

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

住肉孢子虫による国産ジビエの食中毒リスク評価に関する研究

代表研究者 山崎朗子 岩手大学農学部共同獣医学科 助教

研究要旨

野生ニホンジカ筋肉中の住肉孢子虫 *Sarcocystis* を採取し、ウサギを用いた *in vivo* バイオアッセイにて腸管毒性を確認した。同時に、比較対象となるウマ寄生性住肉孢子虫 *Sarcocystis fayeri* を用いて毒性解析を行った。国内野生ニホンジカ筋肉組織、ウマ食用肉から住肉孢子虫シストを回収し、 -80 で冷凍保存したものと、 4 で冷蔵保存したものをホモジナイズし、シストからブラディゾイトを遊離させた懸濁液を用いてウサギ腸管ループテストを行なった。投与量はウマ由来冷凍シスト 5×10^5 /loop、シカ由来冷凍シスト 5.3×10^5 /loop、鹿由来冷蔵シスト 4.8×10^5 /loop であった。20 週齢オスの白色日本種ウサギを麻酔下にて開腹し、空回腸の血管周囲に腸管結紮ループを作製した。各ループにブラディゾイト懸濁液、陽性対照としてウェルシュ菌毒素、陰性対照として PBS を $500\mu\text{L}$ ずつ投与し、閉腹して約 18 時間後腸管ループ内の液体貯留を確認した。その結果、シカ由来冷蔵住肉孢子虫シストのブラディゾイト懸濁液に対して非出血性の液体貯留が認められた。このことから、冷蔵状態のシカ由来 *Sarcocystis* には腸管毒性があることが考えられる。冷蔵と冷凍による腸管毒性の相違を確認するため、ウマ由来 *Sarcocystis* シストを用いてウサギ腸管ループテストにて比較実験を行ったところ、 10^5 、 10^3 、どちらの投与量でも -80 で冷凍保存したシストは液体貯留を表さず、 4 冷蔵シストのみが出血性液体貯留を示した。シカ由来の *Sarcocystis* は非出血性の液体貯留であり、ウマ由来 *Sarcocystis* とは異なる腸管毒性と考えられる。更に、ウマ由来 *Sarcocystis* を分子量依存的にゲルろ過分画し、既に毒性が確認されている 15kDa 分画と分子量の異なる分画についても同様に腸管ループテストに供したところ、15kDa より分子量の小さい分画でもループ内液体貯留が認められた。ループの長さ (cm) と内容物重量 (g) から、液体貯留値 (Fluid accumulation Ratio : F/A 値) を $F/A = \text{内容物重量 (g)} / \text{ループ長 (cm)}$ にて求めた結果、FA 値は 15kDa 分画 (0.20) よりも大きい 0.30 であったため、15kDa タンパク質と同等またはより強い毒性を持った新規タンパク質が存在する可能性が示された。

ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の比較

A 研究目的

Sarcocystis 属の腸管毒性については、これまでウマに寄生する *S. fayeri* のシストホモジネートのゲル濾過クロマトグラフィー法により分離された 15 kDa タンパク質がウサギ腸管ループ試験で空腸ループ内に液体貯留を示すこと、その 15kDa タンパク質がアクチン脱重合因子(ADF)であること、*S. fayeri* の組み換え ADF がウサギ腸管ループ試験で液体貯留を示すことが報告されている(参考文献 1、2、3)。しかし、ニホンジカの骨格筋に寄生する *Sarcocystis* 属に関する毒性の情報は乏しい。そこで本研究では、ニホンジカの骨格筋に寄生する *Sarcocystis* 属の腸管毒性を確認するため、シストをホモジネートして遊離させたブラディゾイトを用いたウサギ腸管ループ試験を行った。

(参考文献)

1. Irikura D, Saito M, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Sugiyama KI, Watanabe M, Yamazaki A, Izumiyama S, Sato H, Kimura Y, Doi R, Kamata Y. 2017. Characterization of *Sarcocystis fayeri*'s actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea. *Genes Cells*.

22(9):825-835.

2. Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Bessho T, Inui T, Watanabe M, Konishi Y. 2014. A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning. *J Food Protection*. 5, 696-863.

3. 鎌田洋一. 2012. 寄生虫性食中毒 馬に寄生する *Sarcocystis fayeri* の構成タンパク質が食中毒を誘発する. *日獣会誌*. 65, 705-710.

B 研究方法

1. ニホンジカおよびウマ寄生 *Sarcocystis* 属を用いたマウス腸管ループ試験

供試した *Sarcocystis* 属試料

本研究の供試試料として、北海道に生息する野生ニホンジカの骨格筋組織、カナダ産ウマの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを分離して用いた。

ウサギ腸管ループ試験試料の調整
ウサギ腸管ループ試験を行うため、ニホンジカ、ウマの骨格筋組織から

Sarcocystis 属シストを回収した。表面を PBS で湿らせたニホンジカ骨格筋を実体顕微鏡下で観察し、精密ピンセットを用いて約 50 個の *Sarcocystis* 属シストを 400 μL の PBS 中に回収した。これを生シストとして数日中に試験に用いた。

また、これを 6000 rpm で 3 分間遠心した後、PBS を取り除き -80°C で冷凍保存したものを冷凍シストとし、試験に用いた。

使用時に BioMasher (ニッピ) を用いてホモジナイズし、シストからブラディゾイトを遊離させた液をブラディゾイト懸濁液とした。10 μL のブラディゾイト懸濁液を同量の 0.4 w/v% トリパンプルー溶液 (和光純薬) と混合し、ビルケルチュルク血球計算盤ブライトライン (サンリード硝子) を用いて 1 mL 当たりのブラディゾイト数とブラディゾイトの生存率 (生ブラディゾイト数/全ブラディゾイト数 \times 100) を算出した (図 1)。1 回目のウサギ腸管ループ試験においてウマ由来冷凍シストから遊離させたブラディゾイトを 1.0×10^5 /loop と 1.0×10^7 /loop に、シカ由来冷凍シストから遊離させたブラディゾイトを 1.0×10^5 /loop と 1.0×10^7 /loop に調整した (図 2 b.)。2 回目のウサギ腸管ループ試験においてウマ由来冷凍シストか

ら遊離させたブラディゾイトを 5.0×10^5 /loop に、シカ由来冷凍シストから遊離させたブラディゾイトを 5.3×10^5 /loop に、シカ由来生シストから遊離させたブラディゾイトを 4.8×10^5 /loop に調整した (図 3 b.)

ウサギ腸管ループ試験

ブラディゾイト懸濁液を試料とし、ウサギ腸管ループ試験を行った。供試したウサギ (熊谷重安商店) は、白色日本種、オス、21, 22 週齢、3.0 kg 体重であった。36 時間の絶食後、ミダゾラム 0.3 mg/kg bw、メドトミジン 0.2 mg/kg bw、ブトルファノール 0.3 mg/kg bw を用いて鎮静、アルファキサロン 6.0 mg/kg bw を用いて麻酔を行い、開腹して空回腸の血管周囲に幅約 3~12 cm で腸管結紮ループを作製した。各ループにブラディゾイト懸濁液を 500 μL 、陽性対照として当研究室保有の組換えウェルシュ菌毒素を 40 μg /500 μL 、陰性対照として PBS を 500 μL ずつ投与し、閉腹して約 18 時間後にソムノペンチル 100 mg/kg bw の静脈内投与によりウサギを安楽殺し、ループ内の液体貯留を確認した。各ループの長さ (cm) と内容物重量 (g) を測定し、液体貯留値 (Fluid accumulation Ratio、以下、F/A 値) を以下の計算式で求めた。

$F/A = \text{内容物重量(g)}/\text{ループ長(cm)}$
また、各ループの粘膜面を実体顕微鏡で観察し、その状態を観察した。

2. ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属を用いたマウス腸管ループ試験

供試した野生ニホンジカ試料

本研究の供試検体として、国内に生息する野生ニホンジカの骨格筋肉組織、および横隔膜を用いた。検体採取地域は長崎県、三重県、長野県、千葉県、北海道の5地域である。検体は管理番号として、長崎県はN、三重県はM、長野県はNN、千葉県はC、北海道はEの略称で表記し、捕獲時期が早い順番に、1から順に検体番号を付けて管理した。一部のニホンジカ検体から *Sarcocystis* 属シストを単離し、その管理番号として、由来検体番号に1から順に検体番号を付けて管理した。

ICR マウス腸管結紮ループ試験試料の調整

ICR マウス腸管結紮ループ試験を行うため、野生ニホンジカ(N41、N111、C22、E171)の骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを回収した。表面をPBSで湿らせたニホンジカ骨格筋を実体顕微鏡下で観察し、精密ピンセットを用いて約50個の *Sarcocystis*

