盤感染ではなく、出生後の発育途中に感染したものと示唆された。原虫遺伝子陽性個体（n=5）の白血球寄生率は 0.2%であった。ベクターとしてマダニ類が疑われたが、特定には至らなかった。

A. 研究目的

ヘパトゾーン属原虫はアピコンプレックス門コクシジウム亜綱アデリア目に属する原虫である。マダニ類がベクターとなり、哺乳類では主に食肉目動物の血液や組織から検出されるが、偶蹄類に寄生する種の記載はなかった。我々はジビエとして流通するイノシシ肉におけるサルコシスティス属原虫調査の過程で、新規のヘパトゾーン属原虫を認め、偶蹄類寄生種として *Hepatozoon apri* Yamamoto & Tokiwa *et al.*, 2017 を新種記載した。今回、本種の形態的特徴や生物学的特徴を詳細に知ることを目的に、研究調査を行った。

B. 研究方法

1) 野生動物検体

徳島食検の協力を得て、県内で狩猟および有害鳥獣として捕獲されたイノシシ由来の筋肉、血液、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、およびニホンジカ筋肉を用いた。病理組織観察として、同上の筋肉および岐阜県のイノシシの筋肉パラフィンブロック標本を用いた。

3) 系統解析

18S rDNA (18S) の部分配列 1007 bp を解読し、系統解析に用いた。

2) 感染状況調査

本種を特異的に検出する semi nested PCR 法を開発し、筋肉を検体として感染状況を調べた。

3) マダニ類における感染調査

岐阜県で捕獲イノシシに付着していたマダニを回収した。形態学観察により種および発育段階を同定後、生理食塩水中で解剖し、実態顕微鏡下で血体腔内のオーシストおよびザイゴートの検出を試みた。

C. 研究結果

1) イノシシ体内での寄生様式の解明

ガメトサイト（ガモント）（表 1）

血液内では白血球に寄生するガメトサイトが観察された。ガメトサイトは楕円形、大きさ約 11.6 x 6.7 μm 、細胞質は無色、類円形の核が偏在し、雌雄の鑑別はできなかった。寄生白血球は好中球と思われた。バフフィーコート塗抹染色標本における顆粒球寄生率は 0.2%であった。

メロント（シゾント）およびメロゾイト（図 2）

病理組織観察では、筋肉内にメロントを認めた。メロントは寄生体胞様の内部に位置し、辺縁は不明瞭で、類円形から楕円形（直径 26.5 ~ 37.5 μm ）泡状の細胞質を備えていた。メロゾイトの配置や染色性に差があり、濃染して偏在するもの（図

2b、c) と、小形で寄生細胞全体に分布するもの (図 2d) が観察された。

2) 系統解析 (図 3)

タイのイノシシ寄生カクダニ属 (*Dermacentor astrosignatus*) 由来の未記載種とともに単系統群を形成し、食肉動物よりなるクレード内に位置した。

3) イノシシおよびニホンジカにおける感染状況 (表 2)

イノシシでは 181 頭中 96 頭 (53%) が陽性で、感染率は若獣 推定 6 か月齢未満、1/11 頭、9.1%) と比べ若獣以降 (95/170 頭、55.9%) で優位に高かった ($P < 0.05$)。ニホンジカは 113 頭全て陰性であった。

4) マダニ類の調査 (表 3)

イノシシ 6 頭に由来するマダニ類 1,027 匹を分離・同定し、93 匹を検索したところ、オオトゲチマダニ (雌、飽血) の血体腔からオーシスト様構造物が検出された。当該 DNA を抽出後、特異的 semi nested PCR 法を行ったが、遺伝子増幅は認められなかった。

D. 考察

今回の調査で *Hepatozoon apri* は、徳島県のイノシシに広く感染していた。他の地域においても、イノシシにおいて高い感染率を持つ可能性がある。分子系統解析の結果から、本種はイノシシ固有種である可能性が示唆された。最も近縁なタイのイノシシ由来虫体との間で、遺伝子配列において若干の変異が見られた。このことから、食肉動物寄生の種を起源とし、イノシシの祖先動物に寄生した種が、わが国で独自に分化を遂げたのかも示れない。

