

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

住肉胞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

(令和) 2 年度 総括研究報告書

研究代表者 山崎 朗子

(令和) 2 年 (2 0 2 0) 年 7 月

目 次

I . 総括研究報告

- 1 . シカ由来*Sarcocystis* sp.の腸管毒性発現最少投与量の検討に関する研究
-----1
- 2 . ウマ由来*S. fayeri*の腸管毒性発現最少投与量の検討、および-20 冷却の
影響
-----8
- 3 . 75 Superdexを用いた*S. fayeri*由来水溶性タンパク質のゲルろ過結果 (SD
S-PAGE分離および腸管毒性発現フラクションのアミノ酸配列解析
-----15
- 4 . ウマ由来*S. fayeri*シストが保有する各種タンパク質への冷却影響に関す
る研究
-----26
- 5 . *Sarcocystis*属の細胞毒性実験(ブラディゾイト、由来タンパク質、組換え
ADF)
-----31

山崎 朗子

II . 分担研究報告

- 1 . エゾシカに寄生する各種住肉胞子虫の生活環解明のための研究
-----65

入江 隆夫

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 別添 5

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）

（総括）研究報告書

住肉胞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

（H30-食品-若手-003）

シカ由来 *Sarcocystis* sp. の腸管毒性発現最少投与量の検討に関する研究

研究代表者 山崎 朗子 岩手大学農学部助教

研究要旨

近年、害獣を食肉利用する地域振興事業が盛んである。これまでの疫学調査で、E型肝炎ウイルス、志賀毒素産生大腸菌、サルモネラ、肝蛭、住肉胞子虫等の保有が認められたが、中でも住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属は可食部位に寄生し、シカでの陽性率が100%であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。本研究では、シカ肉に寄生する *Sarcocystis* spp. の腸管毒性と発現最小投与量の確認を目的として、ウサギ腸管ループ試験を行った。その結果、シカ由来 *Sarcocystis* spp. は昨年度のウサギ腸管ループ試験では 10^5 プラディゾイト/ループ投与での液体貯留を起こしたが、今年度の実験では、 10^3 から 10^6 全ての投与量で液体貯留を起こさなかった。これは、用いた *Sarcocystis* 感染シカ肉サンプルが昨年度とは異なる地域のものであったことから、*Sarcocystis* 種の違いによるものと考えられる。

研究分担者

入江隆夫・宮崎大学研宮崎大学
農学部准教授

A. 研究目的

近年、害獣を食肉利用する地域振興事業が盛んである。これまでの疫学調査

で、E型肝炎ウイルス、志賀毒素産生大腸菌、サルモネラ、肝蛭、住肉胞子虫等の保有が認められたが、細菌および寄生虫については内臓の廃棄により食中毒リスクを回避でき、E型肝炎は遺伝子検出率（イノシシ 2.4%、シ

カ 0.1%) を考慮すると深刻な食中毒危害や経済損害には直結しない。しかし住肉孢子虫は可食部位に寄生し、シカでの陽性率が 100% であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。はっきりと食中毒事例が認められたウマの *S. fayeri* と異なり、ジビエの住肉孢子虫は詳細が不明なため届出指定対象外であるが、馬肉に似た赤身のシカ肉は半生や生食が好まれ、食中毒リスクの高い状態で流通・提供されている。そのためこれらの毒性の解析は、食中毒発生予防のためにも、本虫による食中毒様症状発生時に正確に対応するためにも早急な解決が求められる。本研究では、シカ肉に寄生する *Sarcocystis* spp. の腸管毒性と発現最小投与量の確認を目的として、ウサギ腸管ループ試験を行った。

B. 研究方法

本研究の供試検体として、千葉に生息する野生ニホンジカの骨格筋組織か

ら *Sarcocystis* 属シストを分離して用いた。

表面を PBS で湿らせた骨格筋を実体顕微鏡下で観察し (図 1) , 精密ピンセットを用いて約 50 個の *Sarcocystis* 属シストを 200 μ L の PBS 中に回収した。回収したシストを 4 で 12 時間保存した。その後 , 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 μ L 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の算出とブラディゾイト色素試験を行った。

ブラディゾイト数の算出後 , 10^6 bradyzoites/500 μ L , 10^5 bradyzoites/500 μ L , 10^4 bradyzoites/500 μ L , 10^3 bradyzoites/500 μ L に調整し , ウサギ腸管ループ試験に用いた。

供試したウサギ (日本白色種 , 熊谷重安商店) は , 13 , 14 , 17 , 21 週齢 , 体重 2.2 kg , 2.7 kg , 2.9 kg , 3.0 kg で

あった。48 時間の絶食後，ミダゾラム (サンド) 0.3 mg/kg bw，メデトミジン (フジタ製薬) 0.2 mg/kg bw，ブトルファノール (Meiji Seika ファルマ) 0.3 mg/kg bw を用いて鎮静後，アルファキサロン (Jurox Pty Limited) 6.0 mg/kg bw を用いて麻酔した。開腹して空回腸の血管周囲に幅約 4 cm の腸管結紮ループを作製し，各ループに調整した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エルシュ菌毒素を 20 μ g/loop 用量で 500 μ L，陰性対照として PBS を 500 μ L ずつ投与した。閉腹後，約 18 時間後にウサギをソムノペンチル (共立製薬) 100 mg/kg bw の静脈内投与により安楽殺し，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，FA 値) を以下の式で算出した。

$$\text{FA 値} = (\text{内容物重量}) / (\text{各ループの長さ})$$

また，各ループの腸管内腔粘膜面を実体顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮：本実験に用いたウ

サギは，鎮静、鎮痛を行ったのちに麻酔をかけ、実験後には安楽殺を行っている。本研究における実験方法は本学実験動物委員会にて倫理審査を受け、承認されている。)

C . 研究結果

トリパンブルー染色液による *Sarcocystis* 属のブラディゾイト色素試験結果の一例を図 2 に示す。ここでは，ブラディゾイトの辺縁が明瞭であり内部が色素により染まっていないものを非染色 (図 2a)，ブラディゾイトの辺縁が不明瞭で内部が青紫色に染まっているものを染色 (図 2b) と判定した。

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色素試験の結果は，非染色率 100%であった。

ウサギ腸管ループ試験に使用したブラディゾイト量は， 2.7×10^6 bradyzoites/loop， 2.7×10^5 bradyzoites/loop， 2.7×10^4 bradyzoites/loop， 2.7×10^3 bradyzoites/loop であった。

腸管ループ試験の結果，FA 値は， 10^6

bradyzoites/loop で 0.051 , 10^5
bradyzoites/loop で 0.053 , 10^4
bradyzoites/loop で 0.033 , 10^3
bradyzoites/loop で 0.077 , 陰性対照
で 0.035 , 陽性対照で 0.20 であった
(表 1 , 図 3a) 。いずれのサンプルにお
いても腸管内腔粘膜に充出血は見ら
れなかった (図 3b) 。

D . 考察

千葉に生息する野生ニホンジカに寄
生する *Sarcocystis* 属シストを用いて
サギ腸管ループ試験を行った結果 ,
 10^6 bradyzoites/loop , 10^5
bradyzoites/loop , 10^4
bradyzoites/loop , 10^3
bradyzoites/loop (全 て 非 染 色 率
100%) いずれのブラディゾイト数に
おいても液体貯留は示さなかった。

昨年度に報告したとおり、4 で 24 時
間保存したウマ寄生 *S. fayeri* シスト
では最小量で 10^3 bradyzoites/loop で
液体貯留を示した。また、本学で行っ
た研究 (未報告) によると、ウサギ腸
管ループ試験において北海道に生息
するエゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属シス

ト 10^5 bradyzoites/loop で液体貯留を
示した [Yamaguchi, 2018] 。これら
の結果を踏まえると、ニホンジカに寄
生する *Sarcocystis* 属はウマ寄生 *S.*
fayeri よりも腸管毒性が低い可能性が
考えられる。さらに、ウマ寄生 *S.*
fayeri シストで液体貯留を示したサン
プルにおいては粘膜面に充出血が認
められたことを昨年度に報告したが、
前述の先行研究での北海道のエゾシ
カ寄生 *Sarcocystis* 属シストで液体貯
留を示したサンプルでは腸管内腔粘
膜面に充出血は認められなかったこ
とから、エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属
は *S. fayeri* と異なる毒性を持つこと
が推察される。

また、同先行研究において、ウサギ腸
管ループ試験で 10^5 bradyzoites/loop
で液体貯留を示したのは北海道に生
息するエゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属シ
ストであり、本研究で使用した千葉に
生息する野生ニホンジカ寄生
Sarcocystis 属シストでは 10^6
bradyzoites/loop でも液体貯留を示さ
なかったことから、北海道の野生エゾ
シカ寄生 *Sarcocystis* 属と千葉の野生

ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属とで毒性に相違がある可能性が考えられる。

その原因として、北海道の野生エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属と千葉の野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属の優勢種の違いが考えられる。Irie らの報告では、北海道の野生エゾシカ 65 頭に寄生する *Sarcocystis* 属シストの種同定を行った結果、95.4%のシカから *S. tarandi*-like 92.3%からは *S. pilosa* , 29.2%からは *S. truncate*-like のシストが同定された [Irie et al., 2019] 。また、千葉と同じ本州である岐阜の野生ニホンジカ 53 頭に対する調査では、94.3%のシカからは *S. japonica* , 54.7%からは *S. pilosa* , 41.5%からは *S. cf. trandi* が発見された。このうち、*S. japonica* は前述の *S. truncata*-like と同一の新種である [Abe et al., 2019] 。さらに、本研究室の研究（未報告）では、北海道の野生エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属シストの種同定を行った結果 (n = 27) , *S. sp.* HM050622 が 48% , *S. tarandi* が 22% , *S. pilosa* が 26% , その他が 4%であった。その一方で、千葉の野生ニホンジカ寄生

Sarcocystis 属シストの種同定を行った結果 (n = 17) , *S. sp.* HM050622 が 47% , *S. tarandi* が 6% , *S. pilosa* が 47%であった [Hiroshima, 2018] 。このように、北海道と本州、ひいては千葉ではそれぞれのシカに寄生する *Sarcocystis* 属の優勢種が異なることが示唆され、これが毒性の表現型の相違にも影響していると推察される。

今後は、この結果を踏まえると共に、北海道をはじめとした他地域の野生エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属の遺伝子解析と腸管毒性解析を対応させた上で *Sarcocystis* 属の種による毒性の違いを明らかにしていくことが必要である。

しかし、日本国内のニホンジカには一頭に複数種が混合感染していることが大半であり、それぞれの種別の毒性の相違を検討するのは極めて困難である。ゆえに、今後シカ寄生 *Sarcocystis* 属の毒性を解析する上では、シカの生息地域や亜種などの条件を検討し、その条件下における *Sarcocystis* 属の優勢種の割合と比較し毒性の相違を明らかにできると考

える。

E . 結論

シカ由来 *Sarcocystis* spp.は昨年度のウサギ腸管ループ試験では 10^5 ブラディゾイト/ループ投与での液体貯留を起こしたが、今年度の実験では、 10^3 から 10^6 全ての投与量で液体貯留を起こさなかった。これは、用いた *Sarcocystis* 感染シカ肉サンプルが昨年度とは異なる地域のものであったことから、シカ寄生 *Sarcocystis* 種の中でも相違がある可能性が示唆される。しかしながら、ウマ寄生種の *S. fayeri*を用いた腸管ループテストの結果と比較すると、シカ寄生 *Sarcocystis* 属は *S. fayeri* より腸管毒性が低いことが示唆された。

【参考文献】

山口佳恭. (2018). 日本の野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* spp.における垂直感染の可能性および腸管病原性に関する研究. 岩手大学獣医公衆衛生学研究室卒業論文.

Irie T, Ichii O, Nakamura T, Ikeda T, Ito T, Yamazaki A, Takai S and Yagi K.(2019). Molecular characterization of three *Sarcocystis* spp. from wild sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) in Hokkaido, Japan. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep. **18** 100327.

Abe N, Matsuo K, Moribe J, Takashima Y, Irie T, Baba T and Gjerde B. (2019). Morphological and molecular characteristics of seven *Sarcocystis* species from sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan, including three new species. Int J Parasitol Parasites Wildl. **10**: 252-262.

廣嶋竜弥. (2018). 国内野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* spp.に関する遺伝的疫学研究. 岩手大学獣医公衆衛生学研究室卒業論文.