属シストを400 μL のPBS中に回収した。これをBioMasher(ニッピ)を用いてホモジナイズし、ブラディゾイト懸濁液とした。10 μL のブラディゾイト懸濁液を同量の0.4 w/v%トリパンプルー溶液(和光純薬)と混合し、ビルケルチュルク血球計算盤ブライトライン(サンリード硝子)を用いて1 mL当たりのブラディゾイト数とブラディゾイトの生存率(生ブラディゾイト数/全ブラディゾイト数 \times 100)を算出した。

ICR マウス腸管結紮ループ試験

ブラディゾイト懸濁液を試料とし、ICR マウス腸管結紮ループ試験を行った。供試したICR マウス(SIc:ICR、熊谷重安商店)は、16-34週齢、体重30-46 gであった。24時間の絶食後、ソムノペンチル(共立製薬) 0.04 mg/gbwを用いて麻酔し、開腹して空回腸の血管周囲に幅約1 cmで腸管結紮ループを作製した。各ループにブラディゾイト懸濁液(平均 5.3×10^7 数/mL)を100 μL 、陽性対照として当研究室保有の組換えウエルシュ菌毒素を25 μg 、陰性対照としてPBSを100 μL ずつ投与し、閉腹して約18時間後にICR マウスを安楽殺し、ループ内の液体貯留を確認した。各ループの長さ(cm)と内容物重量(g)を測定し、内

容物重量をループの長さで除することで液体貯留値 (Fluid accumulation Ratio、以下、F/A 値) を求めた。また、各ループの粘膜面を実体顕微鏡で観察し、その状態を観察した。

C 研究結果

1. ニホンジカおよびウマ寄生

Sarcocystis 属を用いたウサギ腸管ループ試験

ウサギ腸管ループ試験に使用したブラディゾイト懸濁液の生存率は冷凍シストではウマ寄生、シカ寄生ともに0%、生シストでは94.3%であった(図2b、3b)。

1回目の試験結果においては、陽性対照、陰性対照を注入したループで液体貯留が認められたが、それらと比較して液体貯留を引き起こした検体はなかった(図2)。2回目の試験結果においても陽性対照、陰性対照を注入した位置で液体貯留が認められ、シカ由来の生シストから調整したブラディゾイトにおいてのみ、陰性対照を注入した位置と同程度の液体貯留が認められた(図3)。腸粘膜面については1回目の試験結果の陰性対照の注入部位においてのみ明らかな充血が認められた。

2. ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属を

用いた ICR マウス腸管結紮ループ試験

ICR マウス腸管結紮ループ試験に使用したブラディゾイト懸濁液の濃度とブラディゾイト生存率は、N41 で 8.5×10^7 数/mL (生存率データなし)、N111 で 9.6×10^6 数/mL (97.4%生存)、C22 で 8.0×10^7 数/mL (85.5%生存)、E171 で 3.8×10^7 数/mL (97.8%生存) であった。腸管結紮ループ試験の結果 F/A 値は、N41 ではブラディゾイト懸濁液投与ループで 0.096、陽性対照投与ループで 0.063、陰性対照投与ループで 0.056 であった。N111 ではブラディゾイト懸濁液投与ループで 0.113、陽性対照投与ループで 0.080、陰性対照投与ループで 0.020 であった。C22 ではブラディゾイト懸濁液投与ループで 0.128、陽性対照投与ループで 0.015、陰性対照投与ループで 0.013 であった。E171 ではブラディゾイト懸濁液投与ループで 0.125、陽性対照投与ループで 0.060、陰性対照投与ループで 0.010 であった。F/A 値の平均はブラディゾイト懸濁液投与ループで 0.116、陽性対照投与ループで 0.055、陰性対照投与ループで 0.025 であった(表1、図4)。

実体顕微鏡で観察したループの粘膜面には、陽性対照投与ループでは著しい充血が認められたが、ブラデ

イゾイト懸濁液投与ループおよび陰性対照投与ループでは充血が認められなかった(図5)。

D 考察

1. ニホンジカおよびウマ寄生

Sarcocystis 属を用いたウサギ腸管ループ試験

4.8×10^5 のシカ由来 *Sarcocystis* 属のブラディゾイトがウサギ腸管ループテストにおいて非出血性の液体貯留を示した。一方、 -80 で一度冷凍した *Sarcocystis* 属ブラディゾイトは液体貯留を示さなかった。色素試験の結果から、 -80 の冷凍処理によりブラディゾイトが感染能を失う、または死滅した可能性が考えられる。その結果、腸管毒性を失い、液体貯留を引き起こさなくなったと推測される。

2. ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属を用いたマウス腸管ループ試験

国内野生ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属のシストを 50 個回収し、ブラディゾイトを懸濁させて ICR マウス腸管結紮ループ試験を試みた。F/A 値の平均はブラディゾイト懸濁液投与ループで 0.116、陽性対照投与ループで 0.055、陰性対照投与ループで 0.025 であった(図4、5)ことから、ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属の

ブラディゾイトの下痢原性がマウス腸管ループ試験でも確認された。

本試験では採取地域の異なる試料を用い、ニホンジカ亜種のキュウシュウジカ、ホンシュウジカ、エゾシカに寄生していた *Sarcocystis* 属の腸管毒性を比較した。これらのすべてが下痢原生を示したことから、日本全域に下痢原生を持つ *Sarcocystis* 属が分布していることが示唆される。

また、考察1.で述べたウサギ腸管ループ試験においても、シカ寄生 *Sarcocystis* 属による腸管毒性は非炎症非出血性であり、これまでに報告された、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* を用いたウサギ腸管ループ試験結果の出血および炎症性の腸管毒性は一度も認められなかった。このことから、シカ由来の *Sarcocystis* 属が持つ腸管毒性は *S. fayeri* と異なる性質であることが考えられるが、これには腸管毒性を保持した状態(4 冷蔵保存)での同じ実験動物を用いた比較検証が必要である。

本試験でのブラディゾイト濃度の平均は 5.3×10^7 /mL でであったため、 10^6 程度のブラディゾイトがマウスに対し腸管病原性を示す可能性が示唆される。マウスとヒトでは種差があると考えられるため、ヒトで下痢原生を發揮するブラディゾイト数を調

査することが今後の課題となる。

しかし、後述の「ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性発現量と冷凍処理による毒性の低減」に報告するように、ウサギで下痢毒性を示す 10^3 プラディゾイトに比べて 1000 倍量を必要としたため、感度の点でマウスを腸管毒性確認試験の動物モデルとしてマウスを用いることには疑問が残り、より詳細な毒性解析にはウサギを用いる必要性が考えられる。

E 結論

野生ニホンジカ筋肉中の住肉胞子虫を採取し、実験用ウサギを用いた *in vivo* バイオアッセイにて腸管毒性を確認した。同時に、比較対象となるウマ寄生性 *Sarcocystis* 属を用いて毒性解析を行った。

国内から採取した野生ニホンジカ筋肉組織、および研究用として取り寄せたウマ食用肉からピンセットを用いて住肉胞子虫シストを回収し、 -80 で冷凍保存したものと、 4 で冷蔵保存したものをを用いてウサギ腸管ループテストを行なった。

ウマ由来冷凍シスト 5×10^5 /loop、生存率 0%、シカ由来冷凍シスト 5.3×10^5 /loop、生存率 0%、鹿由来冷

蔵シスト 4.8×10^5 /loop、生存率 94.3%であった。白色日本種ウサギを用いて腸管ループ試験を行なった結果、シカ由来冷蔵住肉胞子虫シストのプラディゾイト懸濁液に対して非出血性液体貯留が認められた。

このことから、冷蔵状態のシカ由来の *Sarcocystis* 属原虫にはウマ由来 *Sarcocystis* 属同様に腸管毒性があることが考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

住肉胞子虫の腸管毒性に関する研究
Development of novel detection method for pathogenic microbes in game meat

山崎朗子、谷田奈津美、白藤由紀子平成 30 年度岩手大学農学部 附属動物医学食品安全教育研究センター成果発表会 2019 年 2 月 28 日、岩手

住肉胞子虫の腸管毒性研究

山崎朗子 東京農工大学・岩手大学獣医学合同シンポジウム 2019 年 3 月 8 日 東京

シカ筋肉由来生シストから遊離した
ブラディゾイド(矢印)



シカ筋肉由来冷凍シストから遊離した
ブラディゾイド(矢印)