本虫は、若獣以降の個体において、寄生率がより高かった。このような結果から、本種は垂直感染しないか、垂直感染してもその頻度は低いと考えられた。なお、犬寄生種 *H. canis* では、垂直感染の発生が知られている。

今回、食肉部に観察されたメロントは、病理組織標本においても壁が薄く、内部のメロゾイトなどの形態学特徴からも、サルコシストと区別ができた。しかしながら、メロントには多型性があり、肉眼所見や発育段階の詳細は不明であることから、サルコシストとの鑑別には注意を要すると考えられた。

近縁種の *H. americanum* では、感染マダニ体内のオーシストを経口的に摂取したウサギやげっ歯類を待機宿主とし、病変を形成することが知ら

れている。ヒトがマダニ類を経口摂取する機会は少ないことから、本種オーシストによるヒトへの感染リスクは、あまり高くないと想定される。しかし可食部のメロントおよびメロゾイトのヒトへの感染性は不明であり、今後注意が必要である。

ベクター特定の試みとして、マダニからの原虫検出を試みたが、オーシストの検出は容易でなく、従ってベクターの同定には至っていない。本虫の生活環の全容を明らかにすることも、今後の重要な検討課題である。

E. 結論

Hepatozoon apri は本邦の多くのイノシシに感染している可能性がある。可食部の筋肉にも寄生することから、簡易的なメロントおよびメロゾイトの検出法や、サルコシスティスとの正確な鑑別法の確立が急務である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kubota R, Matsubara K, Tamukai K, Ike K, Tokiwa T. Molecular and histopathological features of *Cryptosporidium ubiquitum* infection in imported chinchillas in Japan. *Parasitology International*. 2019. 68: 9-13.
2. Tokiwa T, Ohnuki A, Kubota R, Tamukai K, Ike K. Morphological and molecular characterization of *Cystoisospora* from Asian small-clawed otters. *International Journal for Parasitology PAW*. 2018. 7: 268-273.
3. Ito A, Eckardt W, Stoinski TS, Gillespie TR, Tokiwa T. Three new *Troglodytella* and a new *Goriloflasca* ciliates from mountain gorillas in Rwanda. *European Journal of Protistology*. 2018. 65: 42-56.
4. Taira K, Nakamura S, Tokiwa T, Une Y. Larva migrans of *Baylisascaris potosis* in experimental animals. *Journal of Parasitology*. 2018. 104: 424-428.
5. Ito A, Tokiwa T. Infraciliature of *Opisthotrichum janus*, *Epidinium ecaudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei*. *European Journal of Protistology*. 2018. 62: 1-10.
6. Tokiwa T, Kobayashi T, Ike K, Morishima Y, Sugiyama H. Detection of anisakid larvae in marinated mackerel sushi in Tokyo, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2018. 71: 88-89.

7. 猪又明日香、村越稔泰、齊藤健、上杉晶、大関桂子、阿部久司、町田章生、村中幹宏、常盤俊大、井上智. 新潟県における動物由来感染症サーベイランス体制の整備に向けた取り組み. 獣医畜産新報. 2018. 71: 270-272.
8. 井上智、常盤俊大、森嶋康之. 動物由来感染症（知っておきたい感染動物等への侵淫と医療と協働した健康危害防止）. 2018. 2061: 17-21.