F . 健康危険情報

G . 研究発表

1. 論文発表

Akiko Yamazaki, Tatsuya Hiroshima, Yoshitaka Yamaguchi, Yukiko Shirafuji, Kensuke Taira, Morihito Saito, Naoki Kobayashi, Yoshiko Sugita-Konishi, and Yoichi Kamata, Presence of *Sarcocystis sybillensis* in Japanese sika deer (*Cervus nippon*) captured in its native territory and its phylogenetic relationship with *Sarcocystis nipponi*. Parasitology Research (2020) vol. 119 pages 2309–2315

2. 学会発表

1. 第 162 回日本獣医学会学術集会、令和元年度 9 月 10-12 日、筑波国際会議場、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析 公衆衛生学分科会奨励賞

2. 第 65 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、令和元年度 10 月 26 日、岩手大学、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性

解析

3. 2019 年度東北地区獣医師大会・2019 年度獣医学術東北地区学会、令和元年度 10 月 10 日、郡山ビューホテルアネックス、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管毒性解析 最優秀賞受賞対象・辞退

4. 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 (FAMS) 成果発表会、2019 年 2 月 28 日、岩手大学農学部総合教育研究棟 (5 号館) 7 番教室, スペース C、合計参加者数、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 (FAMS) 主催、平成 30 年度の事業内容報告

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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）

（総括・分担）研究報告書

住肉胞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

（H30-食品-若手-003）

ウマ由来 *S. fayeri* の腸管毒性発現最少投与量の検討、および -20 冷却の影響

研究代表者 山崎 朗子 岩手大学農学部助教

研究要旨

住肉胞子虫はジビエの可食部位である骨格筋に寄生し、シカでの陽性率が100%であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現の機序をはじめ、発症摂取量を含む詳細が不明なため、既に食中毒が発生しているにも関わらず届出指定対象外であり、毒性の解析には早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* は、既にはっきりと食中毒事例が認められており、試料の入手がジビエであるシカよりも安定している。そのため、本研究では *Sarcocystis* 属原虫によって起こされる食中毒研究の一環として、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて腸管毒性の発現機序、発現最小量を明らかにすべく、腸管ループレテストを行った。その結果、ウマ由来 *Sarcocystis fayeri* は、昨年度に確認された 10^3 ブラディゾイトでの投与でのループレ液体貯留を再現せず、 10^2 、 10^1 投与での液体貯留も認めなかったことから、*S. fayeri* のウサギに対する腸管毒性発現の最小ブラディゾイト数は 10^3 と考えられる。また、*S. fayeri* ブラディゾイトは -80 冷却だけでなく、-20 冷却でも腸管毒性を失った。トリパンブルー色素試験では 100%非染色であったため、*S. fayeri* の腸管毒性はブラディゾイトの生死とは直結しない機序によ

研究分担者

入江隆夫・宮崎大学
農学部准教授

A．研究目的
近年、害獣を食肉利用する地域振興事業が盛んである。これまでに、E型肝炎ウイルス、志賀毒素産生大腸菌、サルモネラ、肝蛭、住肉胞子虫等の保有が認められたが、中でも住肉胞子虫は

可食部位に寄生し、シカでの陽性率が100%であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現の機序をはじめ、発症摂取量を含む詳細が不明なため、既に食中毒が発生しているにも関わらず届出指定対象外である。そのためこれらの毒性の解析は早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* は、既にはっきりと食中毒事例が認められており、試料の入手がジビエであるシカよりも安定している。そのため、本研究では *Sarcocystis* 属原虫によって起こされる食中毒研究の一環として、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて腸管毒性の発現機序、発現最小量を明らかにすべく、腸管ルーブテストを行った。

B . 研究方法

本研究の供試検体として、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。

表面を PBS で湿らせた骨格筋を実体顕微鏡下で観察し (図 1) , 精密ピ

ンセットを用いて約 50 個の *Sarcocystis* 属シストを 200 μ L の PBS 中に回収した。回収したシストを 4 および-20 で 12 時間保存した。その後 ,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 μ L のブラディゾイト懸濁液を同量の 0.4 w/v% トリパンブルー溶液 (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の算出とブラディゾイト色素試験を行った。

ブラディゾイト数の算出後 ,ブラディゾイト懸濁液をそれぞれ 10^5 bradyzoites/500 μ L , 10^3 bradyzoites/500 μ L に調整し ,ウサギ腸管ルーブ試験に用いた。また ,4 保存検体については最小発症量の検討を行うため , 10^2 bradyzoites/500 μ L , 10 bradyzoites/500 μ L 溶液も合わせて調整し試験を行った。ブラディゾイト懸濁液を試料とし ,ウサギ腸管ルーブ試験を行った。供試したウサギ (日本白色種 ,熊谷重安商店) は ,13 ,14 ,17 ,21 週齢 ,体重 2.2 kg , 2.7 kg , 2.9 kg , 3.0 kg であった。

48時間の絶食後、ミダゾラム（サンド）0.3 mg/kg bw、メドミジン（フジタ製薬）0.2 mg/kg bw、ブトルファノール（Meiji Seika ファルマ）0.3 mg/kg bw を用いて鎮静後、アルファキサロン（Jurox Pty Limited）6.0 mg/kg bw を用いて麻酔した。開腹して空回腸の血管周囲に幅約 4 cm の腸管結紮ループを作製し、各ループに調整した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エルシュ菌毒素を 20 μ g/loop 用量で 500 μ L、陰性対照として PBS を 500 μ L ずつ投与した。閉腹後、約 18 時間後にウサギをソムノペンチル（共立製薬）100 mg/kg bw の静脈内投与により安楽殺し、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、FA 値）を以下の式で算出した。

FA 値 = (内容物重量) / (各ループの長さ)

また、各ループの腸管内腔粘膜面を実体顕微鏡で観察した。

（倫理面への配慮：本実験に用いたウ

サギは、鎮静、鎮痛を行ったのちに麻酔をかけ、実験後には安楽殺を行っている。本研究における実験方法は本学実験動物委員会にて倫理審査を受け、承認されている。）

C. 研究結果

トリパンプルー染色液による *Sarcocystis* 属のブラディゾイト色素試験結果の一例を図 3 に示す。ここでは、ブラディゾイトの辺縁が明瞭であり内部が色素により染まっていないものを非染色（図 2a）、ブラディゾイトの辺縁が不明瞭で内部が青紫色に染まっているものを染色（図 2b）と判定した。

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色素試験の結果は、4 保存、-20 保存の両方で非染色率 100%であった（表 2）。ウサギ腸管ループ試験に使用したブラディゾイト量は、4 保存で 1.0×10^3 bradyzoites/loop、 1.0×10^2 bradyzoites/loop、10 bradyzoites/loop、-20 保存で 2.0×10^5 bradyzoites/loop、 2.0×10^3

bradyzoites/loop であった。

4 保存シストを用いた腸管ループ試験
10³ bradyzoites/loop で 0.077 , 10²
bradyzoites/loop で 0.076 , 10
bradyzoites/loop で 0.055 , -20 保存
シスト投与個体では 10⁵
bradyzoites/loop で 0.052 , 10³
bradyzoites/loop で 0.074 , 陰性対照
で 0.067 , 陽性対照で 1.2 であった (表
2 , 図 4a) 。 いずれのサンプルにおい
ても腸管内腔粘膜に充出血は見られ
なかった (図 4b) 。

D . 考察

4 および -20 で 12 時間保存した *S.*
fayeri シストから得たブラディゾイト
懸濁液を用いた色素試験において、い
ずれも非染色率 100% を示した。その
一方で、ウサギ腸管ループ試験におい
ては昨年度報告のとおり 4 保存シス
トでは 10³ bradyzoites/loop および
10⁵ bradyzoites/loop で液体貯留を示
しかつ腸管内腔粘膜面に充出血が見
られた (昨年度研究報告) が、本研究
では -20 保存シストでは 10³
bradyzoites/loop および 10⁵

bradyzoites/loop いずれにおいても液
体貯留は示さなかった。

ブラディゾイトは感染性があると染
色液に抵抗性があり、感染性を失うと
染色液に抵抗がなくなると報告され
ている [Saito, 2012] 。 実際に、原田
らの報告では、*S. fayeri* ブラディゾイ
トの形態喪失をブラディゾイトの失
活、すなわち腸管毒性の失活とみなし、
その温度条件を検討している
[Harada et al., 2013] 。 同様に、
Honda らはシカ肉寄生 *Sarcocystis* 属
ブラディゾイトの失活条件の検討を
ブラディゾイト色素試験を用いて行
っている [Honda et al., 2018] 。

しかし、本研究では、昨年度報告のと
り、-20 および -80 保存シストでブ
ラディゾイト非染色率が 67% から
100% に保たれているにも関わらず、
いずれの温度においてもウサギ腸管
ループ試験で液体貯留を示さなかっ
た。その一方で、4 保存シストではブ
ラディゾイト非染色率 80% から 100%
であったが 10³ bradyzoites/loop およ
び 10⁵ bradyzoites/loop で液体貯留を
示した。以上の結果より、*S. fayeri* の

腸管毒性はブラディゾイトの非染色率に関わらず、冷凍処理によって毒性を失う因子に起因することが示唆された。

また、図4に示す4 保存シストを用いた腸管ループ試験では、昨年度行った実験では 4.1×10^5 bradyzoites/loop (非染色率80%)、 4.1×10^3 bradyzoites/loop (非染色率80%) で液体貯留を示したのに対し、本年度の試験においては 1.0×10^3 bradyzoites/loop (非染色率100%)、 1.0×10^2 bradyzoites/loop (非染色率100%)、10 bradyzoites/loop (非染色率100%) で液体貯留を示さなかった。これらの結果から、腸管ループ試験における *S. fayeri* の最小発症量は 10^3 bradyzoites/loop であることが示唆された。しかしながら、この結果はあくまでウサギ腸管ループ試験で液体貯留が起こる最小発症量を示している。ヒトが馬肉を食した際、*S. fayeri* ブラディゾイトが小腸にたどり着くまでに胃酸や酵素の影響を受けるので、これを考慮して経口投与による最小発症量の検討、あるいはシスト

を胃酸の pH 1 - 1.5 下に置きペプシンなどの酵素を反応させるなど消化と同等の条件下での検討も行う必要があると考える。

また、前述のシカ寄生性 *Sarcocystis* 属を用いた同様の腸管ループ試験の結果と大きく異なることから、シカ寄生性 *Sarcocystis* 属が起こす食中毒と *S. fayeri* が起こす食中毒は区別して考える必要があると推察する。

E . 結論

ウマ由来 *Sarcocystis fayeri* は、昨年度に確認された 10^3 ブラディゾイトでの投与でのループ内液体貯留を再現せず、 10^2 、 10^1 投与での液体貯留も認めなかったことから、*S. fayeri* のウサギに対する腸管毒性発現の最小ブラディゾイト数は 10^3 と考えられる。

S. fayeri ブラディゾイトは-80 冷却だけでなく、-20 冷却でも腸管毒性を失った。トリパンプルー色素試験では4 冷却保存ブラディゾイトと同様に100%非染色であったため、*S. fayeri* の腸管毒性はブラディゾイトの生死とは直結しない機序によると考

えられる。

【参考文献】

Saito M. (2012). Food Poisoning Caused by *Sarcocystis fayeri* Associated with Ingestion of Raw Horse Meat. *Jui ekigaku zasshi*. **16**(2): 114-125. (in Japanese.)

Harada S, Furukawa M, Tokuoka E, Matsumoto K, Yahiro T, Miyasaka J, Saito M, Kamata Y, Watanabe M, Irikura D, Matsumoto H and Sugita-Konishi Y. (2013). Control of Toxicity of *Sarcocystis fayeri* in Horsemeat by Freezing Treatment and Prevention of Food Poisoning Caused by Raw Consumption of Horsemeat. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. **54**(3): 198-203. (in Japanese.)

Honda M, Sawaya M, Taira K, Akiko Y, Kamata Y, Shimizu H, Kobayashi N, Sakata R, Asakura H and 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.* **80**(8): 1337-1344.

F . 健康危険情報

研究報告書にまとめて記入)

G . 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1 (第162回日本獣医学会学術集会、令和元年度9月10-12日、筑波国際会議場、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析 公衆衛生学分科会奨励賞)

2 (第65回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、令和元年度10月26日、岩手大学、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析)

3 (2019年度東北地区獣医師大会・2019年度獣医学術東北地区学会、令和元年度10月10日、郡山ビューホ

テルアネックス、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管毒性解析) 最優秀賞受賞対象・辞退

(FAMS) 主催、平成30年度の事業内容報告

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

4.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(FAMS)成果発表会、2019年2月28日、岩手大学農学部総合教育研究棟(5号館)7番教室,スペースC、合計参加者数、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

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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）

（総括・分担）研究報告書

住肉胞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

（H30-食品-若手-003）

75 Superdex を用いた *S. fayeri* 由来水溶性タンパク質のゲルろ過結果（SDS-PAGE 分離および腸管毒性発現フラクションのアミノ酸配列解析

研究代表者 山崎 朗子 岩手大学農学部助教

研究要旨

住肉胞子虫はジビエの可食部位である骨格筋に寄生し、シカでの陽性率が100%であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現の機序をはじめ、発症摂取量を含む詳細が不明なため、毒性の解析には早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて食中毒を起こす原因物質の特定を試みた。これまでに 15kDa の分子量を持つアクチン脱重合因子 (ADF) が *S. fayeri* の腸管毒性因子として報告されていたが、昨年度の研究にて、ADF 以外のたんぱく質からも腸管毒性を起こす可能性を確認したため、本研究にて、新たな腸管毒性候補たんぱく質の同定を試みた。その結果、昨年度の研究で 15kDa タンパク質 (ADF) よりも強い腸管毒性を示した新規タンパク質は putative Histamine releasing Factor (pHRF) と相同性が高く、*Sarcocystis* に引き起こされる腸管毒性にヒスタミンの関与が示唆され

研究分担者

入江隆夫・宮崎大学研宮崎大学
農学部准教授

A . 研究目的

近年、害獣を食肉利用する地域振興事業が盛んである。これまでの疫学調査で、E 型肝炎ウイルス、志賀毒素産生大腸菌、サルモネラ、肝蛭、住肉胞子

虫等の保有が認められたが、中でも住肉胞子虫は可食部位に寄生し、我が国での野生ニホンジカでの陽性率がほぼ 100%であることと、シカ肉の生食で食中毒がすでに発生していること