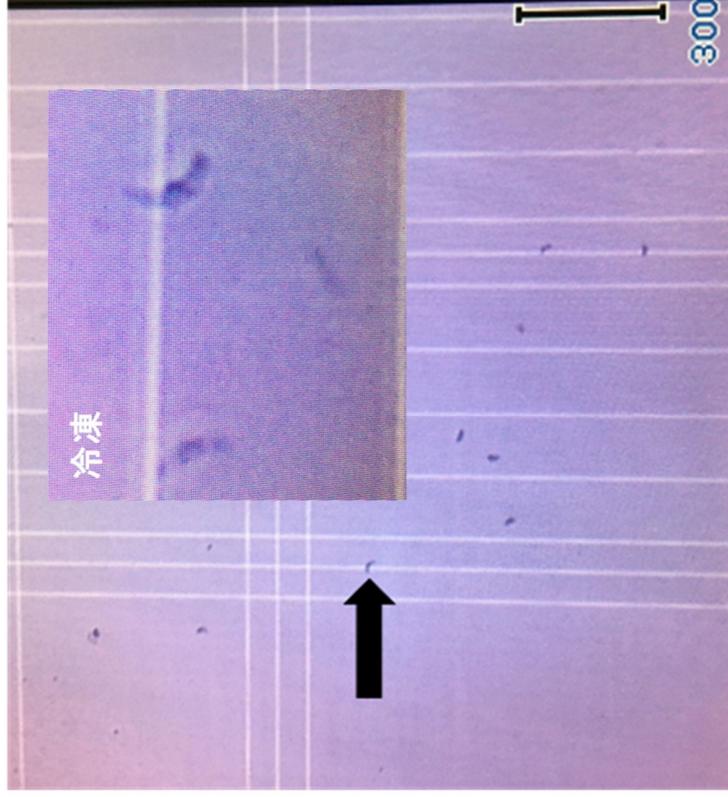


図1．ブラディゾイドのトリパンブルーを用いたダイテステ像

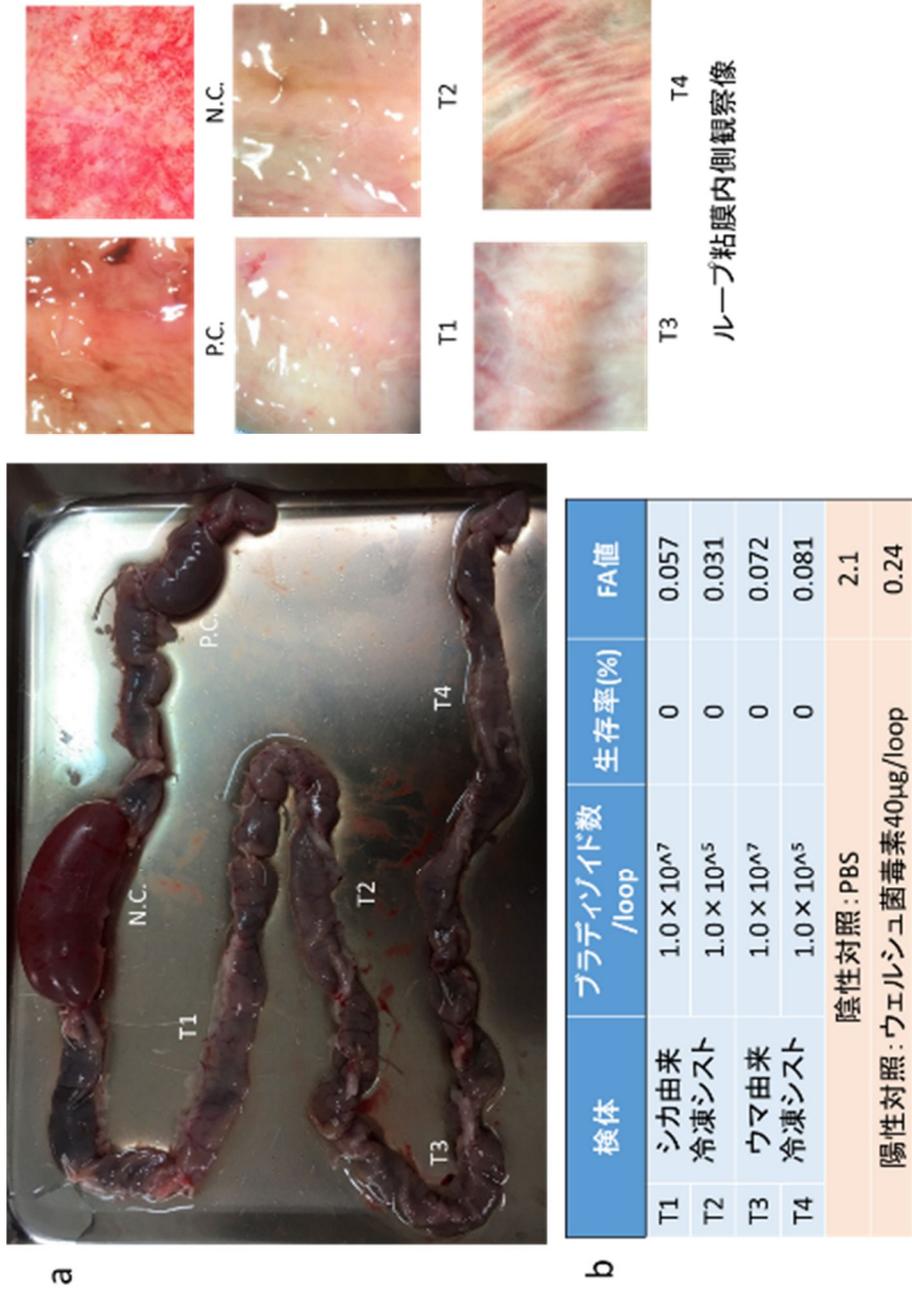


図2 . a. ウサギ腸管ループ試験結果 一回目

b. ウサギ腸管ループ試験使用検体とFA値

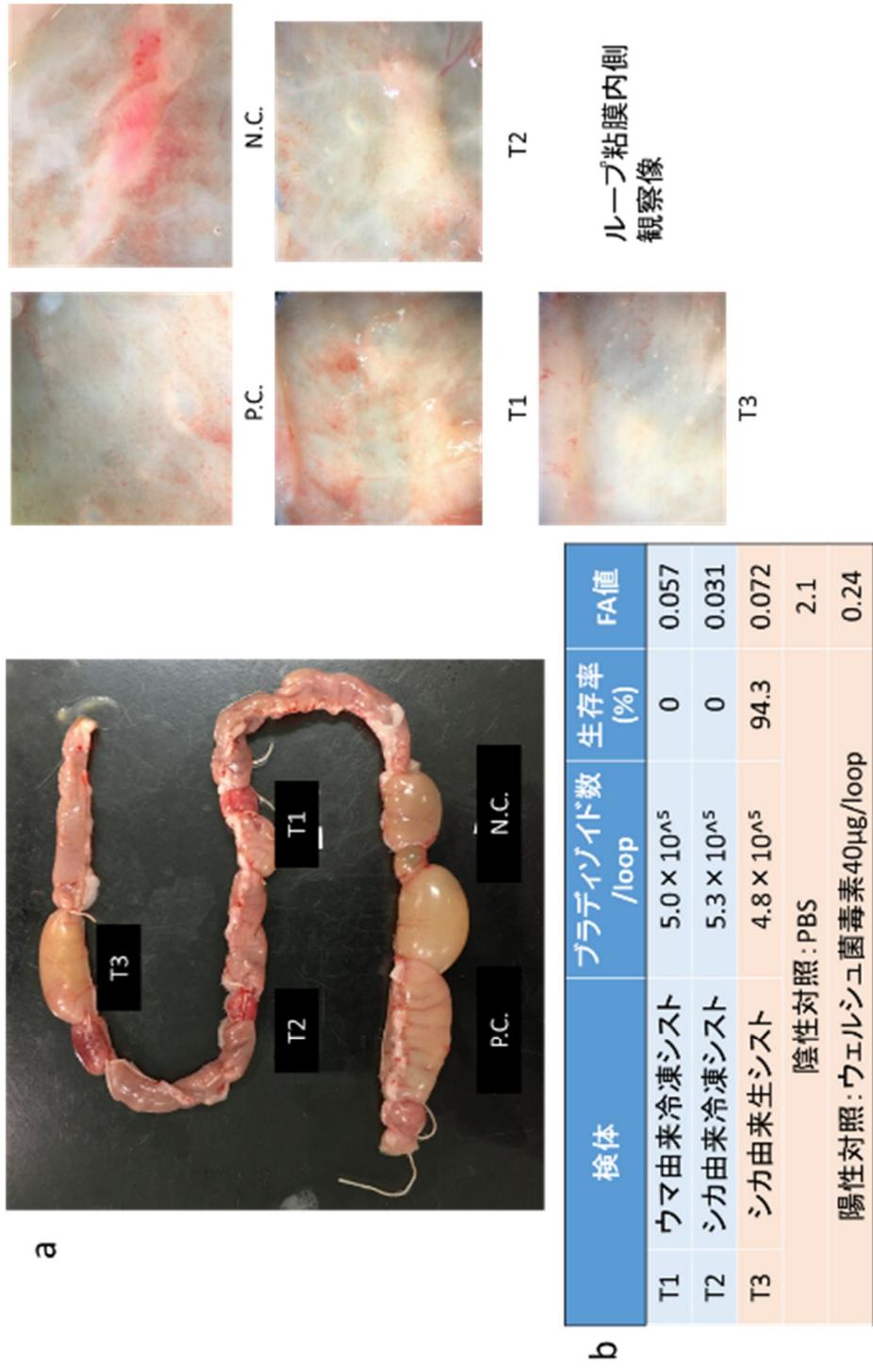


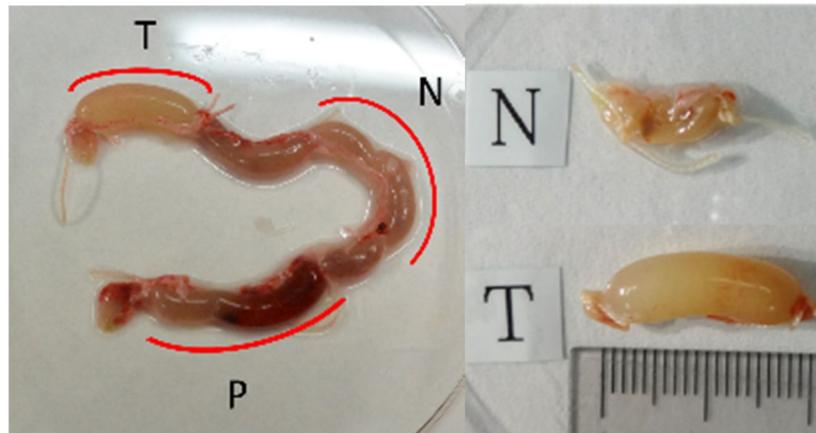
図3 . a. ウサギ腸管ルーブ試験結果 二回目
b. ウサギ腸管ルーブ使用検体とFA値

表 1. 国内野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属を用いた ICR マウス腸管結紮ループ試験における F/A 値

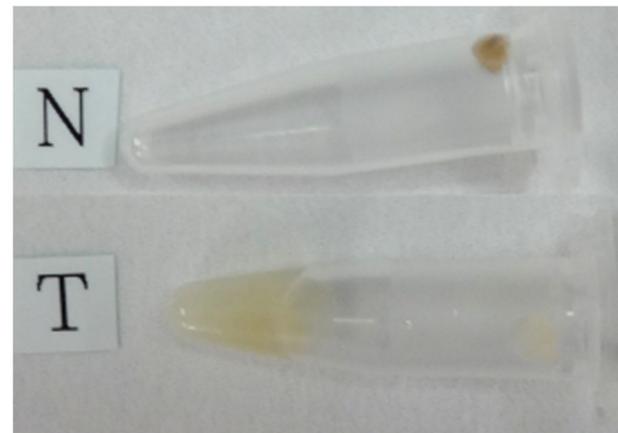
| Sample No. | 投与物質 (in 100 μ L of PBS) | | | | | |
|------------|------------------------------|-------|-----------------------|-------|---------------|-------|
| | ブラディゾイト | | 陽性対照 (組換えウエルシュ菌毒素) | | 陰性対照 (PBS) | |
| | 投与量(数) | F/A | 投与量(μ g) | F/A | 投与量(μ L) | F/A |
| N41 | 8.5×10^6 | 0.096 | 25 | 0.063 | 100 | 0.056 |
| N111 | 9.6×10^5 | 0.113 | 25 | 0.080 | 100 | 0.020 |
| C22 | 8.0×10^6 | 0.128 | 25 | 0.015 | 100 | 0.013 |
| E171 | 3.8×10^6 | 0.125 | 25 | 0.060 | 100 | 0.010 |
| F/A平均値 | | 0.116 | | 0.055 | | 0.025 |

F/A 値：ループ内液体貯留値、重量(g)/長さ(cm) で算出

ループ外観



ループ内容物



T : プラディゾイト投与ループ N : 陰性対照投与ループ P : 陽性対照投与ループ

図4. 国内野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属を用いた
ICR マウス腸管結紮ループ試験におけるループの外観と内容物



T : プラディゾイト投与ループ N : 陰性対照投与ループ P : 陽性対照投与ループ

図5. 国内野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属を用いた ICR マウス腸管結紮ループ試験におけるループの粘膜面

ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性発現量と冷凍処理による毒性の低減

A. 研究目的

シカ寄生 *Sarcocystis* 属生シスト破碎液ではウサギ腸管ループ試験で液体貯留を示したのに対し、-80℃ 冷凍処理シスト破碎液では液体貯留は示さなかったことから、-80℃ で腸管毒性がなくなることが示唆された(前項ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の比較 図2、図3)。この際用いた色素試験(Dye test)による生存率が0%であったことから、ブラディゾイトの感染能が失われた、または死滅により毒性が亡くなったものと考えられた。