2. 学会発表

1. 常盤俊大、山本瑞希、飛梅三喜、赤松茂、松尾加代子、森部絢嗣、池和憲. ニホンイノシシに寄生する住血原虫の1新種 *Hepatozoon apri* (Apicomplexa: Adeleorina). 第87回日本寄生虫学会. 2018年.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

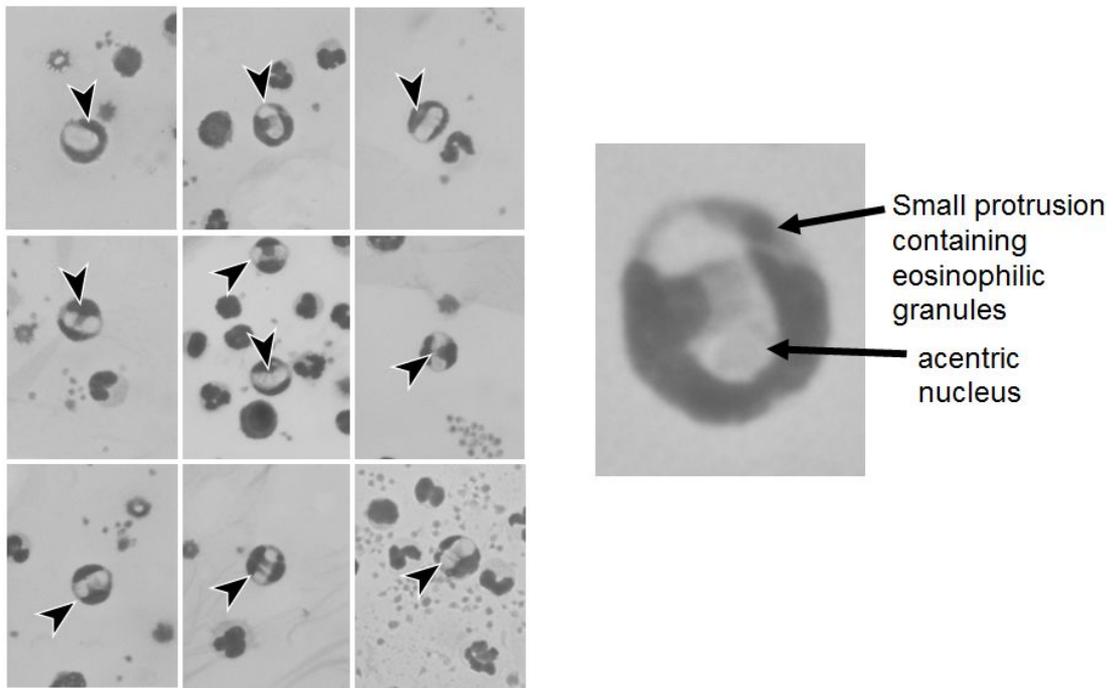


図 1. 血液塗抹標本上に観察されたガメトサイト（矢頭）. ディフクイック染色

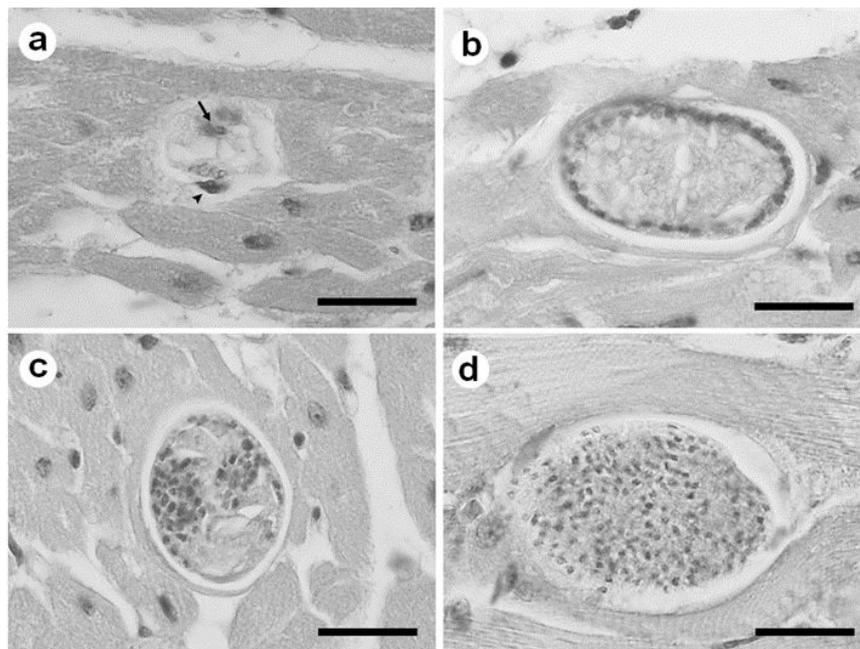


図 2. 筋肉病理組織標本（HE 染色）. (a) 栄養型と思われる虫体 . (b) メロント。寄生体内部にあり、細胞膜は不明瞭で、辺縁に多数の濃染されたメロゾイトが観察される。(c) メロント。内部は泡沫状で、大型のメロゾイトが偏在する。(d) メロント。小型のメロゾイトがメロント内部に広く分布する。