から、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現については詳細が不明なため、既に食中毒が発生しているにも関わらず届出指定対象外である。ゆえに、これらの毒性の解析は早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* は、既に食中毒危害性を認められており、試料の入手が安定しているため、本研究では *Sarcocystis* 属原虫によって起こされる食中毒研究の一環として、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて食中毒を起こす原因物質の特定を試みた。これまでに 15kDa の分子量を持つアクチン脱重合因子 (ADF) が *S. fayeri* の腸管毒性因子として報告されていたが、昨年度の研究にて、ADF 以外のたんぱく質からも腸管毒性を起こす可能性を確認した(昨年度報告書)。今年度の研究にて、新たな腸管毒性候補たんぱく質の同定を試みた。

B．研究方法

本研究の供試検体として、カナダ産ウマの骨格筋組織からゲル濾過クロマ

トグラフィー法に用いる *S. fayeri* シストを 1000 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。この一連の凍結融解操作を計 5 回繰り返した。解凍後、BioMasher (ニッピ) を用いてホモジナイズし、14,000 × g、4℃、5 分間の条件で遠心分離し上清を回収した。回収した上清中に白い浮遊物が見られる場合、Minisart SRP 15 (sartorius stedim biotech) で濾過した。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と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，Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) でタンパク質を確認した。また，SDS-PAGE にて 15 kDa 付近にバンドが確認されたフラクションについては，Western Blotting で ADF を確認した。ADF の陽性対照には当研究室保有の組み換え *S. fayeri* ADF (分子量 17.2 kDa) を使用した。フラクション溶液 10 μ L に Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2 \times) を等量加え，さらに 1 M DTT (和光純薬) 1 μ L を添加した後，100 $^{\circ}$ C，3 分間加熱した。この処理液をサンプルとして 10 μ L を 15%ポリアクリルアミドゲルのレーンに注入し，3 μ L を別の 15%ポリアクリルアミドゲルのレーンに注入した。その後，ゲル 1 枚当

たり 20 mA で，80 分間通電した。電気泳動槽にはラピダス・ミニスラブゲル電気泳動槽 (ATTO) を使用し，電源装置は my Power 300 (ATTO) を使用した。15%ポリアクリルアミドゲルおよび泳動バッファの組成は以下のとおりである。

10 \times SDS-PAGE Buffer

Tris (USB) 30.25 g

Glycine (和光純薬) 144.1 g

Sodium dodecyl sulfate (SDS : 和光純薬) 10 g

MilliQ 水 800 mL

MilliQ 水で全量を 1 L に調製し，使用時に MilliQ 水で 10 倍希釈した。

15% ポリアクリルアミドゲル

分離ゲル (15 mL)

MilliQ 水 3.5 mL

30 % Acrylamide-0.8 %

Bisacrylamide 7.5 mL

1.5 M Tris (pH 8.8) 3.75 mL

10% SDS 150 μ L

N,N,N,N-

Tetramethylethylenediamide

(TEMED : 和光純薬) 22.5 μ L
20 % Ammonium persulfate
60 μ L

濃縮ゲル (7 mL)

MilliQ 水 3.98 mL
30 % Acrylamide-0.8 %
Bisacrylamide 1.16 mL
0.5 M Tris (pH 6.8)
1.75 mL
10% SDS 70 μ L
TEMED (和光純薬) 7 μ L
20 % Ammonium persulfate
35 μ L

30 % Acrylamide-0.8 %
Bisacrylamide (300 mL)
Acrylamide (和光純薬) 90 g
Bisacrylamide (和光純薬) 2.4 g
MilliQ 水 200 mL
MilliQ 水で 300 mL に調製した。

1.5 M Tris (pH 8.8) (1 L)
Tris (USB) 181.7 g
MilliQ 水 800 mL
MilliQ 水に Tris を溶解させたのち ,

塩酸 (和光純薬) で pH 8.8 に調製し
た。その後 MilliQ 水で 1 L に調製し ,
121 , 15 分間の条件で高圧蒸気滅菌
を行った。

0.5 M Tris (pH 6.8) (1 L)

Tris (USB) 60.6 g

MilliQ 水 800 mL

MilliQ 水に Tris を溶解させたのち ,
塩酸 (和光純薬) で pH 6.8 に調製し
た。その後 MilliQ 水で 1 L に調製し ,
121 , 15 分間の条件で高圧蒸気滅菌
を行った。

20% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate (和光純薬)

0.1 g

MilliQ 水 500 μ L

上記試薬を 1.5 mL チューブ内で混合 ,
ボルテックスミキサーを用いて完全
に溶解した。使用直前に調製した。

電気泳動後のゲルは 10 μ L のサンプ
ルを注入したものを Coomassie
Brilliant Blue (CBB) 染色用とし , 3
 μ L のサンプルを加えたものを
Western Blotting 用とした。分子量マ
ーカーとして , 3 μ L の All Blue

Precision Plus Protein Standards (BioRad) を泳動ゲルの両端のレーンに加えた。CBB 染色用ゲルは泳動終了後 RO 水に浸漬し 10 分間振盪した。この操作を 2 回繰り返して、ゲルを洗浄した。洗浄したゲルは CBB Stain One Super (ナカライテスク) で 30 分間染色した。染色したゲルは一晩 RO 水に浸漬して脱色を行った。

Western Blotting 用のゲルは Blotting Buffer B に浸漬した。クリアプロット・P 膜 (Polyvinylidene Difluoride membrane: PVDF メンブレン: ATTO) を 20 秒間メタノール (和光純薬) に浸漬し、その後 Blotting Buffer B に浸漬した。CB-06A アブソorbentペーパー (濾紙: ATTO) を 3 枚重ね、Blotting Buffer A、および C に浸漬した。Blotting Buffer A に浸漬した濾紙、PVDF メンブレン、ゲル、Blotting Buffer C に浸漬した濾紙の順に AE-6688 ブロットティング装置 (ATTO) の陽極 (下部電極) に積み重ね、陰極 (上部電極) をセットし、ゲル 1 枚当たり 100 mA、60 分間通電した。通電後、PVDF メンブレンを 10%

Skim milk に浸漬し、一晩 4℃ で保存しブロッキングを行った。各 Blotting Buffer の組成、ブロッキング液である 10% Skim milk の組成は以下のとおりである。

Blotting Buffer A (100 mL)

Tris 3.63 g

メタノール 5 mL

MilliQ 水 95 mL

Blotting Buffer B (100 mL)

Tris 0.3 g

メタノール 5 mL

MilliQ 水 95 mL

Blotting Buffer C (100 mL)

Tris 0.3 g

6-アミノヘキサン酸 0.525 g

メタノール 5 mL

MilliQ 水 95 mL

10% Skim milk (100 mL)

Skim milk (BD) 10 g

PBS 100 mL

ブロッキング処理をした PVDF メンブレンと抗体を反応させ、ADF を検出した。一次抗体は 3% Skim milk で 1000 倍に希釈したウサギ由来抗 *S. fayeri* rADF IgG 抗体を使用した。PVDF メンブレンを抗体希釈液に浸漬し、室温で 1 時間振盪し反応させた。反応終了後、十分量の PBS-0.1% Tween-20 に PVDF メンブレンを浸漬し、5 分間振盪し洗浄した。これを 3 回繰り返した。二次抗体は、3% Skim milk で 5000 倍に希釈した HRP 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。PVDF メンブレンを抗体希釈液に浸漬し、室温で 1 時間振盪し反応させた。反応後は一次抗体反応後と同様に洗浄した。検出には 3,3 -Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB: SIGMA) を基質とした DAB 発色液を用いた。発色液に PVDF メンブレンを浸漬、バックグラウンドに注意しながら 5 分間振盪し、ADF を検出した。抗体希釈液の 3% Skim milk、洗浄液の PBS-0.1% Tween-20、発色液の DAB 発色液の組成は以下のとおりである。

3% Skim milk (100 mL)
 Skim milk (BD) 3 g
 PBS 100 mL
 PBS-0.1% Tween-20
 Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (和光純薬) 5 mL
 PBS 4995 mL
 DAB 発色液
 3,3 -Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB : SIGMA) 25 mg
 PBS 50 mL
 30% Hydrogen peroxide solution (H₂O₂ : SIGMA) 5 μL
 DAB を PBS で遮光下にて溶解させ、使用直前に H₂O₂ を加えた。
 前述で得たフラクションのうち、SDS-PAGE でバンドが確認されたフラクション (17-45) を分子量ごとに >37 kDa (17-24)、15-50 kDa (25-30)、15 kDa (31-38)、<15 kDa (39-45) の 4 つの分画に分けた。それぞれ

の分画の濃度は NanoDrop One を用いて測定した。以上のサンプルを用いて、前述と同様の試験方法でウサギ腸管ルーブ試験を行った。

腸管ルーブ試験で液体貯留が見られた分画において、共通して含まれる約 19 ~ 26 kDa の分画について、それぞれ nano-LC/MS/MS によりタンパク質同定を岩手大学農学部応用生物化学科山下哲郎教授に委託した。

(倫理面への配慮：本実験に用いたウサギは、鎮静、鎮痛を行ったのちに麻酔をかけ、実験後には安楽殺を行っている。本研究における実験方法は本学実験動物委員会にて倫理審査を受け、承認されている。)

C . 研究結果

タンパク質分画中に UV モニターにて吸光度を測定した結果、測定開始から約 6 分後からピークが現れた (図 5)。SDS-PAGE (CBB 染色) にてタンパク質分画の状態を確認した結果、フラクション 17 からタンパク質が確認された (図 6)。このうち、フラクション 32 から 38 は抗 *S. fayeri* ADF 抗体に

よる Western Blotting に反応した (図 7)。この結果に基づき、全体のタンパク質分画 (フラクション 17-45) をそれぞれ >37 kDa 分画 (17-24) , 15 ~ 50 kDa 分画 (25-31) , 15 kDa 分画 (32-38) , <15 kDa 分画 (39-45) に分け、腸管ルーブ試験に用いた。また、各分画のタンパク質濃度は 3.71 mg/mL (>37 kDa) , 1.18 mg/mL (15 ~ 50 kDa) , 0.336 mg/mL (15 kDa) , 0.0650 mg/mL (<15 kDa) であった。*S. fayeri* シスト抽出タンパク質分画投与における FA 値は、0.080 (>37 kDa) , 0.30 (15 ~ 50 kDa) , 0.20 (15 kDa) , 0.070 (<15 kDa) であった (表 3、図 8a)。実体顕微鏡で腸管内腔粘膜を観察した結果、腸管内腔粘膜に充出血は見られなかった (図 8b)。腸管ルーブ内に液体貯留が見られた、15 ~ 50 kDa 分画および 15 kDa 分画において、共通して両分画に含まれる約 19 kDa、および約 26 kDa のタンパク質 (図 9) についてそれぞれ nano-LC/MS/MS によりタンパク質同定を行った。このうち約 19 kDa のタンパク質は相同性検索の結果

putative histamine-releasing factor (Score : 31 , Mass : 19274) , 約 26 kDa のタンパク質はウマ由来の Carbonic anhydrase (Score : 515 , Mass : 29778) であった (図 10) 。

D . 考察

ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られた各フラクションについて , SDS-PAGE でタンパク質分画の状態を確認した結果 , フラクション 17 からタンパク質バンドが確認された。このうち , フラクション 32 から 38 には抗 ADF 抗体を用いたウェスタンブロッティングに反応し , ADF が含まれていたことがわかった。この結果に基づき , >37 kDa 分画 , 15 ~ 50 kDa 分画 , 15 kDa 分画 , < 15 kDa 分画の 4 分画に分けた。

各分画を用いたウサギ腸管ループの結果 , 15 ~ 50 kDa 分画および 15 kDa 分画に液体貯留が見られた。このことから , 従来報告されてきた ADF 以外にも 15 ~ 50 kDa 分画に腸管毒性因子が含まれる可能性が示された。

また , 液体貯留を示した 15 ~ 50 kDa

分画および 15 kDa 分画を投与した腸管ループの内腔粘膜には充出血は認められなかった。一方で , 昨年度報告したとおり , ブラディゾイト懸濁液を投与した腸管ループにおいては腸管内腔粘膜において充出血を示した (昨年度報告書) 。このことから , 15 ~ 50 kDa 分画および 15 kDa 分画単独で液体貯留は起こすが充出血は引き起こさないこと , つまり腸管内腔粘膜の出血を誘発するには *S. fayeri* ブラディゾイトに含まれる複数の腸管毒性因子が関与する可能性が考えられる。また , 本研究で液体貯留を示さなかった >37 kDa 分画 , <15 kDa 分画に関しても , 単独では液体貯留を示さなくても他の因子と組み合わせられることで腸管毒性の増強や出血の誘発が起こる可能性があるため , 今後は複数の分画を組み合わせた上での毒性の変化を明らかにする必要がある。

液体貯留が見られた 15 ~ 50 kDa 分画および 15 kDa 分画において , 共通して含まれる約 19 kDa , および約 26 kDa のタンパク質についてそれぞれタンパク質同定を行った。このうち ,

約 19 kDa のタンパク質は putative histamine-releasing factor (ヒスタミン遊離因子) , 約 26 kDa のタンパク質はウマ由来の Carbonic anhydrase と同定された。後者は *S. fayeri* シストを抽出する際に馬肉から混入したものとする。

ヒスタミン遊離因子 (HRF) は、ある種の IgE 抗体 (IgE+) が特定のアレルギー患者由来好塩基球を活性化し、ヒスタミン遊離や IL-4 / IL-13 などのサイトカインの産生を誘導する [Kashiwakura, 2016]。このことから、*S. fayeri* の腸管毒性は HRF に惹起されるヒスタミン遊離やサイトカインに起因する可能性が考えられる。この作用が *S. fayeri* により誘発されていることを確かめるには、腸管ループ陽性の腸管内腔粘膜の組織切片から好塩基球やマスト細胞の増加・遊走を確認する必要がある。

また、今後は HRF の組み換えタンパク質を作製し、それをを用いた詳細な腸管毒性解析を行う必要がある。さらに、ウサギ腸管ループ試験でヒスタミン阻害剤を用いた抑制試験を行うこと

で、HRF によるヒスタミン遊離が *S. fayeri* の腸管毒性に關与しているかについても検討する必要がある。また、前述のように、*S. fayeri* の腸管毒性は複数の腸管毒性因子が関わる可能性が考えられることから、HRF あるいは ADF 単独とこれらを合わせた場合の腸管毒性の違いを明らかにする必要がある。

E . 結論

ADF 以外に約 19 kDa のタンパク質 (putative histamine-releasing factor) も腸管毒性因子の可能性があらわになった。今後は、今回新たに発見された HRF に関する詳細な腸管毒性の解析を進めると同時に、*Sarcocystis* 属の種の違いによる腸管毒性の違いに關しても着目して研究を進め、ウマやシカ肉喫食の際の食中毒防止に努める必要があると考える。昨年度の研究で 15kDa タンパク質 (ADF) よりも強い腸管毒性を示した新規タンパク質は putative Histamine releasing Factor (pHRF) と相同性が高く、*Sarcocystis* に引き起

こされる腸管毒性にヒスタミンの関与、つまりアレルギー症状である可能性が示唆された。

【参考文献】

Kashiwakura J, Ando T and Kawakami T. (2016). Role of Histamine-releasing Factor in Allergic Inflammatory Reactions. *Yakugaku Zasshi*. 137 (5) 517-521. (in Japanese).