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「野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究」報告、本田らによる報告(参考文献1)では、*Sarcocystis* 属のブラディゾイトは低温に弱く、-20℃、-30℃、-80℃にて1時間で死滅するとのことであったが、Irikusaら、kamataらが行なった腸管毒性研究(参考文献2,3)では、-80℃で保存した *Sarcocystis* 属原虫感染馬肉を用いたウサギ腸管ループ試験で腸管毒性を証明している。

そこで、本研究では、-80℃ 24時間の冷凍処理を行ったブラディゾイト

と4 24時間のチルド保存したブラディゾイトの腸管毒性をウサギ腸管ループ試験にて比較検討した。

また、前項 ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の比較にて、マウスを用いた腸管ループ試験では 10^6 ブラディゾイトで腸管毒性を起こしたのに対し、体重体調共に数倍大きいウサギを用いた腸管ループ試験では 10^5 ブラディゾイトと却って少ない量で腸管毒性を示したことから、マウスより感受性が高いと考えられるウサギを用いて腸管毒性を呈する接種量を検討し、リスク評価を試みた。

(参考文献)

1. Honda M, Sawaya M, Taira K, Yamazaki A, Kamata Y, Shimizu H, Kobayashi N, Sakata R, Asakura H, Sugita-Konishi Y. 2018. Effects of temperature, pH and curing on the viability of *Sarcocystis*, a Japanese sika deer (*Cervus Nippon centralis*) parasite, and the inactivation of their diarrheal toxin. J Vet Med Sci. 2018 Aug 80 (8):1337-1344

2. Irikura D, Saito M, Sugita-

Konishi Y, Ohnishi T, Sugiyama KI, Watanabe M, Yamazaki A, Izumiyama S, Sato H, Kimura Y, Doi R, Kamata Y. 2017. Characterization of *Sarcocystis fayeri*'s actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea. *Genes Cells*. 22(9):825-835.

3. Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Bessho T, Inui T, Watanabe M, Konishi Y. 2014. A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning. *J Food Protection*. 5, 696-863.

B. 研究方法

1. *Sarcocystis* 属シストの調整

本研究の供試試料として、カナダ産ウマの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを分離して用いた。シストを 50 個採取し、4 と -80 に分別して 24 時間保存した。それぞれを生シスト、冷凍シストとする。

腸管ループ試験に供試する際に前項と同様にホモジナイズし、シストからブラディゾイトを遊離させ、トリパンプル溶液と混合し、色素試験によってブラディゾイト生存率(生ブラディゾイト数/全ブラディゾイト数 ×

100) を算出した(図 1 b)。

ウサギ腸管ループ試験においてウマ由来冷凍シストから遊離させたブラディゾイトを 4.7×10^5 /loop と 4.7×10^3 /loop に、冷蔵シストから遊離させたブラディゾイトを 4.1×10^5 /loop と 4.1×10^3 /loop に調整した(図 1 b.)