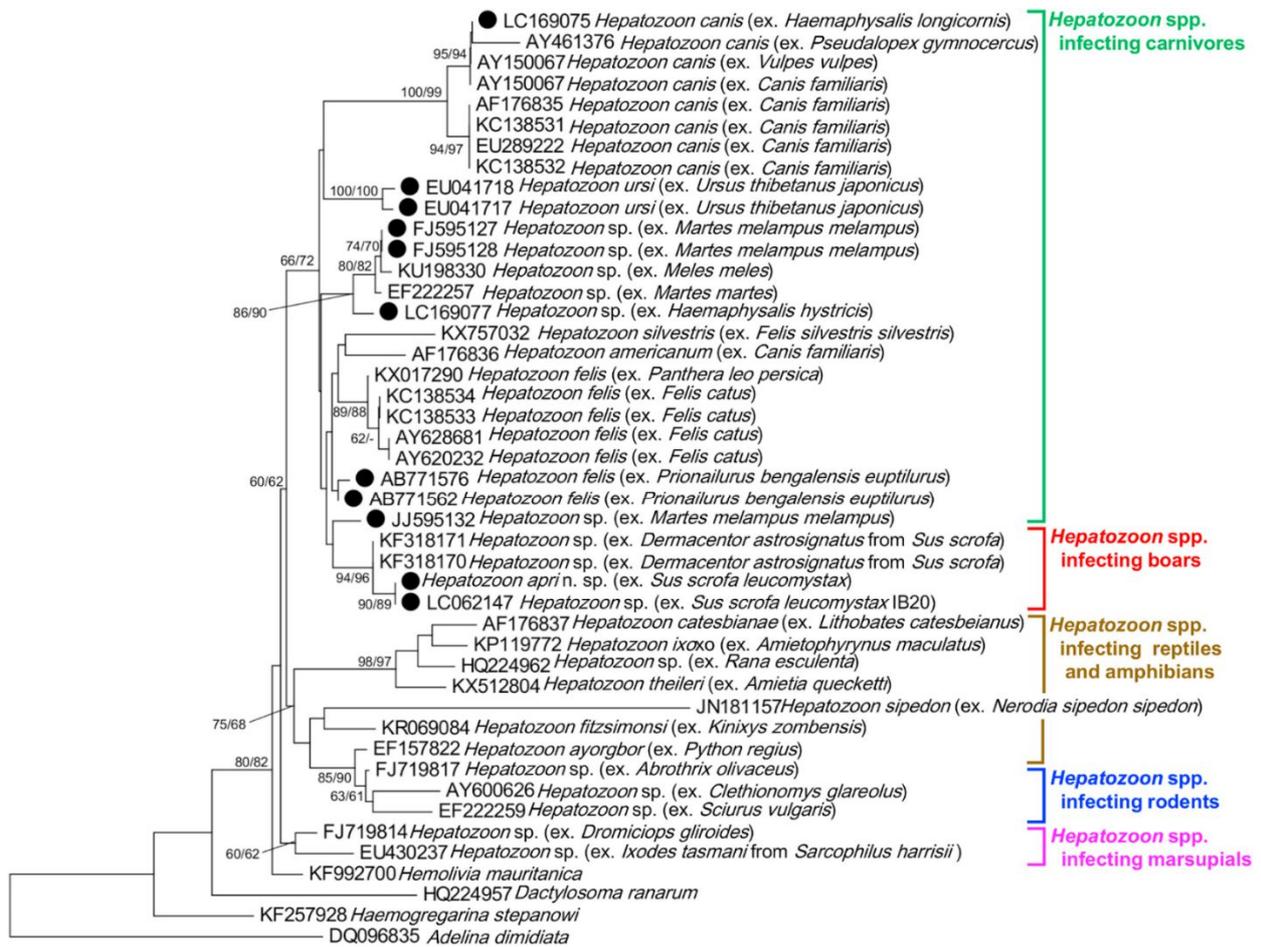


図 3. *Hepatozoon apri* および近縁種の 18S 配列に基づく遺伝子系統樹。

徳島および岐阜 (LC062147) のイノシシ由来配列は同一で、タイのマダニ由来配列 (KF318170、KF318171) とともに食肉動物由来 *Hepatozoon* 種からなるクレード内に位置した。

表 1. ガメトサイトの血球寄生率

宿主番号	寄生数 / 顆粒球数	寄生率 (%)
1	7 / 3,003	0.23
2	12 / 3,081	0.39
3	1 / 3,060	0.03
4	4 / 3,092	0.13
平均		0.20

表 2. ニホンイノシシおよびニホンジカの大腿部筋肉を用いた *H. apri* 遺伝子検出

	Japanese boars (n=181)				Sika deer (n=113)
	Juvenile		Young or older		
	Male	Female	Male	Female	
Positive	0 (0%)	1 (0.6%)	49 (27.1%)	46 (25.4%)	0 (0%)
Negative	8 (4.4%)	2 (1.1%)	36 (19.9%)	39 (21.5%)	113 (100%)
Total	8	3	85	85	113

表 3. ニホンイノシシおよびニホンジカの大腿部筋肉に寄生するダニからの *H. apri* 遺伝子の検出

検索した ダニの種類	発育期 (性)	宿主番号						計
		1	2	3	4	5	6	
タイワンカクマダニ	成 ()	0	0	0	0	1 (1*)	0	1
オオトゲチマダニ	成 ()	40 (26)	41 (13)	31 (3)	2	6 (3)	4 (4)	124
	成 ()	79 (20)	39 (3)	115 (2)	5	18	10 (7)	266
	若	136 (1)	113	121 (2)	6	2	2	380
	幼	0	7	1	0	0	0	8
キチマダニ	成 ()	28 (5)	7	12	6	3	0	56
	成 ()	47 (3)	16	44	8	1	0	116