F . 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G . 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1 . (第 162 回日本獣医学会学術集会、令和元年度 9 月 10-12 日、筑波国際会議場、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析 公衆衛生学分科会

奨励賞)

2 . (第 65 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、令和元年度 10 月 26 日、岩手大学、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析)

3 . (2019 年度東北地区獣医師大会・2019 年度獣医学術東北地区学会、令和元年度 10 月 10 日、郡山ビューホテルアネックス、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管毒性解析)

4 . 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 (FAMS) 成果発表会、2019 年 2 月 28 日、岩手大学農学部総合教育研究棟 (5 号館) 7 番教室、スペース C、合計参加者数、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 (FAMS) 主催、平成 30 年度の事業内容報告

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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）

（総括・分担）研究報告書

住肉胞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

（H30-食品-若手-003）

ウマ由来 *S. fayeri* シストが保有する各種タンパク質への冷却影響に関する研究

研究代表者 山崎 朗子 岩手大学農学部助教

研究要旨

住肉胞子虫はジビエの可食部位である骨格筋に寄生し、シカでの陽性率が100%であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現の機序が不明なため、早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて食中毒原因物質の特定を試みた。これまでに 15kDa の分子量を持つアクチン脱重合因子(ADF)が *S. fayeri* の腸管毒性因子として報告されていたが、昨年度の研究にて、ADF 以外にも putative Histamine releasing factor (pHRF)が新たな腸管毒性候補たんぱく質として推定された。今年度の研究では、4、20、80 の保存温度の違いによって *Sarcocystis* 属のブラディゾイトが腸管毒性を失うことを確認したため、本研究項目では、保存温度によって変化する腸管毒性と *Sarcocystis* 属原虫由来の腸管毒性たんぱく質との関連性を確認することを目的とした。その結果、4、-20、-80 の3条件でブラディゾイトを処理した後、含有される水溶性タンパク質を SDS-PAGE で分離したところ、15kDa(ADF)に比べ、19kDa(pHRF)の温度依存的なバンド濃度の低下が著しかった。pHRF はこれまでに腸管ループ試験で供試された 15kDa 分画にも含まれていたため、*Sarcocystis* による腸管

研究分担者

入江隆夫・宮崎大学
農学部准教授

A. 研究目的 業が盛んである。これまでの疫学調査
近年、害獣を食肉利用する地域振興事 で、E型肝炎ウイルス、志賀毒素産生

大腸菌、サルモネラ、肝蛭、住肉胞子虫等の保有が認められたが、中でも住肉胞子虫は可食部位に寄生し、我が国での野生ニホンジカでの陽性率がほぼ100%であることと、シカ肉の生食で食中毒がすでに発生していることから、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現については詳細が不明なため、既に食中毒が発生しているにも関わらず届出指定対象外である。ゆえに、これらの毒性の解析は早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* は、既に食中毒危害性を認められており、試料の入手が安定しているため、本研究では *Sarcocystis* 属原虫によって起こされる食中毒研究の一環として、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて食中毒を起こす原因物質の特定を試みた。これまでの報告で15kDaの分子量を持つアクチン脱重合因子(ADF)が *S. fayeri* の腸管毒性因子として報告されていたが、昨年度の研究にて、ADF以外のたんぱく質からも腸管毒性を起こす可能性を確認した(昨年度報告書)。このたんぱ

く質はアミノ酸シーケンシング解析により putative Histamine releasing factor (pHRF) と同定された。今年度の研究では、4、20、80の保存温度の違いによって *Sarcocystis* 属のブラディゾイドが腸管毒性を失うことを確認した。本研究項目では、上記のように保存温度によって変化する腸管毒性と腸管毒性たんぱく質との関連性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

本研究の供試検体として、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。と同様の方法で *S. fayeri* シストを50個回収し、回収したシストを4、-20、-80でそれぞれ12時間保存した。その後、前述と同様の方法でシスト由来水溶性成分を回収し、得られたタンパク質溶液を用いて前述と同様に SDS-PAGE を行い、タンパク質を確認した。SDS-PAGE 泳動後のゲルは2D-銀染色試薬・(コスモバイオ)を使用して以下の手順で染色した。泳動後のゲ

ルを固定液 に浸漬して 10 分振盪し、次いで固定液 に浸漬して 15 分振盪した。その後、前処理液に浸漬して 10 分振盪し、これを捨てて MilliQ 水で 5 分間洗浄した。洗浄後、銀染色液を注いで 15 分振盪した後、MilliQ 水で 2 分洗浄を 3 回行い、現像液に浸漬させて振盪した。適度の染色像が得られたら停止液 10 mL を注いで 5~10 分振盪し、その後 Milli-Q 水で十分洗浄した。固定液、固定液、前処理液、銀染色液、現像液の組成は以下の通りである。また、固定化剤、前処理剤、染色液 A、染色液 B、現像原液、停止液は前述のキット中のものを使用した。

固定液 (200 mL)

メタノール 100 mL

酢酸 (和光純薬) 20 mL

MilliQ 水を加え 200 mL に調整した。

固定液 (200 mL)

メタノール 60 mL

酢酸 20 mL

固定化剤 10 mL

MilliQ 水を加え 200 mL に調整した。

前処理液 (200 mL)

メタノール 100 mL

前処理剤 10 mL

MilliQ 水を加え 200 mL に調整した。

銀染色液 (200 mL)

染色液 A 10 mL

染色液 B 10 mL

染色液 A に染色液 B を混合後、MilliQ 水を加え 200 mL に調整した。

現像液 (200 mL)

現像原液 10 mL

MilliQ 水を加え 200 mL に調整した。

C . 研究結果

S. fayeri ブラディゾイト抽出水溶性タンパク質のうち、特に液体貯留を示した分画に含まれるタンパク質への温度影響を調べるため、4、-20、-80 でそれぞれ 12 時間保存した *S. fayeri* シストから抽出した水溶性タンパク質を用いて SDS-PAGE を行った (図 11)。ここで、液体貯留を示した

19～26 kDa の分画に着目すると、-20 および-80 保存シストは 4 保存シストよりバンドが薄かった。

D．考察

S. fayeri シスト抽出水溶性タンパク質の温度による影響を調べるため、4、-20、-80 でそれぞれ 12 時間保存した *S. fayeri* シストから抽出した水溶性タンパク質について SDS-PAGE を行った。ここで、液体貯留を示した 15kDa 分画、19～26 kDa の分画に着目すると、19～26 kDa の分画では-20 および-80 保存シストで 4 保存シストよりバンドが薄くなった。一方、ADF については異なる温度条件下でのバンドの濃度に違いは認められなかった。これは、前年度報告したとおり、冷凍保存シストを用いた腸管ループ試験で腸管毒性が失われた結果への関与を推察させる。このことから、*S. fayeri* の腸管毒性は冷凍により失活する因子に起因することが示唆された。今後は該当のタンパク質、特に HRF について抗 HRF 抗体を製作し、それを用いた Western Blotting

でより詳細な温度による影響の解析を行う必要がある。

E．結論

in vivo 試験での腸管ループ試験にて結果が分かれた 4、-20、-80 の 3 条件でブラディゾイトを処理した後、含有される水溶性タンパク質を SDS-PAGE で分離したところ、15kDa(ADF)に比べ、19kDa(pHRF)の温度依存的なバンド濃度の低下が著しかった。pHRF はこれまでに腸管ループ試験で供試された 15kDa 分画にも含まれていたため、*Sarcocystis* による腸管毒性の主原因についてさらに検討する必要がある。

F．健康危険情報

G．研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
 - 1 (第 162 回日本獣医学会学術集会、令和元年度 9 月 10-12 日、筑波国際会議場、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析 公衆衛生学分科会 奨励賞)

2 .(第 65 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、令和元年度 10 月 26 日、岩手大学、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析)

3 . (2019 年度東北地区獣医師大会・2019 年度獣医学術東北地区学会、令和元年度 10 月 10 日、郡山ビューホテルアネックス、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管毒性解析)

4 .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 (FAMS) 成果発表会、2019 年 2 月

28 日、岩手大学農学部総合教育研究棟 (5 号館) 7 番教室、スペース C、合計参加者数、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 (FAMS) 主催、平成 30 年度の事業内容報告

H . 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

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）

（総括・分担）研究報告書

住肉胞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

（H30-食品-若手-003）

*Sarcocystis*属の細胞毒性実験（ブラディゾイト、由来タンパク質、組換えADF）

研究代表者 山崎 朗子 岩手大学農学部助教

研究要旨

住肉胞子虫はジビエの可食部位である骨格筋に寄生し、シカでの陽性率が100%であること、シカ肉の生食で食中毒が発生したことから、ジビエ産業振興への障害となる。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫は毒性発現の機序が不明なため、早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて食中毒原因物質の特定を試みた。これまでに、シストから遊離したブラディゾイトの温度変化による腸管毒性の影響、虫体由来のたんぱく質による下痢毒性の発現をウサギを用いた腸管ループ試験で確認したが、分子レベルでの機序についてはまだ詳細が分かっていない。そのため、本研究では、これまで *in vivo* で腸管毒性が確認された要因について、*in vitro* での反応の確認を試みた。その結果、*Sarcocystis* 原虫を用いたマクロファージ刺激試験では、冷凍シスト、凍結融解シスト、組換え *S. fayeri* ADF の全てで有意な TNF- α の誘導が認められた。純粋タンパク質である組換え ADF での刺激よりも他のタンパク質を含む冷凍シスト、凍結融解シストでの TNF- α 誘導量が多かったことは、pHRF による毒性発現の関連を示唆する。

研究分担者

入江隆夫・宮崎大学研宮崎大学
農学部准教授

A．研究目的

近年、害獣を食肉利用する地域振興事業が盛んである。これまでの疫学調査で、E型肝炎ウイルス、志賀毒素産生大腸菌、サルモネラ、肝蛭、住肉孢子虫等の保有が認められたが、中でも住肉孢子虫は可食部位に寄生し、我が国での野生ニホンジカでの陽性率がほぼ100%であることと、シカ肉の生食で食中毒がすでに発生しているが、シカ肉に寄生する住肉孢子虫の毒性発現機序については不明な点が多い。既に食中毒が発生しているにも関わらず届出指定対象外であるため、これらの毒性の解析は早急な解決が求められる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* は、既に食中毒危害性を認められており、試料の入手が安定しているため、本研究では *Sarcocystis* 属原虫によって起こされる食中毒研究の一環として、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて食中毒を起こす原因物質の特定を試みた。これまでに、シストから遊離したブラディゾイトの温度変化

による腸管毒性の影響、虫体由来のたんぱく質による下痢毒性の発現をウサギを用いた腸管ループ試験で確認したが、分子レベルでの機序についてはまだ詳細が分かっていない。そのため、本研究では、これまで *in vivo* で腸管毒性が確認された要因について、*in vitro* での反応の確認を試みた。

B．研究方法

本研究の供試検体として、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。

Sarcocystis による細胞毒性について、Fayerら、Nakamuraらの以前の報告に従い、TNF- α 分泌誘導実験をマウスマクロファージ細胞を用いて行った。RAW264.7細胞をD-MEM培地で培養し、無血清培地に交換した後、12時間のインキュベーションを行ってから各ウェルに冷凍シスト破碎液 (MOI = 0.70)、-80℃凍結と37℃融解を5回繰り返した凍結融解シスト (0.33 mg/mL)、本研究室保管の組み換え *S. fayeri* ADF (1 μ g/mL)を添加した。陰性対照は、無血清培地 D-MEM、対照

には LPS (100 ng/mL) を用いた。4 時間の培養後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて TNF- α の mRNA 量を定量した

C . 研究結果

刺激培養後、RAW264.7 細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR にて TNF- α の mRNA 量を定量した結果、冷凍シスト、凍結融解シストの刺激によって、陰性対照より有意に高い TNF- α の mRNA 増幅が認められた。中でも冷凍シストは陽性対照と同等の TNF- α 発現誘導を示した。また、凍結融解シストでも有意な TNF- α 発現誘導を確認した (図 12)。