2. ウサギ腸管ループ試験

ウサギ腸管ループテストは前項ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の比較にて検証したウサギ腸管ループ試験と同様に行った。

白色日本種ウサギ(オス、2.3 kg 体重)を 36 時間の絶食後、ミダゾラム 0.3 mg/kg bw、メデトミジン 0.2 mg/kg bw、ブトルファノール 0.3 mg/kg bw の筋肉内投与にて鎮静、アルファキサロン 6.0 mg/kg bw の筋肉内投与にて麻酔を行い、開腹して空回腸の血管周囲に幅約 3~12 cm で腸管結紮ループを作製した。各ループにブラディゾイト懸濁液を 500 μ L、陽性対照として当研究室保有の組換えウェルシュ菌毒素を 40 μ g/500 μ L、陰性対照として PBS を 500 μ L ずつ投与し、閉腹して約 18 時間後にソムノペンチル 100 mg/kg bw の静脈内投与によりウサギを安楽殺し、ループ内の液体貯留を確認した。

各ループの長さ(cm)と内容物重量(g)を測定し、液体貯留値(Fluid accumulation Ratio、以下、F/A値)を以下の計算式で求めた。
 $F/A = \text{内容物重量(g)} / \text{ループ長(cm)}$
また、各ループの粘膜面を実体顕微鏡で観察し、その状態を観察した。

C. 研究結果

ウサギ腸管ループ試験に使用したブラディゾイト懸濁液の生存率は冷凍シストでは67%、生シストでは80%であった(図1.b)。

4で24時間保存した生シストを調整したブラディゾイトを用いた腸管ループ試験では、 4.7×10^5 、 4.7×10^3 ブラディゾイト/loopのいずれにおいても液体貯留を示した。FA値は陰性対照が0.037、陽性対照が0.68であったのに対し、それぞれ 4.7×10^5 で0.67、 4.7×10^3 で0.58であった。また、腸管粘膜面には出血が見られた。しかし、-80で24時間冷凍処理した冷凍シストを調整したブラディゾイトを用いた腸管ループ試験では、 4.1×10^5 、 4.1×10^3 ブラディゾイト/loopのいずれにおいても液体貯留は認められず、FA値は0.036、0.043と、陰性対照値0.037と同様であった。また、粘膜面の出血は認められなかった。(図1.a、図2)

D. 考察

前項ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の報告にて行われた腸管ループ試験では、-80の冷凍処理により色素試験陽性となった検体(生存率0%)においては、ニホンジカ寄生、ウマ寄生、どちらの *Sarcocystis* 属のブラディゾイドについても数に関わらず液体貯留を示さなかったため、-80での冷凍により *Sarcocystis* 属は感染能を失うまたは死滅することにより腸管毒性は消失すると考えられた。

しかし、本研究において、ウマ由来 *Sarcocystis* 属シストを-80で24時間保存した場合、色素試験陰性となり、生存率は67%と、4で24時間保存した場合の80%と大差なく、感染能を保持、生存を継続していることが分かった。だが、生存率67%である-8024時間保存のブラディゾイトを投与した腸管は液体貯留、出血のどちらも示さず、腸管毒性が消失していることが示唆された。

以上の事象から推察されることは、ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の持つ腸管毒性は、原虫自体の感染能と独立しており、-8024時間の冷凍により失活する物質または機序に基づくものである。

この推察については、*Sarcocystis* 属原虫が持つ毒性因子を分離同定することで詳細に検討されると考えられる。

また、前項ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の報告にてマウスを用いた腸管ループ試験では平均 10^5 ブラディゾイト/loop の摂取量で腸管毒性を呈したのに対し、本研究結果では、1/100 量である 10^3 ブラディゾイト/loop でも明らかな陽性を示した。FA 値では 10^5 ブラディゾイト/loop をわずかに下回ったことから、腸管毒性の強さはブラディゾイトの量依存的であることが推察される。しかし、腸管毒性を起こす接種量の下限には程遠いことが腸管ループ試験の結果からも明らかであるため、 10^2 、 10^1 ブラディゾイトなど、さらに少ない量での接種実験が必要である。

前項のシカ由来の *Sarcocystis* 属を用いたウサギ腸管ループ試験で認められた腸管毒性は全て非出血性・非炎症性であったが、本研究でウマ由来 *Sarcocystis* 属を用いた腸管ループ試験では、明らかな出血性・炎症性腸管毒性を呈した。本研究では、前項と同じくウサギを用い、シストも 4 保存と条件を揃えたため、ウマ由来 *S. fayeri* の持つ腸管毒性とシカ由来

Sarcocystis 属原虫の持つ腸管毒性は異なるものだと決定付けられる。

ウマ、ニホンジカ等の *Sarcocystis* の感染率が高い動物については食肉利用にあたり筋肉の生食は食中毒を引き起こすため、 -20 にて 48 時間以上の冷凍の後解凍し流通する、または加熱して喫食する、等の通知およびガイドラインが施行されている。しかしこの研究結果から、*Sarcocystis* 属に限定して言えば、 -20 より食味を損ねない -80 の冷凍処置でも食中毒危害は回避できるかもしれない。あくまで可能性であるが、よりチルドに近い食味の良好な状態での流通を実現する一考察となりうるものが考えられる。

E. 結論

Sarcocystis 属の腸管毒性について、腸管毒性を呈する摂取量の検討と、温度による毒性強度の変化について、実験用ウサギを用いた in vivo バイオアッセイにて確認した。

研究用として取り寄せたウマ食用肉からピンセットを用いて住肉胞子虫シストを回収し、 -80 で 24 時間冷凍保存したものと、 4 で 24 時間冷蔵保存したものをを用いてウサギ腸管ループテストを行なった。

その結果、 10^5 、 10^3 のどちらの投与量でも -80 で冷凍保存したシストは

液体貯留を表さず、4 冷蔵シストのみが出血性液体貯留を示した。しかし、ブラディゾイトの生存率は、-80 保存で58%、4 保存で67%と大差なく、ウマ寄生 *Sarcocystis* 属の腸管毒性はブラディゾイト自体の感染能・生存とは直接関連しない機構であることが考えられた。

また、シカ由来の *Sarcocystis* 属原虫を用いた腸管ループ試験では認められなかった出血炎症が呈されたため、ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性は異なることが考えられる。

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

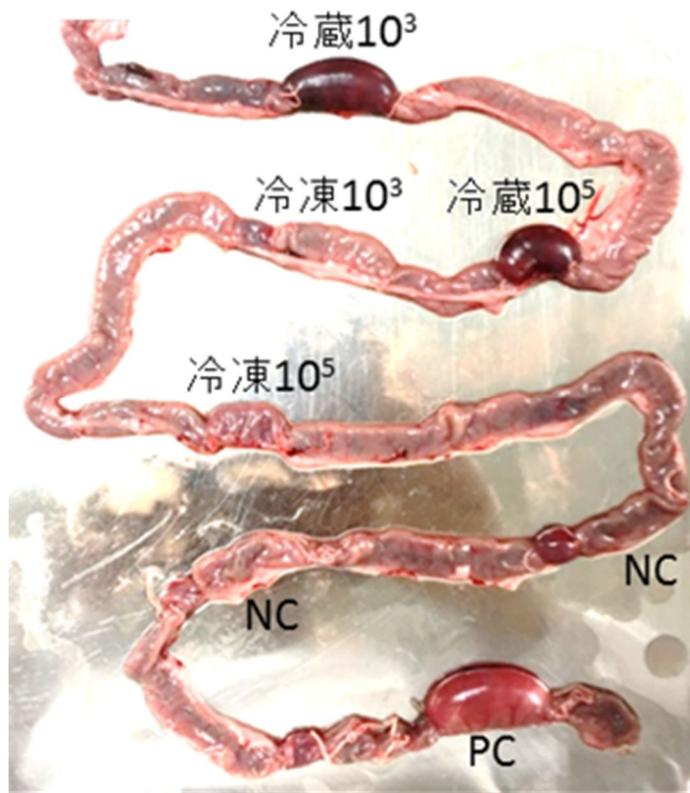
住肉胞子虫の腸管毒性に関する研究 Development of novel detection method for pathogenic microbes in game meat

山崎朗子、谷田奈津美、白藤由紀子
平成 30 年度岩手大学農学部 附属動物医学食品安全教育研究センター成果発表会 2019 年 2 月 28 日、岩手

住肉胞子虫の腸管毒性研究

山崎朗子 東京農工大学・岩手大学
獣医学合同シンポジウム 2019 年 3 月 8 日 東京

a



冷凍: -80°C24h保存
生: 4°C24h保存

b

| 検体 | ブラディゾイト数/loop | 生存率(%) | FA値 |
|-------------------------|-----------------|--------|-------------|
| ウマ由来冷凍シスト | 10 ⁵ | 67 | 0.036 |
| ウマ由来冷凍シスト | 10 ³ | | 0.043 |
| ウマ由来生シスト | 10 ⁵ | 80 | 0.67 |
| ウマ由来生シスト | 10 ³ | | 0.58 |
| 陰性対照: PBS | | | 0.037、0.017 |
| 陽性対照: ウェルシュ菌毒素40ug/loop | | | 0.68 |