	若	37	13	11	5	0	0	66
	幼	8	2	0	0	0	0	10
計		375 (55)	238 (16)	335 (7)	32	31 (4)	16 (11)	1027 (93)

括弧：解剖後に実体顕微鏡観察済みの個体

アスタリスク：オーシスト様構造物が検出された個体

平成 30 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）

わが国に分布する旋毛虫 *Trichinella* T9 の殺滅に有効な加熱条件の予備的検討

研究分担者 杉山 広 国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者 森嶋康之 国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨：わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因 *Trichinella* T9 を用いて、本虫の高温耐性を予備的に検討した。食中毒の発生防止のために、厚労省が野生鳥獣肉の加熱に求める条件（75℃で1分以上）と同等とされる65℃・15分で旋毛虫幼虫を処理したところ、マウスへの感染性が完全に消失した。

A. 研究目的

クマ肉を原因食品とする旋毛虫の集団食中毒事例が2016年末に発生した直後、厚労省は全国の自治体に速やかに事務連絡を发出し、野生鳥獣肉の提供・喫食に当たっては十分な加熱を行うように指導した（中心温度75℃で1分以上の加熱など、生食監発1223第1号・2016年12月23日）。しかし2018年5月に北海道において、同じくクマ肉の喫食を原因とした旋毛虫食中毒の集団事例が発生した。この二つの集団食中毒事例では、喫食前のクマ肉に加熱が施されていた。たとえば2016年の事例では、オープンでクマ肉（表面）を220～250℃・2～3分間加熱し、さらにアルミホイルに包んで5～10分蒸らしたが、この加熱後のクマ肉喫食者の中からも、患者が発生した。そこで本研究では、旋毛虫による食中毒の発生防止に有効な加熱条件を予備的に検討した。