D . 考察

Sarcocystis 原虫を用いたマクロファージ刺激試験では、冷凍シスト、凍結融解シスト、組換え *S. fayeri* ADF の全てで有意な TNF- α の誘導が認められた。そのことから、ブラディゾイトとしての活性を失ったタンパク質レベルでも TNF- α 産生が誘導されていることを示唆する。しかし、組換え *S.*

fayeri ADF では陰性対照と比較して有意に TNF- α mRNA 量は上昇したものの、他のサンプルに比べると低値を示した。しかし、*in vivo* 試験で確認された『冷凍シスト破碎液ではウサギ腸管ループに液体貯留を示さない』結果と考察すると、TNF- α の産生、刺激により下痢が引き起こされるとは考えにくく、純粋タンパク質である組換え ADF での刺激よりも他のタンパク質を含む冷凍シスト、凍結融解シストでの TNF- α 誘導量が多かったことは、前出の pHRF による毒性発現の関連を示唆する。そのため、HRF の生体および細胞に対する作用を解明する必要がある。本研究では、既出の *Sarcocystis* による細胞毒性に関する Fayer らの報告にならい、TNF- α をターゲットとした解析を行ったが、これまでに我々が得た *in vivo* 試験の結果や、今回の *in vitro* 試験で得た結果から考察すると、TNF- α 以外のサイトカイン等細胞分泌物質についても検証する必要があり、純粋な HRF を用いた生体試験、細胞刺激実験が次の課題となる。また、ヒトへのリスク解

明に近づけるため、ヒトマクロファージ U937 細胞を用いたサイトカイン実験系を構築することも必要である。

E . 結論

Sarcocystis 原虫を用いたマクロファージ刺激試験では、冷凍シスト、凍結融解シスト、組換え *S. fayeri* ADF の全てで有意な TNF- α の誘導が認められた。純粋タンパク質である組換え ADF での刺激よりも他のタンパク質を含む冷凍シスト、凍結融解シストでの TNF- α 誘導量が多かったことは、pHRF による毒性発現の関連を示唆する。

【参考文献】

Fayer R. et al. J Parasitol. 1988 Aug;74(4):660-4.

Nakamura Y. et al. Vet Parasitol. 1999 Sep 1;85(4):235-43.

F . 健康危険情報

G . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 163 回日本獣医学会学術集会、令和 2 年度 9 月 14-30 日、山口大学 (Web 開催)

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

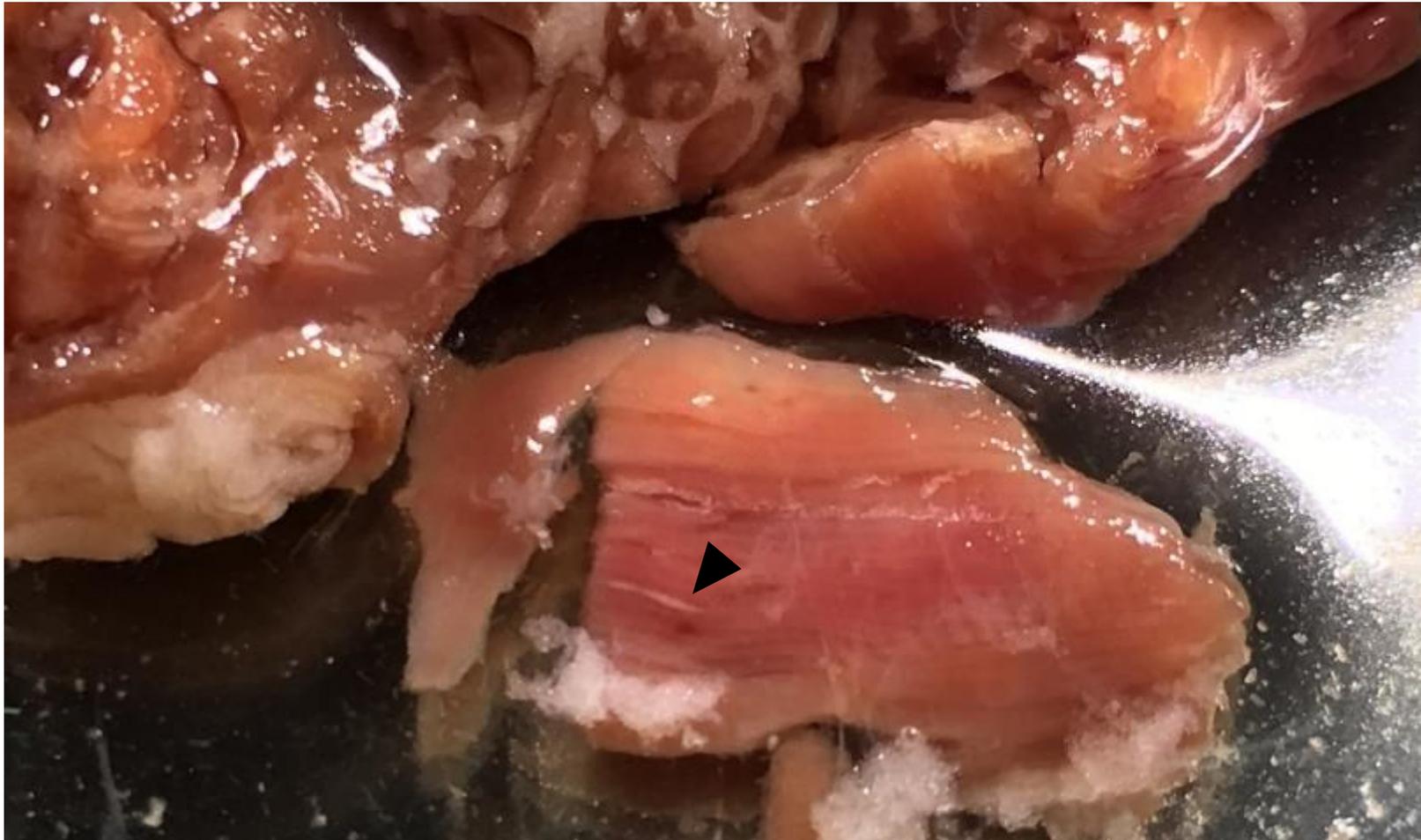
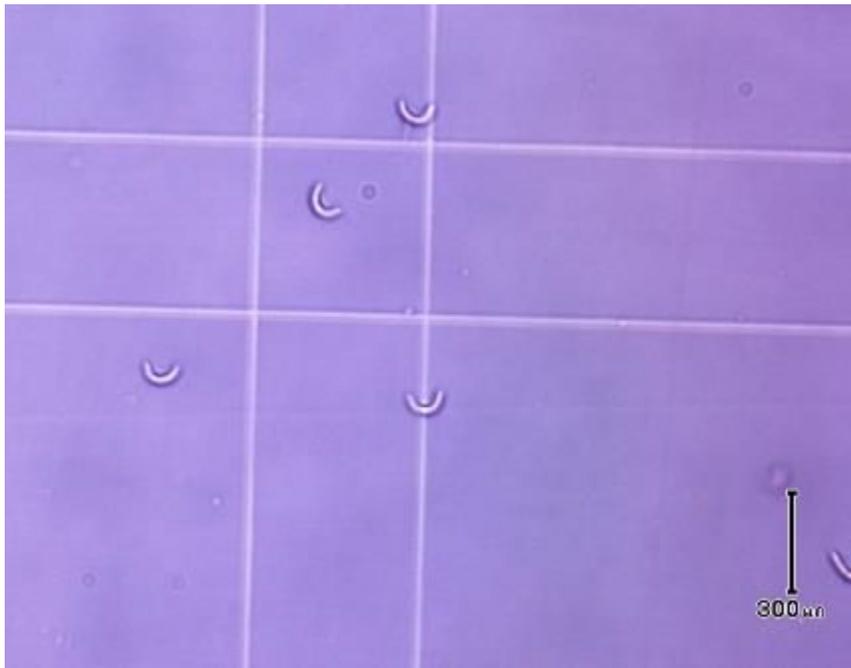


図1 ウマ筋肉組織中のシスト (8倍拡大像)

(a)



(b)

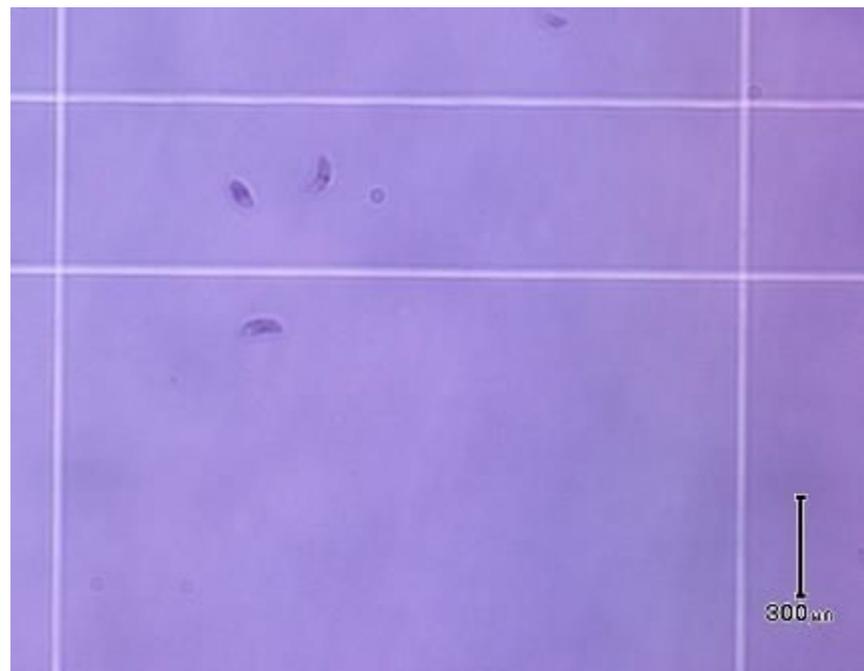


図2 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトのトリパンブルー色素試験

(a) 非染色 (筋組織より摘出直後) , (b) 染色 (摘出後-20 時間 60 時間保存後)

(a)



(b)

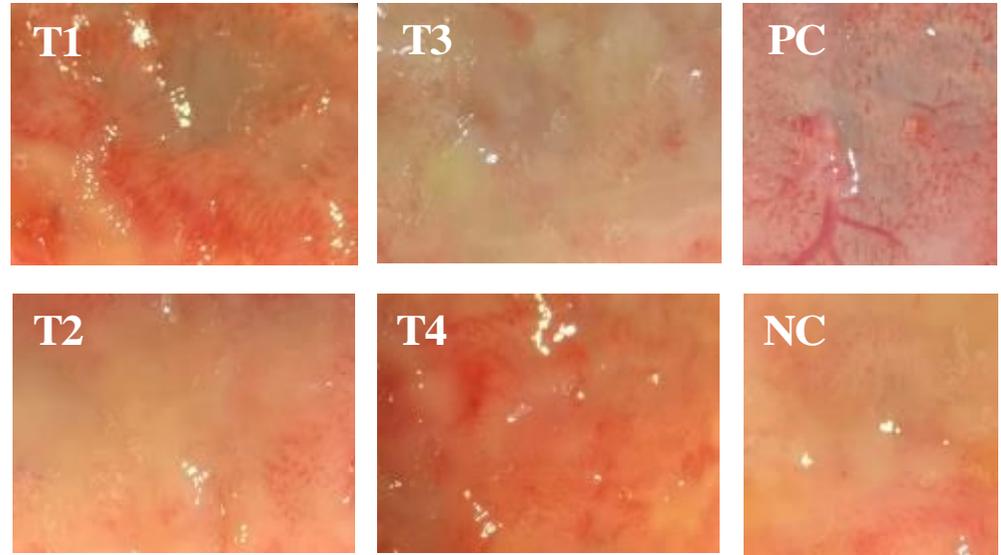


図3 シカ寄生 *Sarcocystis* 属シスト破碎液を用いた腸管ループ試験の結果

(a) 腸管全体像, (b) 腸管内腔粘膜

T1: 10^3 bradyzoites/loop, T2: 10^4 bradyzoites/loop, T3: 10^5 bradyzoites/loop, T4: 10^6 bradyzoites/loop, PC: 組み換えウェルシュ菌毒素
20 μ g/loop, NC: PBS

(a)



(b)

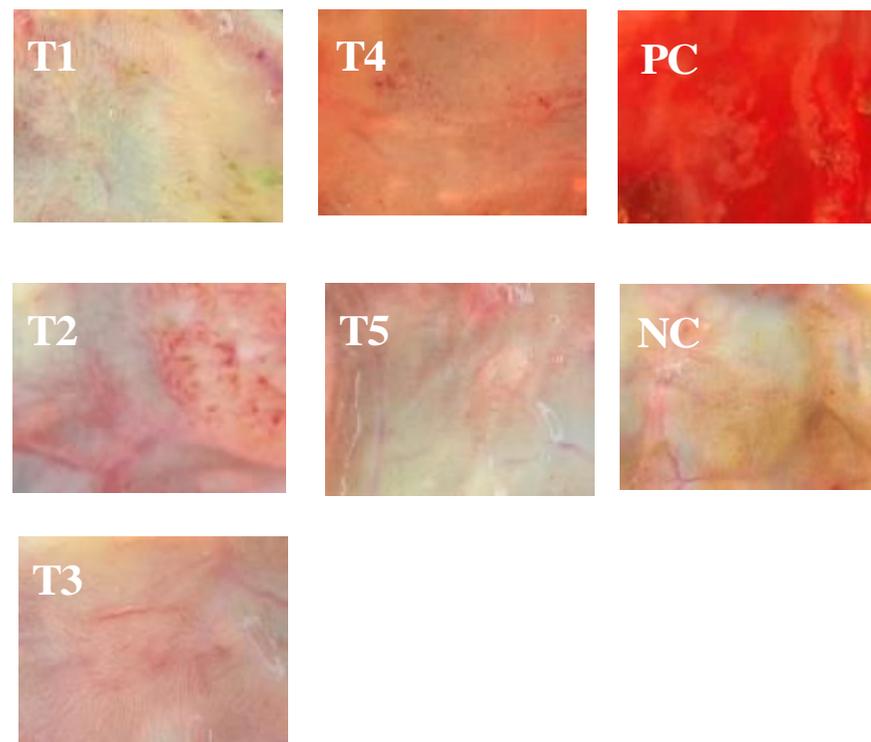


図4 ウマ寄生 *S. fayeri* シスト破碎液を用いた腸管ループ試験結果 (-20℃保存シスト, 4℃保存シスト)