図 1

a 冷凍および冷蔵ウマ由来 *Sarcocystis* 属シストを用いたウサギ腸管ループ試験

b ウサギ腸管ループ試験に用いたブラディゾイト数、生存率および FA 値

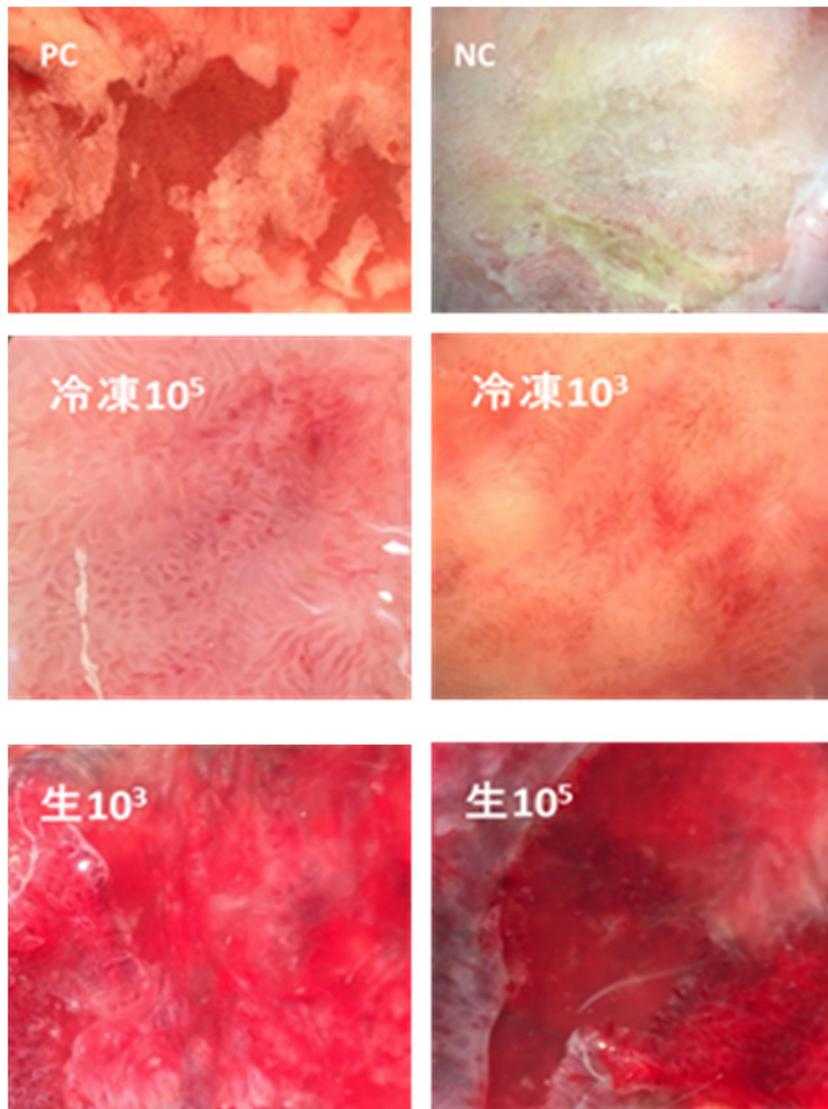


図 2

冷凍および冷蔵ウマ由来 *Sarcocystis* 属シストを用いたウサギ腸管ループ試験
腸管内側の観察像

ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の毒性タンパク質の検出

A. 研究目的

ウマ寄生 *Sarcocystis* 属について、シストホモジネートのゲル濾過クロマトグラフィー法により分離された 15 kDa タンパク質 (ADF) がウサギ腸管ループ試験で液体貯留を示すことが報告されている (参考文献 1、2)。しかし、既出の研究報告によると、ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の虫体タンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーにて分画した後、単一ピークで現われた 15kDa のタンパク質のみを腸管ループ試験に用い、他のピーク分画については検証していないことが明らかになった (図 1)。

本研究では、15kDa タンパク質以外の *Sarcocystis* 属原虫虫体タンパク質の腸管毒性について検証することを目的とした。

(参考文献)

1. Irikura D, Saito M, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Sugiyama KI, Watanabe M, Yamazaki A, Izumiyama S, Sato H, Kimura Y, Doi R, Kamata Y. 2017. Characterization of *Sarcocystis fayeri*'s actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea.

Genes Cells. 22(9):825-835.

2. Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Bessho T, Inui T, Watanabe M, Konishi Y. 2014. A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning. J Food Protection. 5, 696-863.

B. 研究方法

1. ゲル濾過クロマトグラフィー法によるウマ寄生 *Sarcocystis* 属シストタンパク質の分画

- 1) 凍結融解による *Sarcocystis* 属シスト水溶性成分の回収

ゲル濾過クロマトグラフィー法に用いる *Sarcocystis* 属シストタンパク質溶液を得るため、シストを凍結融解して水溶性成分を回収した。カナダ産ウマ筋肉検体を材料とし、*Sarcocystis* 属シストを 1,500 個回収した。回収したシストを -80 で凍結し、37 に保温した恒温水槽で解凍した。再び -20 で凍結し、37 に保温した恒温水槽で解凍した。解凍後、BioMasher (ニッピ) を用いてホモジナイズし、10,000 × g、4、10 分間の条件で遠心し上清を回収した。

2) ゲル濾過クロマトグラフィー法による *Sarcocystis* 属シスト内タンパク質の分画

回収した上清をサンプル溶液としてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。クロマトグラフィーの流路は以下のように設定した。ペリスタポンプ (ATTO) を用いてサンプル溶液およびバッファーを汲み上げ、Superdex 75 increase 10/300 GL (GE ヘルスケア) を用いて分画し、分画溶液の吸光度を BIO-MINI UV MONITOR (ATTO) および DIGIMINI RECORDER (ATTO) を用いて測定し、CHF100AA FRACTION COLLECTOR (ADVANTEC) を用いて一定用量ごとにフラクションとして回収した。フラクション回収はサンプル溶液を汲み上げ終えてから 30 分後に開始し、2 分 30 秒ごとに回収フラクションを切り替えた。流速は 0.2 mL/min とした。PBS にて流路全体を平衡化し、サンプル溶液を汲み上げたのちに PBS を汲み上げ続けフラクションを回収した。UV モニターで測定した吸光度の値を基にフラクションを選び出し、SDS-PAGE およびウエスタンプロットでタンパク質分画の状態を確認した。ウエスタンプロットの一次抗体にはウサギ由来抗 *S. fayeri* rADF IgG 抗体を使用し、二次抗体には HRP 標識ヤギ由来抗

ウサギ IgG IgG 抗体を使用した。

2. ウサギ腸管ループ試験

ウサギ腸管ループテストは前項「ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の比較」、「ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性発現量と冷凍処理による毒性の低減」にて検証したウサギ腸管ループ試験と同様に行った。

白色日本種ウサギ (オス、25 週齢 3.0 kg 体重) を 36 時間の絶食後、ミダゾラム 0.3 mg/kg bw、メデトミジン 0.2 mg/kg bw、ブトルファノール 0.3 mg/kg bw の筋肉内投与にて鎮静、アルファキサロン 6.0 mg/kg bw の筋肉内投与にて麻酔を行い、開腹して空回腸の血管周囲に幅約 3-12 cm で腸管結紮ループを作製した。ゲルろ過クロマトグラフィー後のタンパク質分画を 17-24、25-31、32-38 (15kDa)、39-45 分画の 4 つに大きく分け、これらの分画たんぱく質を 500 μ L、陽性対照として当研究室保有の組換えウェルシュ菌毒素を 40 μ g/500 μ L、陰性対照として PBS を 500 μ L ずつ投与し、閉腹して約 18 時間後にソムノペンチル 100 mg/kg bw の静脈内投与によりウサギを安楽殺し、ループ内の液体貯留を確認した。各ループの長さ (cm) と内容物重量 (g) を測定し、液体貯留値 (Fluid

accumulation Ratio、以下、F/A 値) を以下の計算式で求めた。

$F/A = \text{内容物重量(g)}/\text{ループ長(cm)}$

また、各ループの粘膜面を実体顕微鏡で観察し、その状態を観察した。

C. 研究結果

ゲルろ過クロマトグラフィーにてウマ寄生 *Sarcocystis* 属のブラディゾイト由来の水溶性タンパク質を分画した結果、17 から 45 分画にタンパク質が検出された (図 2 a)。その中で、既知の 15kDa タンパク質は 32-38 分画に現われた。この分画を中心に、15kDa タンパク質分画より大きい分子量のタンパク質が存在する前の領域と、小さい分子量の後の領域に分け、更に前の領域は二つに分けた。その結果、17-24、25-31、32-38 (15kDa)、39-45 の 4 つの領域を腸管ループ試験に供した。各領域のタンパク質濃度は、3.71mg/m、1.176 mg/mL、0.336 mg/mL、0.065 mg/mL であった。(図 2 a、b)。