B. 研究方法

当研究室では旋毛虫 *Trichinella* T9 をマウス(ddY系 雄)で実験室内継体している。本検討では、感染後約1年を経過したマウスを剖検し、その筋肉をペプシン塩酸液で人工消化して、本虫の幼虫を回収した。得られた幼虫は500隻ずつ生食水(0.5 mL)と共に、PCR用のチューブ(Thin-wall, 0.6 mL)に入れ、ウォーターバスに浸漬して加熱処理した(65℃、15分間)。加熱処理後のチューブは氷水(0℃)に浸漬して急速に冷却し、マウス(ddY系, 雄, 4頭)へ経口投与した。マウスは投与後64日に剖検し、全身の骨格筋・横隔膜・舌を一括して、ペプシン塩酸液で人工消化し、虫体回収を試み

た。加熱処理を行わない未処理の旋毛虫幼虫を用いた感染試験も併せて実施し、加熱による感染予防の効果を検証した。

C. 研究結果

(1) 加熱処理群(65℃、15分間)
虫体は全く検出されなかった(表1)。

(2) 非加熱処理群(陽性対照群)
旋毛虫幼虫は総てのマウス(4頭)から検出され、検出虫体数は1頭あたり平均12,050 ± 4,234隻であった(表1)。

表1. 加熱処理した旋毛虫 *Trichinella* T9 のマウスにおける感染性

群 ^a	幼虫処理		検出虫体数 ^b (1頭平均 ± SD)
	温度 (℃)	時間 (分)	
1	65	15	0
2	NH ^c		12,050 ± 4,234

a 各群のマウスは4頭(ddY系・雄・5週齢)

b 投与後64日に剖検し、全身の骨格筋等をペプシン塩酸液で人工消化して虫体検出

c NH (not heated):非加熱

D. 考察

野生鳥獣肉の提供・喫食にあたっては、中心部の温度が75℃で1分以上、十分に加熱して喫食することと「野生鳥獣肉の生成管理に関する指針(ガイドライン、厚労省)」に記述されている。クマ肉を原因食品とする旋毛虫の集団食中毒事例(2016年末)の

発生直後に、厚労省から全国の自治体に発出された事務連絡でも、この加熱条件またはこれと同等以上の効力を有する方法により、野生鳥獣肉は十分加熱して喫食すること、指示されている（生食監発 1223 第 1 号・2016 年 12 月 23 日）。さらに厚労省の「食肉の加熱条件に関する Q & A」で、<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000365043.pdf>

すなわち「75、1 分」と同等な加熱殺菌の条件としては、「70、3 分」、「69、4 分」、「68、5 分」、「67、8 分」、「66、11 分」、「65、15 分」が妥当とされている。その上で、調理の現場においては、中心温度計の適切な使用により、食肉の中心部の温度が目標とする温度を下回らないことを確認し、確実な加熱殺菌が行われるようにする必要があると注記されている。

今回は、これらの情報を参考として、調理の現場で好まれる「長時間だがより低い温度」の条件である 65、15 分を選び、その加熱条件が、わが国固有種の旋毛虫 *Trichinella* T9 の殺滅に有効か否か、予備的に検討した。その結果、65、15 分の加熱で旋毛虫は感染性を完全に消失し、試験マウスからの虫体回収は全く認められなかった。今後は厚労省が示した上述の各温度条件と処理時間で、旋毛虫の感染性が確実に死滅するのか、検討を加えたいと考えている。