(a) 腸管全体像, (b) 腸管内腔粘膜

T1: -20℃保存シスト・ 10^3 bradyzoites/loop, T2: -20℃保存シスト・ 10^5 bradyzoites/loop, T3: 4℃保存シスト・ 10^1 bradyzoites/loop, T4: 4℃保存シスト・ 10^2 bradyzoites/loop, T5: 4℃保存シスト・ 10^3 bradyzoites/loop, PC: 組み換えウェルシュ菌毒素 20 μ g/loop, NC: PBS

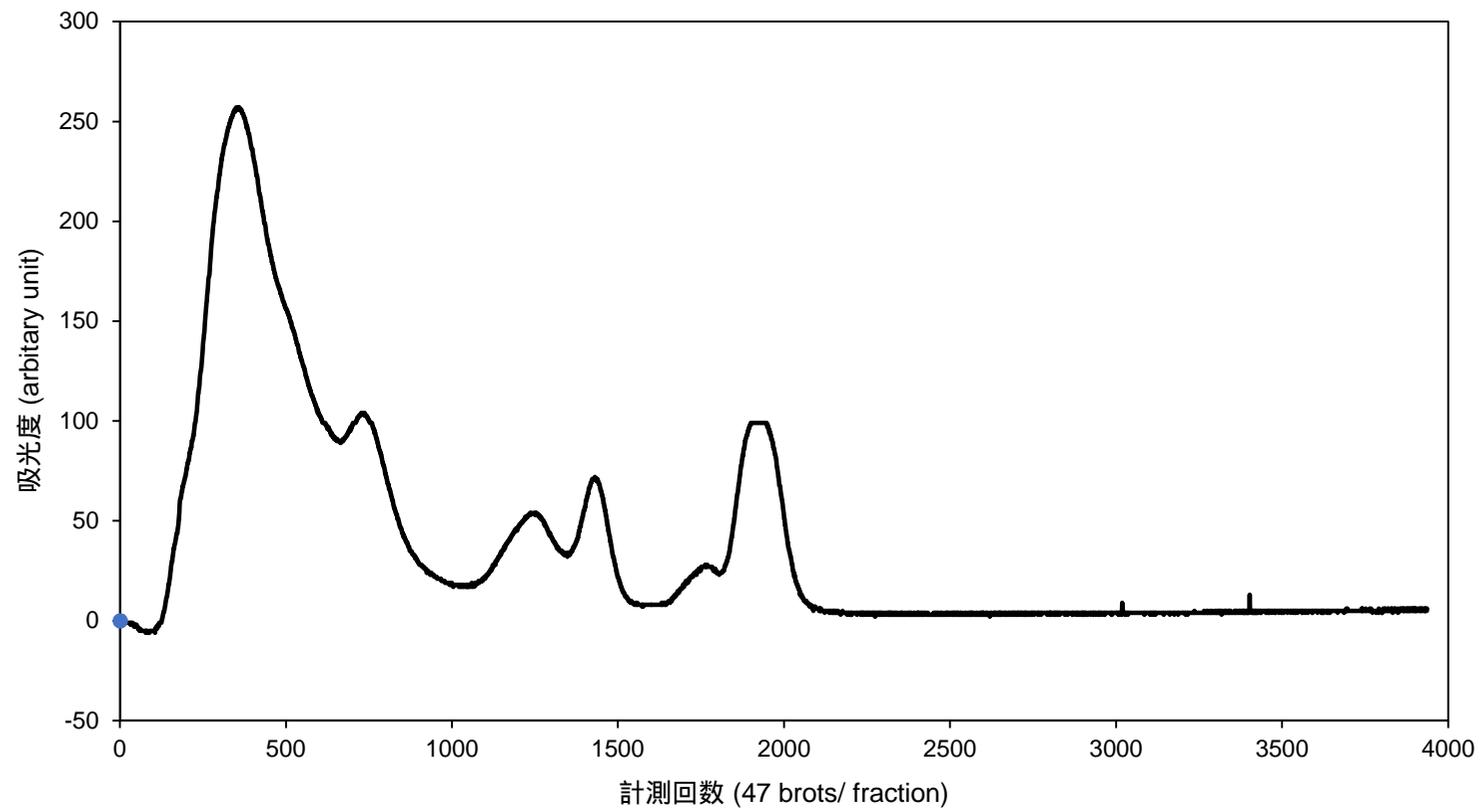


図5 UV モニターで計測したゲル濾過クロマトグラフィーによるタンパク質分画

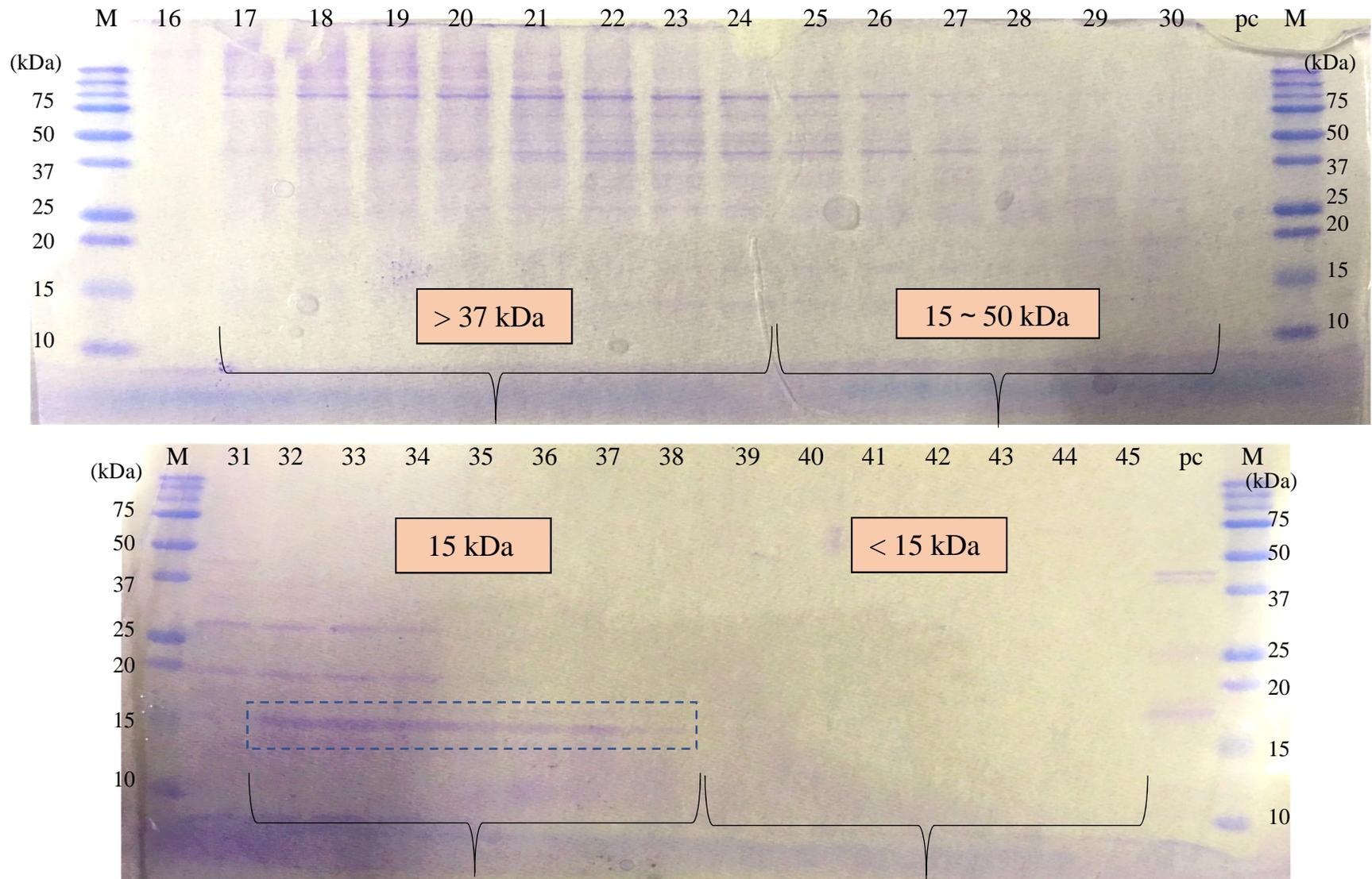


図6 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーによる分画の SDS-PAGE 像 (フラクション 16-45)

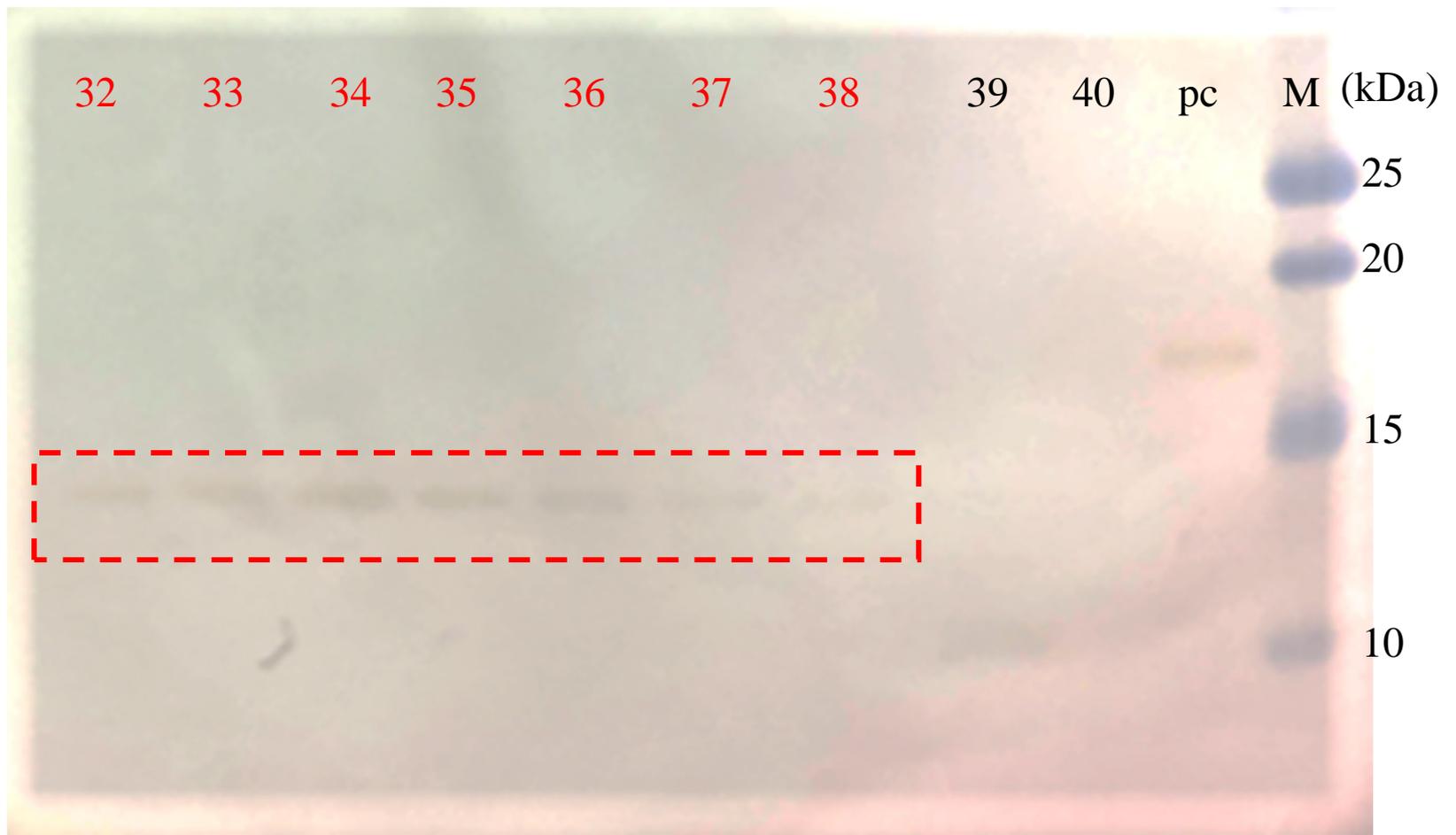


図7 *S. fayeri* プラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過分画 (32-40) を用いた抗 ADF 抗体による Western Blotting 像
(一次抗体：ウサギ由来 *S. fayeri* rADF IgG 抗体)