試験結果においては、25-31、32-38 (15kDa) の領域を供した腸管ループにて液体貯留が認められた。各ループの FA 値は、陰性対照 0.07、陽性対照 0.42 に対し、17-24 領域で 0.08、25-31 領域で 0.30、32-38 (15kDa) で 0.20、39-45 領域で 0.07 であった (図 3 a、b)。また、腸管粘膜については、陽性

対照以外に赤変は認められず、液体貯留を起こしたループにも腸管内側に変化は認められなかった。

D. 考察

ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の虫体たんぱく質から分画された 15kDa タンパク質はウサギ腸管ループ試験において液体貯留を引き起こすという報告のとおり、本研究においてウサギ腸管ループ試験において 15kDa タンパク質を含む分画は腸管ループに液体貯留を示した。しかし、20kDa、25kDa、40kDa、75kDa の分子量のタンパク質を含む 25-31 分画も液体貯留を示した。しかも、FA 値では 15kDa タンパク質分画で示された 0.20 を上回る 0.30 であった。

このことから、ウマ寄生 *S. fayeri* の腸管毒性は 15kDa タンパク質のみによって起こされるものでないことが考えられる。ひとつは、25-31、32-38 (15kDa) 領域のどちらにも含まれる 20kDa、または 25kDa のタンパク質が正しい毒性因子である可能性、または、15kDa、20kDa、25kDa の三種類のタンパク質が相互に働いて腸管毒性を起こす可能性が考えられる。

40kDa、75kDa のタンパク質については、これらを同様に含む 17-24 分画を投与した腸管ループに液体貯留が認めら

れないことから、これらのタンパク質の腸管毒性は否定されると考えられる。

また、前項「ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性発現量と冷凍処理による毒性の低減」にて示された、ブラディゾイトをそのまま投与した腸管ループ試験では、明確な出血および炎症が認められたが、本研究では認められなかった。このことから、ウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫によって起こされる出血性腸管毒性症状は、出血と下痢は別の機序で起こっており、虫体タンパク質を分子量依存的に分けることで、出血を起こす機序が働かなくなることが考えられる。可能性としては、分子量が大きく異なる主因子と補助因子との相互反応が出血および炎症を起こす機序が、分子量依存的なクロマトグラフィー分画によって主因子と補助因子が分別されたために相互作用が阻害された等の理由が考えられる。

本研究の結果から、これまでに *S. fayeri* の腸管毒性因子として報告されていた 15kDa タンパク質以外にも腸管毒性因子が存在する可能性が示された。今後は新たな候補因子である 20kDa、25kDa のタンパク質の同定、単一タンパク質としての腸管毒性の再現を確認する必要がある。

また、出血および炎症の機構についても、更なる詳細な検討が必要である。

E. 結論

これまでに未検証であったウマ由来 *Sarcocystis* 属原虫が保有するタンパク質について、ゲルろ過分画し、既に毒性が確認されている 15kDa 分画以外の分画についても同様に腸管ループテストに供したところ、15kDa 分画より大きな分子量のタンパク質を含む分画でも腸管ループ内に液体貯留が認められた。

ループの長さ (cm) と内容物重量 (g) を測定し、液体貯留値 (Fluid accumulation Ratio、以下、F/A 値) を $F/A = \text{内容物重量 (g)} / \text{ループ長 (cm)}$ にて求めた結果、FA 値は 15kDa 分画 (0.20) よりも大きい 0.30 であったため、15kDa タンパク質と同等またはより強い毒性を持ったタンパク質が存在する可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

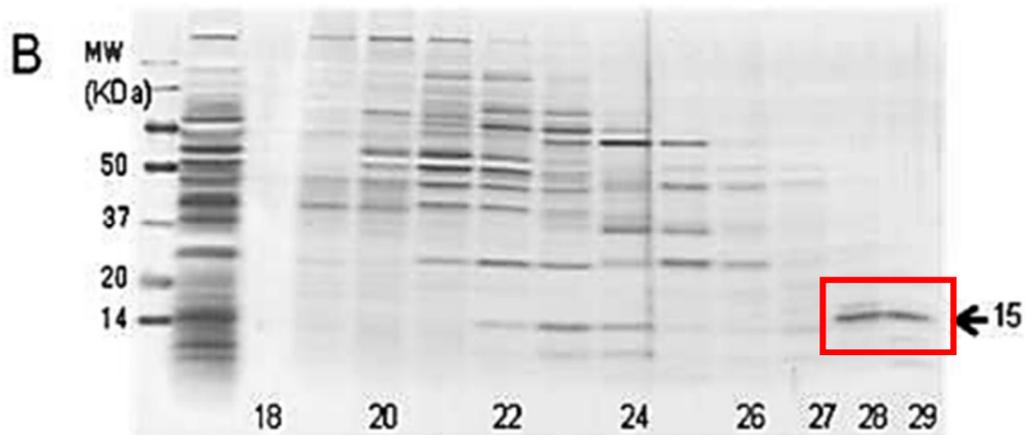
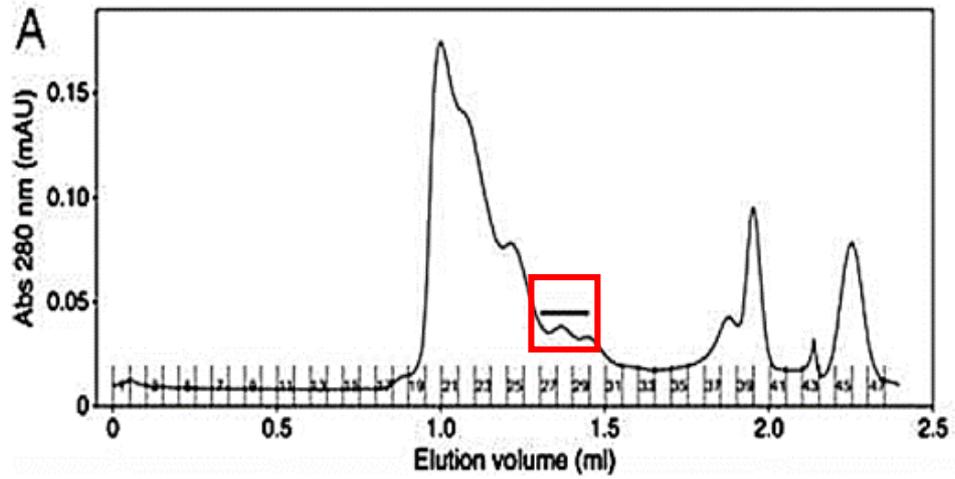
なし

2. 学会発表

住肉胞子虫の腸管毒性に関する研究
Development of novel detection method for pathogenic microbes in game meat

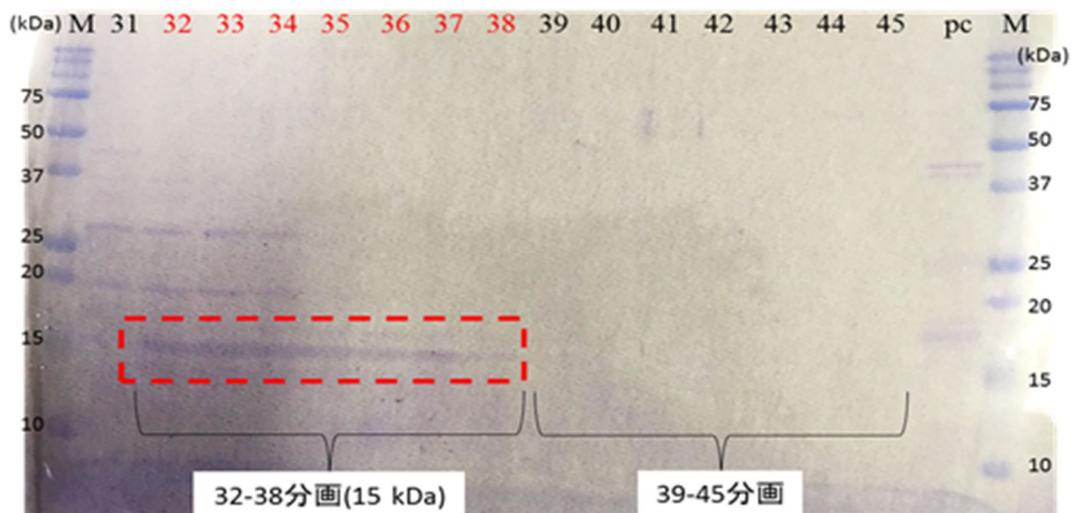
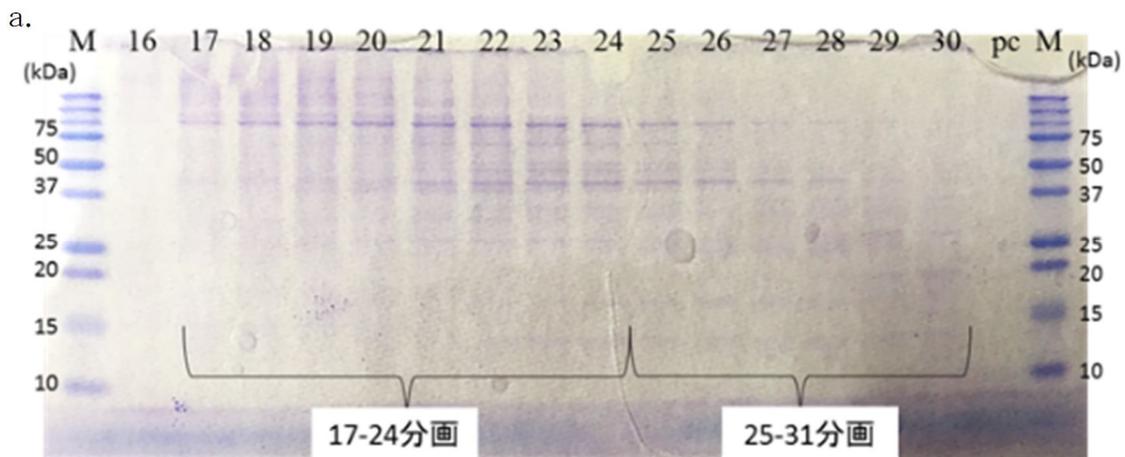
山崎朗子、谷田奈津美、白藤由紀子平
成 30 年度岩手大学農学部 附属動物
医学食品安全教育研究センター成果
発表会 2019 年 2 月 28 日、岩手