旋毛虫は一般的に低温耐性が高いことが

知られており、種別表徴（表現型）として分類や同定にも活用されてきた。一方、高温耐性に関しては、逆に知見に乏しいように思われる。特に各幼虫に及ぶ加熱の温度と時間を定めた検討、あるいは中心温度を確実に測定する実験系での検討が乏しい。最近発生した旋毛虫食中毒の 2 事例では、喫食前のクマ肉に加熱が施されていたが、患者の発生を認めた。わが国固有の旋毛虫 T9 による食中毒が今後発生せぬように、感染の防止に資する加熱条件を、詳細に検討する必要があると考えられた。

E. 結論

わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因 *Trichinella* T9 を用いて、本虫の高温耐性を検討した。厚労省が野生鳥獣肉の加熱に求める 75 で 1 分以上と同等とされる 65・15 分で旋毛虫幼虫を処理したところ、マウスへの感染性が完全に消失した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表；2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得；2. 実用新案登録
なし

北海道で発生したクマ肉喫食が原因の旋毛虫食中毒に関する寄生虫学的研究

研究分担者 杉山 広 国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者 森嶋康之 国立感染症研究所寄生動物部

研究要旨：北海道において、クマ肉の喫食を契機に発疹や筋肉痛等の症状が発現した集団事例が、2018年5月に発生した（喫食者4名、患者3名）。患者が喫食したクマ肉の一部を検査したところ、旋毛虫の *Trichinella* T9 が検出され、原因が明らかとなった。クマ肉の喫食による旋毛虫による集団食中毒事例は、2016年末にも茨城県で発生しており、発生予防に関する啓発活動を継続的に展開する必要がある。

A. 研究目的

旋毛虫 *Trichinella spiralis* およびその近縁種（以下、まとめて旋毛虫とする）は、極めて重要な人獣共通の食品媒介寄生蠕虫であると、欧米各国において認識されている。特に豚肉あるいは馬肉の喫食を原因とした人体症例が、欧米では数多く報告されてきた。しかし本邦では、屠畜検査が必須の豚あるいは馬の肉を喫食して発症した確実な旋毛虫感染の事例は、報告がない。これに替えてクマ肉を介した集団感染事例が、1974年から1981年にかけて合計3度、発生している。さらに2016年12月にも、同じくクマ肉を原因食品とする旋毛虫の集団食中毒事例が発生した（摂食者は31名、発症者は21名）。2016年末の事例発生を受けて厚労省は、全国の自治体に速やかに事務連絡を発出し、関係事業者・消費者に対して、野生鳥獣肉の提供・喫食に当たっては十分な加熱を行うように指導した（生食監発1223第1号・2016年12月23日）。しかし、2018年5月に北海道において、またもやクマ肉の喫食を契機とした旋毛虫食中毒の集団事例が発生した。患者が喫食したクマ肉の一部が冷凍保存されており、その一部が国立感染症研究所寄生動物部に提供された。集団事例の原因究明の一環として、このクマ肉を検査し、寄生虫学的検討を加えた。

B. 研究方法

2018年5月に北海道で狩猟されたヒグマ1頭に由来する肉の喫食を原因とした集団

事例があり、患者が喫食したクマ肉の一部（約0.5kg、家庭用冷凍庫にて保存）が、主治医を介して、寄生虫学的な確定検査を目的に、国立感染症研究所寄生動物部に提供された（事例発生から約2か月後）。この肉を細切した後、ペプシン塩酸液で短時間、人工消化して、顕微鏡下に旋毛虫幼虫の検出を試みた。得られた虫体は常法によりDNAを調製した後、リボソームDNA・ITS領域を標的としたユニバーサルプライマー（NC5およびNC2）でPCR増幅し、増幅産物を用いたシーケンシングを行って種同定した。

C. 研究結果

検査したクマ肉の筋肉から旋毛虫の幼虫が検出された。虫体は筋肉内に被嚢し、一部あるいは全部が脱嚢していた（図1および2）。脱嚢して検出された虫体の体長は平均約1mmで、頭部側・食道部には、中央部に核を持つ極めて横長の方形の細胞（ステイコサイト）が、縦列して連続配置するステイコソームという構造が認められた。このような検出虫体の形態学的特徴と虫体の寄生部位（クマの筋肉）から、検出虫体を旋毛虫と判定した。遺伝子配列の解読結果も旋毛虫を裏付け、虫種はその中の *Trichinella* T9 と同定された。