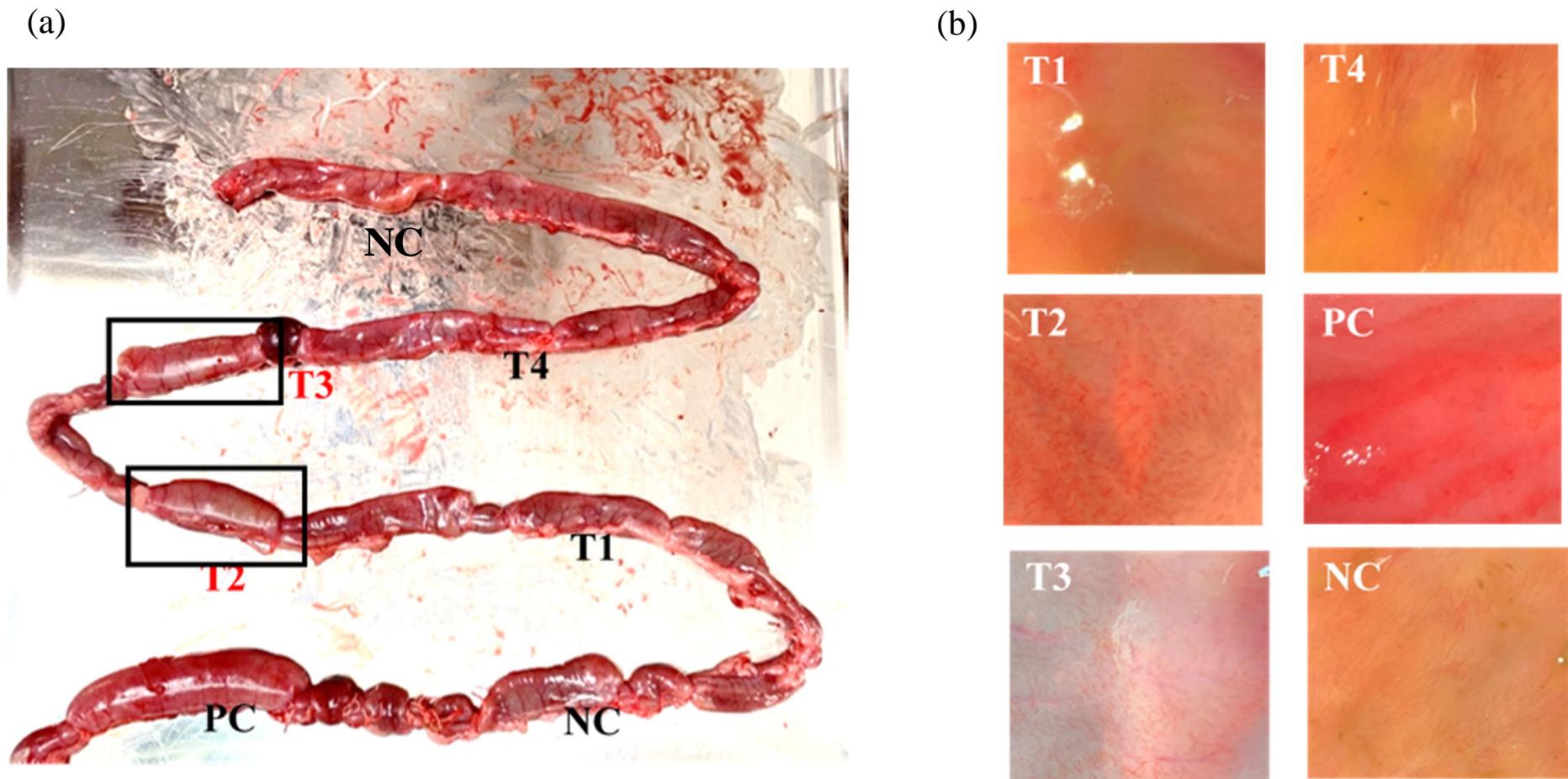


図8 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過分画を用いた腸管ループ試験の結果

(a) 腸管全体像, (b) 腸管内腔粘膜

T1: > 37 kDa 分画 (フラクション 17-24) , T2: 15 ~ 50 kDa 分画 (25-31) , T3: 15 kDa 分画 (32-38) , T4: < 15 kDa 分画 (39-45) ,
 PC: 組み換えウェルシュ菌毒素 40 µg/loop , NC: PBS

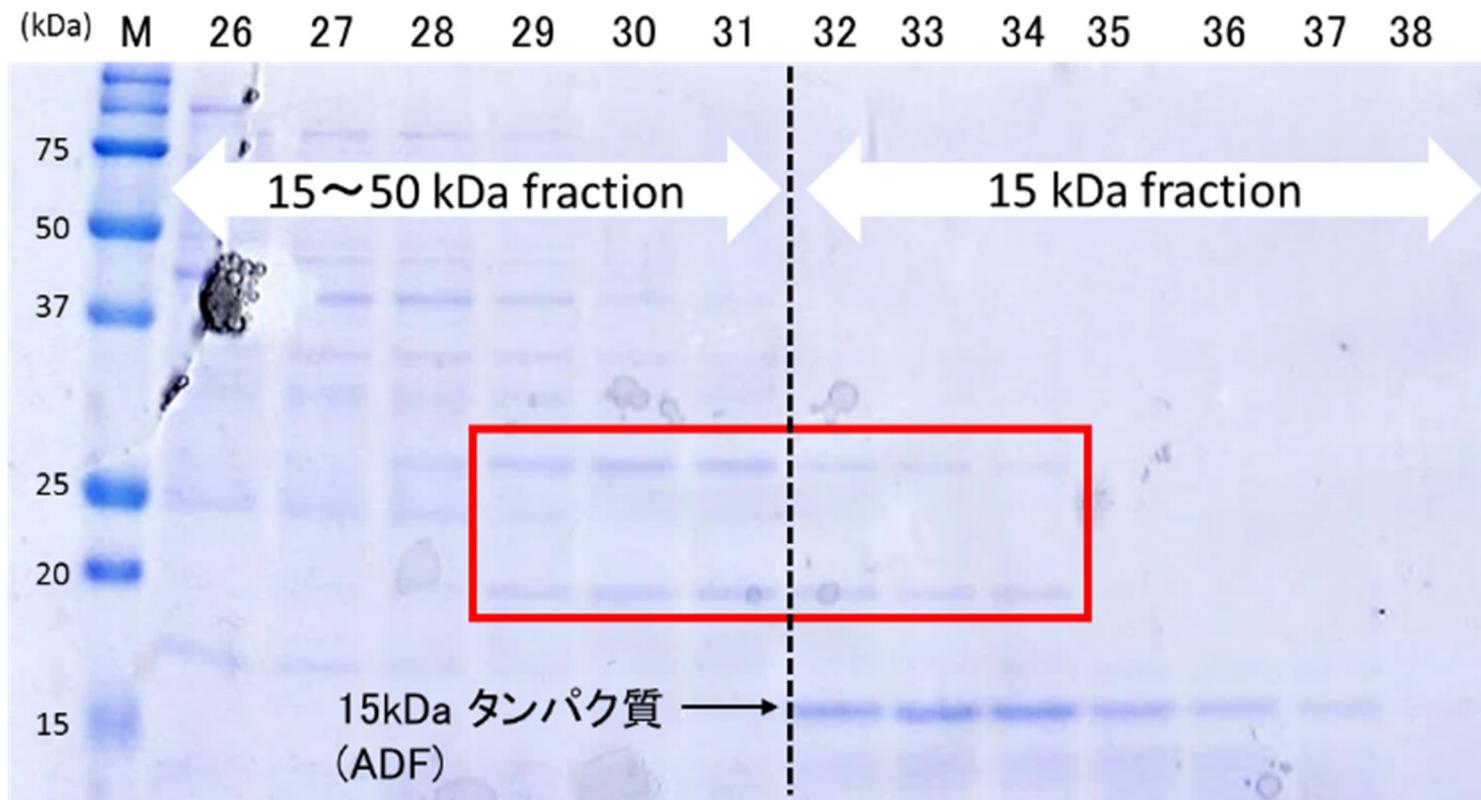


図9 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過分画の SDS-PAGE 像 (15 ~ 50 kDa 分画 , 15 kDa 分画 フラクション 26-40) 2つの分画間にまたがって存在する約 26 ~ 19 kDa のタンパク質 (赤枠) について nanoLC-MS / MS を用いたアミノ酸シーケンシングを行った

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: CAH3_HORSE

Carbonic anhydrase 3 OS=Equus caballus OX=9796 GN=CA3 PE=1 SV=2

Database: SwissProt
Score: 515
Monoisotopic mass (M_r): 29778
Calculated pI: 7.70
Taxonomy: Equus caballus

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of CAH3_HORSE against nr](#).

Search parameters

MS data file: C:\Users\Thermo\Desktop\TempData\ya190603_05.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 67%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1  MAKEMGYADH  NGPDHWHEFY  PIKAGDNQSP  IELRTKDINH  DPSLKAWTAS
51  YDPGSARTIL  NNGRECRVVF  DDTYDRSMLR  GGPLTAPYRL  ROPHLHWSS
101 DDBSSENTVD  GVKYAAELHL  VHWNPYNTY  GGALKQPDGI  AVVGVPLKIG
151 RERGFQLPL  DALDKIKTRG  KEAPPTNFDP  SCLPDTGRDY  WTYRGSFTTP
201 PCEECIVWLL  LKEPITVSSD  QVAKLRSLFS  SAENEPPVPL  VRNWRPPOPL
251 KGRVVRASPK
```

Unformatted sequence string: **260 residues** (for pasting into other applications).

Sort by residue number increasing mass decreasing mass
Show matched peptides only predicted peptides also

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: KFH04742.1

putative histamine-releasing factor [Toxoplasma gondii MAS]

Database: toxoplasma
Score: 31
Monoisotopic mass (M_r): 19274
Calculated pI: 4.54

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of KFH04742.1 against nr](#).

Search parameters

MS data file: ya190603_08.mgf
Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)

Protein sequence coverage: 7%

Matched peptides shown in **bold red**.