住肉胞子虫の腸管毒性研究
山崎朗子 東京農工大学・岩手大学獣
医学合同シンポジウム 2019 年 3 月 8
日 東京



(J. Food Prot., Vol. 77, No. 5, 2014 から引用)

図 1 . ウマ由来 Sarcocystis 属原虫のゲルろ過クロマトグラフィー分画
赤枠に 15kDa タンパク質分画を示す。



b.

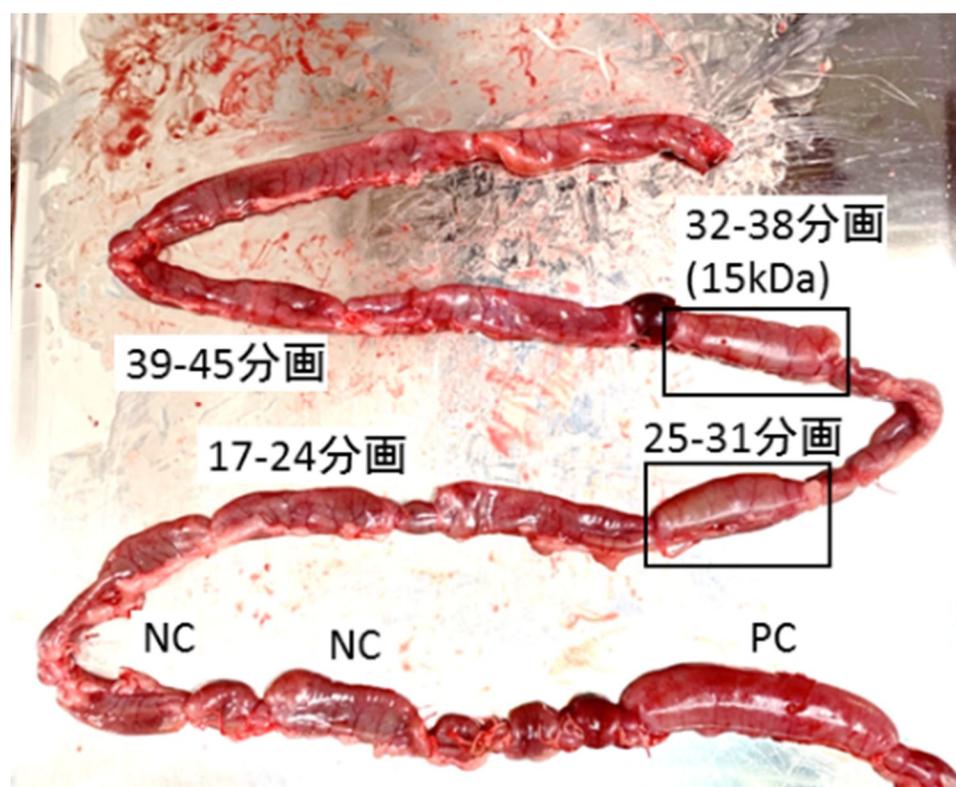
| フラクション番号 | 蛋白質濃度A280 (mg/mL) |
|---------------|-------------------|
| 17-24 | 3.71 |
| 25-31 | 1.176 |
| 32-38 (15kDa) | 0.336 |
| 39-45 | 0.065 |

図2 . ウマ由来 Sarcocystis 属原虫のゲルろ過クロマトグラフィー分画

a. 赤点線枠に 15kDa タンパク質分画を示す。

b. 各分画 (フラクション) と分画内タンパク質濃度

a.



b.

| 検体 | FA値 |
|-------------------------|-----------|
| 17-24分画 | 0.08 |
| 25-31分画 | 0.30 |
| 32-38分画(15kDa) | 0.20 |
| 39-45分画 | 0.07 |
| 陰性対照: PBS | 0.06、0.07 |
| 陽性対照: ウェルシュ菌毒素40ug/loop | 0.42 |

図3 ゲルろ過各分画を用いた腸管ループテスト結果

a. 腸管ループ外観

b. 各検体ごとのFA値

ループ内側観察像

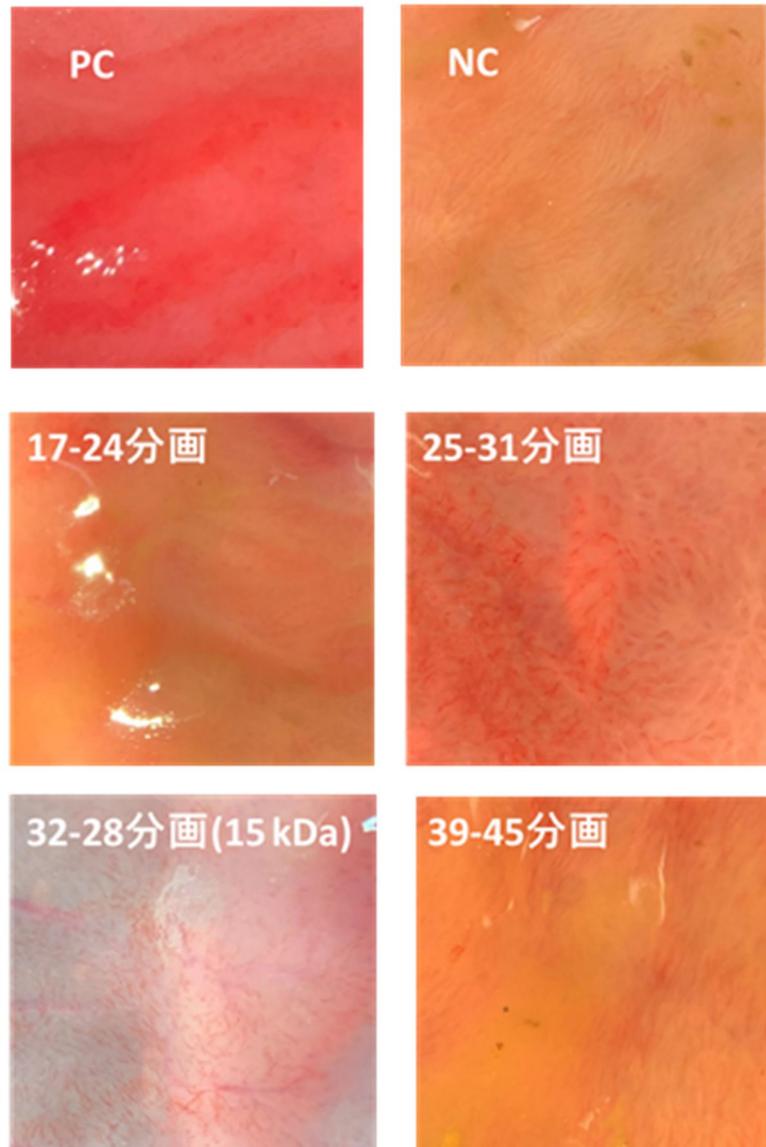


図4 ゲルろ過各分画を用いた腸管ループテスト結果
腸管ループ内側観察像