D. 考察

今回の検討の結果、本事例（2018年5月発生）は、2016年12月に茨城県で発生したクマ肉の喫食による集団食中毒事例と同じく、原因が旋毛虫であると明らかになり、

虫種はその中の *Trichinella* T9 であった。旋毛虫は一般的に低温耐性が高く、例えば *Trichinella native* は、-18℃ の冷凍で5年間も感染性を保って生存することが知られている。このような虫種と比較すると、今回の事例の原因となった *Trichinella* T9 は冷凍耐性がやや低く、-18℃ の冷凍で感染性が維持されるのは約1か月と報告されている(それ以降は死滅する)。今回我々がクマ肉から検出した虫体も、検査に供するまでの2か月弱の期間、家庭用冷凍庫で保存されていた。この間の冷凍により、虫体は運動性も消失して、死滅したものと考えられた。その結果、検出虫体を用いた動物感染試験などは実施できなかった。

本事例の患者のうち、2名(第1例および第2例)は同居しており、ハンターから譲渡されたクマ肉を1週間程度冷蔵保存した後、自宅にてローストして喫食、約3週後に発症した。主な症状は発熱に続く全身の発疹、そして発咳・筋肉痛で、対症療法を施されていたが、好酸球増多をきっかけに寄生蠕虫感染を疑った主治医が食歴を問い、クマ肉の喫食歴が判明、抗体検査の結果から旋毛虫感染と診断された。駆虫剤としてアルベンダゾールが投与され、いずれも完治に至った。また第3例(第2例の母)は、同一のクマ肉を揚げてカツにして喫食し、同様の症状を発現したが、数日で症状が消失したことから、駆虫剤投与は受けていない。第4例(第3例の夫)も同一のクマ肉をカツで喫食したが、症状発現もなく、受診していない。このように本食中毒事例は、親族4名が同じクマ肉を喫食し、その内の3名が発症したという集団事例であった。

今回の事例では、いずれもクマ肉を加熱後に喫食している。しかし旋毛虫を完全に

殺滅する条件の加熱が不足していたと思われる。患者の中には、発症しながら駆虫剤投与を受けず、自然治癒した症例が含まれる。従って、クマ肉の喫食による旋毛虫の感染でも、旋毛虫幼虫の摂取数により、軽症に留まる事例の存在が示唆された。一方で、クマの筋肉における幼虫数が多い場合、あるいはクマ肉の喫食量が多い場合は、多数の旋毛虫幼虫を摂取して、重症例となる危険性がある。加熱が旋毛虫食中毒の確実な予防法であることから、クマ肉を含む野生鳥獣肉を喫食する場合は、十分な加熱(75℃で1分以上)が必要である。これを周知するような発生予防の啓発活動を、継続する必要があると考えられた。

E. 結論

2018年5月に北海道で発生したクマ肉喫食による集団食中毒事例について、患者が喫食した肉の一部を検査し、原因を旋毛虫 *Trichinella spiralis* の近縁種 *Trichinella* T9 であると明らかにした。クマ肉を喫食する場合は、十分に加熱することを内容に含めた発生予防の啓発活動に、継続的に取り組む必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表; 2. 学会発表
- なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

1. 特許取得; 2. 実用新案登録
- なし

図1．筋肉内の被囊から脱出しつつある旋毛虫幼虫

図2．脱囊した旋毛虫幼虫

検体を人工消化法により検査したところ、筋肉内の嚢胞から脱出しつつある旋毛虫幼虫（図1）および筋肉から脱囊した旋毛虫幼虫（図2）が回収された。虫体の頭部側・食道部には、中央部に核を持つ極めて横長の方形の細胞（スティコサイト、矢印）が、縦列して連続配置するスティコソームという構造が認められた。