```
1  MKVYKDVFTG  DELCSDSYAE  LPPMDDPSLS  EVAPEVATKR  IVKGAEQYGI
51  ADNSEEDGGG  VDSTSETVVD  VVDAFRLQET  PFSKKEFGTY  IKGYMQRVKG
101 HLEKNHPDRV  DKFMGAQAL  VKKILGQFDD  EQFFLGSAD  CEAGVVFAYY
151 KDGEEAPRLI  YIRDGLKEEK  Y
```

Unformatted sequence string: **171 residues** (for pasting into other applications).

Sort by residue number increasing mass decreasing mass
Show matched peptides only predicted peptides also

図 10 Nano-Pro LC/MS-MS による腸管毒性発現フラクションのアミノ酸配列解析結果

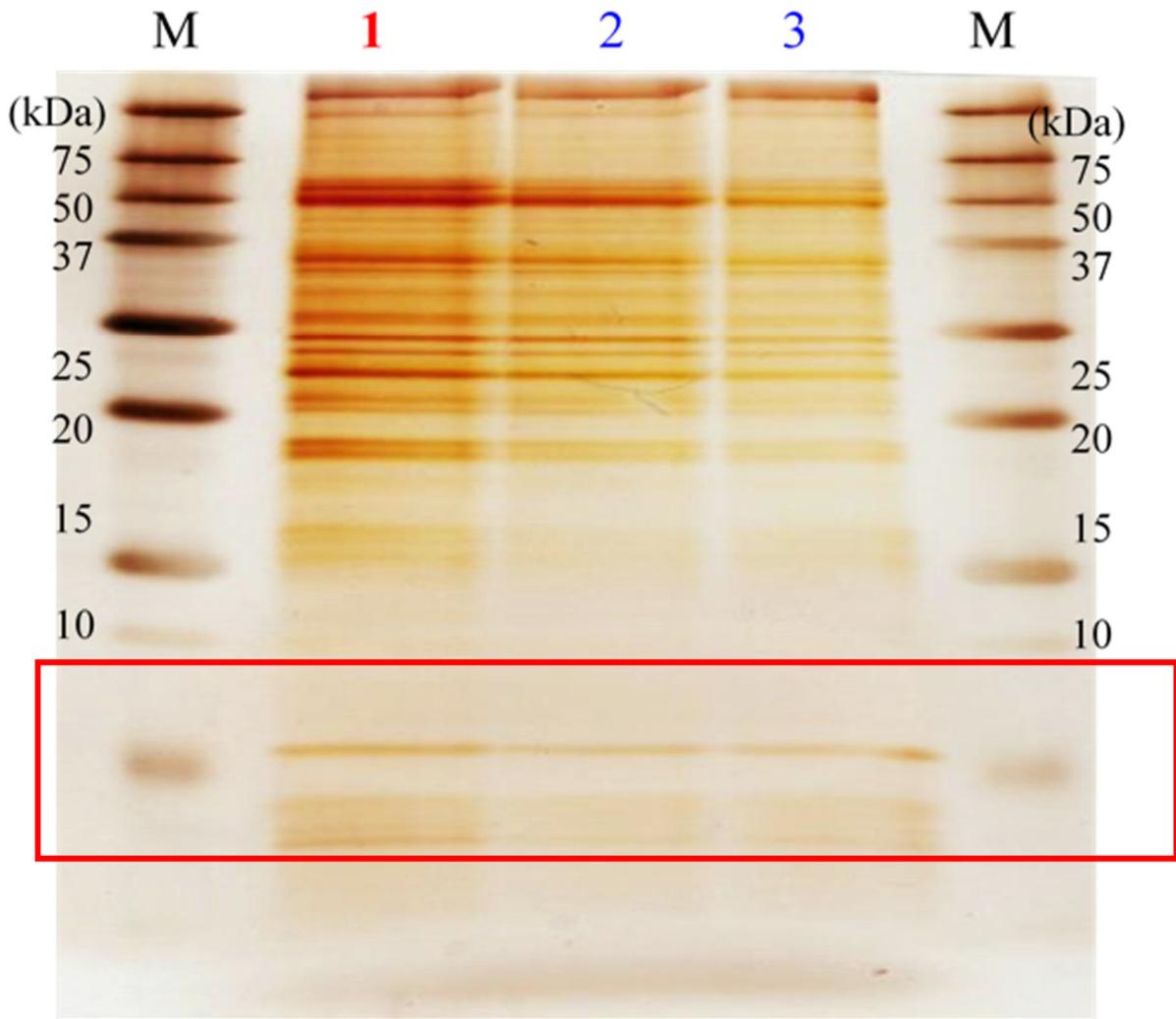


図 11 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質の温度による影響 (SDS-PAGE)
 レーン 1: 4 保存シスト, レーン 2: -80 保存シスト, レーン 3: -20 保存シスト
 赤枠は腸管ループ試験で液体貯留を示した分画に含まれていたタンパク質を示す

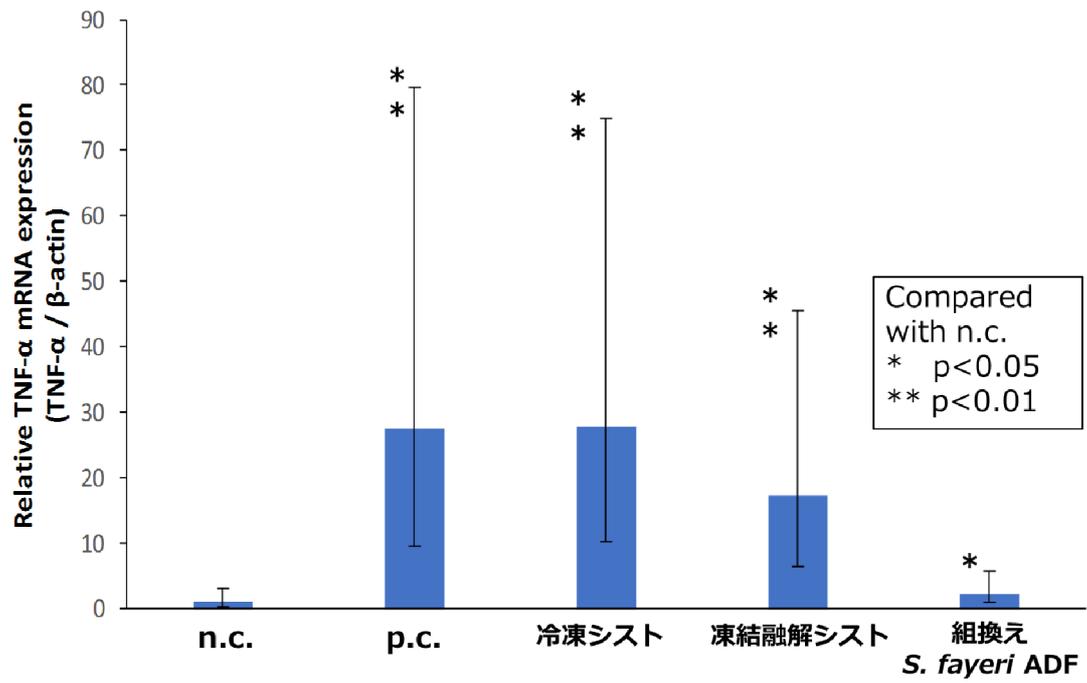


図 12 *Sarcocystis* 属のプラディゾイト、由来タンパク質、組換え ADF を用いた細胞刺激による TNF の産生

表 1 . シカ由来 *Sarcocystis* sp. の腸管毒性発現最少投与量の検討

検体	保存温度 ()	保存時間 (時間)	ブラディゾイト数 (/loop)	非染色率 (%)	FA 値
シカ由来シスト (<i>Sarcocystis</i> sp.)	4	12	10 ⁶	100	0.05
			10 ⁵		0.05
			10 ⁴		0.03
			10 ³		0.08
	4	48	10 ⁵	94.3	0.29
	-80	72	10 ⁵	0	0.08
陰性対照			PBS		0.04
陽性対照			ウェルシュ菌毒素 20 µg /loop		0.20

灰色のセルは昨年度の実験結果を比較として示す。

表 2 . ウマ由来 *S. fayeri* の腸管毒性発現最少投与量の検討、および-20 冷却の影響

検体	保存温度 ()	保存時間 (時間)	ブラディゾイト数 (/loop)	非染色率 (%)	FA 値
ウマ由来シスト (<i>S. fayeri</i>)	4	12	10 ¹	100	0.06
			10 ²		0.08
			10 ³		0.08
	4	24	10 ³	80	0.58
			10 ⁵		0.67
			10 ³		0.07
	-20	12	10 ³	100	0.05
			10 ⁵		0.04
			10 ³		67
-80	24	10 ⁵	0	0.04	
		10 ⁵		0.01	
陰性対照			PBS		0.07
陽性対照			ウェルシュ菌毒素	20 µg /loop	1.2

灰色のセルは昨年度の実験結果を比較として示す。

表3 *S.fayeri* シスト抽出タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー分画を用いたウサギ腸管ループ試験結果

検体	フラクション No.	分子量 (kDa)	FA 値
T1	17-24	>37	0.080
T2	25-31	15 ~ 50	0.30
T3	32-38	15 (ADF)	0.20
T4	39-45	<15	0.070
陰性対照	PBS		0.075
陽性対照	ウェルシュ菌毒素 40 µg /loop		0.42

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)

分担研究報告書

エゾシカに寄生する各種住肉胞子虫の生活環解明のための研究
分担研究者 入江隆夫 北海道立衛生研究所 感染症部・研究職員

研究要旨

昨年度までの調査によりエゾシカにおける複数種の *Sarcocystis* 属原虫の高率な寄生状況が明らかとなったが、その生態についてはまだほとんど解明されていない。特に、エゾシカにおける高度流行状況を説明し、また制御のための対策を検討する上で、生活環の解明、すなわち終宿主動物の特定は不可欠である。先行研究では、*S. ovalis* の終宿主としてカラス科鳥類の関与を本邦ではじめて証明した。今年度は、エゾシカにおける保有率が9割を超える *S. pilosa* を対象とし、キタキツネにおける保有状況調査を実施した。その結果、検査した 65 検体のうち 1 件において、糞便内に *S. pilosa* のスポロシストが検出され、エゾシカ-キタキツネ間で本種の生活環が維持されていることを初めて明らかにした。ただし、糞便内のスポロシスト検査は低感度であり、実際の感染率を示していないことが危惧される。より正確にキタキツネの本種保有状況を評価するため、今後は捕獲された個体の小腸を対象とした組織学的・分子学的調査を実施する必要がある。

A. 研究目的

近年、有害獣肉を食用利用する地域振興事業が推進されているが、その可食部筋肉には高率に住肉胞子虫 (*Sarcocystis* 属原虫) が寄生することが知られている。この原虫の寄生したシカ肉を摂取したことによる食中毒事例も報告されている一方で、原虫種

や種ごとの分布状況、また毒性の原因物質など、基礎情報はほとんど解明されていない。そのため、食中毒予防、ならびにジビエ産業振興のためにも、野生獣肉に寄生する *Sarcocystis* の生態解明は必須の課題である。昨年度までに、特に国内での食用利用の盛んなエゾシカにおいて、4 種 (*S. japonica*、

S. cf. tarandi、*S. pilosa* および *S. ovalis*) が寄生していることを明らかにした。今年度はこれらの生活環の解明を目指し、終宿主動物を対象とした調査を行った。

B. 研究方法

道東地域において 2018 年 5 月および 12 月にそれぞれ 44 個、21 個のキツネ糞を採集した。(糞主動物は糞便表面の腸粘膜由来 DNA の分析により特定した)

蔗糖遠心浮遊法により *Sarcocystis* 属原虫のスポロシストを顕微鏡下で探索した。検出されたスポロシストについて、18S rRNA 遺伝子領域およびシトクローム *c* オキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子領域の塩基配列を解読し、分子系統解析による種の同定を行った。

C. 結果

12 月に採集した検体のうち 1 件から、内部にスポロゾイトを内包した典型的なスポロシストを検出した。18S rRNA 領域 (1669bp) および COI 領域 (1029bp) の塩基配列はエゾシカから検出されている *S. pilosa* のものと完全に一致した。

D. 考察

S. pilosa の終宿主については、系統解析および近縁種での報告からイヌ

科動物が疑われていたが、実際に本種のスポロシストが野生動物の糞便から検出されたのは世界的にも初の結果である。本調査でのスポロシスト排出例は検査したキツネ糞のうちわずか 1 例のみであったが、糞便中へのスポロシスト排出量には変動があることが知られていることから、今回の結果は正確な流行状況を反映していないことも疑われる。そのため、今後は捕獲されたキツネの小腸を対象とした組織学的・分子学的調査を進め、実際の感染率等を評価していく予定である。

また、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* に関しては、終宿主を示唆する情報は世界的にも知られていないものの、特に *S. cf. tarandi* はエゾシカから非常に高率に検出されることから、分子系統情報も加味し、北海道に広く生息するイヌ科以外の動物を対象にした調査が必要であると考えられる。

E. 結論

S. pilosa の終宿主動物としてキツネが貢献していることを世界的にも初めて証明した。これらの動物は、おそらくエゾシカの腐肉食により、エゾシカ由来の *Sarcocystis* 属原虫の感染を受け、そして糞中へスポロシストを排出して新たなエゾシカへの感染源を供給する、という生活環の一端を明らかとすることができた。本研究に

より、エゾシカにおける極めて高率な *Sarcocystis* 属原虫の保有状況を説明し、また流行制御のための対策を検討する上で不可欠な情報を、部分的にはあるが提供することができたと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Irie T, Uraguchi K, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K. First report of *Sarcocystis pilosa* sporocysts in feces from red fox, *Vulpes vulpes schrencki*, in Hokkaido, Japan. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, **11, 29-31, 2019**

Irie T, Ichii O, Nakamura T, Ikeda T, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K. Molecular characterization of three *Sarcocystis* spp. from wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, **18, 100327, 2019**

2. 学会発表

第 162 回日本獣医学会学術集会 2019 年 9 月 10-12 日, つくば. エゾシカ-キタキツネによる *Sarcocystis pilosa* の

生活環. 入江隆夫, 浦口宏二, 山崎朗子, 高井伸二, 八木欣平

第 65 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2019 年 10 月 26 日, 盛岡. エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属原虫の種同定およびその終宿主探索. 入江隆夫, 市居 修, 中村鉄平, 浦口宏二, 伊東拓也, 山崎朗子, 高井伸二, 八木欣平

令和元年度 十勝獣医師会公衆衛生講習会「食品媒介寄生虫、特にジビエに潜む寄生虫について」, 2019 年 7 月 26 日、十勝総合振興局 4 階 C 会議室、約 20 人、十勝獣医師会、会所属の公衆衛生獣医師に対する食品媒介寄生虫に関する講義

令和元年度エゾシカ検査アドバイザー獣医師研修会「ジビエに潜む寄生虫、特にトリヒナとサルコシステイスについて」, 2019 年 8 月 7 日、北海道立衛生研究所講堂・感染病理実験室、10 人、北海道環境生活部、HACCP 認証施設でエゾシカの解体検査に携わる獣医師に対する講義および実習

令和元年度中央ブロック保健所生活衛生監視指導班研修会「食品媒介寄生虫症」, 2019 年 11 月 25 日、空知総

合振興局 5 階会議室、約 **30** 人、空知
総合振興局保健環境部、空知管内の公
衆衛生業務に携わる獣医職・衛生職北
海道職員に対する講義

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
- 3. その他**
なし

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Irie T, Uraguchi K, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K.	First report of <i>Sarcocystis pilosa</i> sporocysts in feces from red fox, <i>Vulpes vulpes schrencki</i> , in Hokkaido, Japan.	International Journal of Parasitology : Parasites and Wildlife	11	29-31	2019
Irie T, Ichii O, Nakamura T, Ikeda T, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K.	Molecular characterization of three <i>Sarcocystis</i> spp. from wild sika deer (<i>Cervus nippon yesoensis</i>) in Hokkaido, Japan.	Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports	18	100327	2019
Yamazaki A, Hiroshima T, Yamaguchi Y, Shirafuji Y, Taira K, Saito M, Kobayashi N, Sugita-Konishi Y, Kitamata Y.	Presence of <i>Sarcocystis sybillensis</i> in Japanese sika deer (<i>Cervus nippon</i>) captured in its native territory and its phylogenetic relationship with <i>Sarcocystis nipponi</i> .	Parasitology Research	119	2309-2315	2020

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

年 月 日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 岩手大学

所属研究機関長 職 名 農学部長

氏 名 倉島 栄一 印

次の職員の(元号) 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 住肉胞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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 農学部 助教
(氏名・フリガナ) 山崎 朗子 ヤマザキ アキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入(1)		
		審査済み	審査した機関	未審査(2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針				
遺伝子治療等臨床研究に関する指針				
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (3)				
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針				
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称)				

(1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

- (2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講	未受講
-------------	----	-----

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有	無 (無の場合はその理由:
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有	無 (無の場合は委託先機関:
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有	無 (無の場合はその理由:
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有	無 (有の場合はその内容:

(留意事項) ・該当する にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。