

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

(平成)30年度～(令和)3年度 総合研究報告書

研究代表者 山崎 朗子

(令和)4年(2022)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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

1. ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の比較に関する研究 -1
2. *Sarcocystis* 属原虫の冷凍処理による毒性の低減の検討 -----9
3. *Sarcocystis* 属原虫の毒性タンパク質の検出および同定 -----14
4. ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の経口毒性の検討-----25
5. *Sarcocystis* 属原虫による細胞傷害性およびサイトカイン産生誘導の解析-----30

山崎 朗子

分担研究報告

1. 北海道のエゾシカにおける住肉胞子虫の疫学的研究 -----44
2. 九州産ジビエ（キュウシュウジカ、イノシシ、アナグマ）試料採集と寄生虫の探索 --47
3. 北海道および九州産ジビエ（エゾシカ、キュウシュウジカ、イノシシ、アナグマ）における寄生虫の探索 -----49

入江隆夫

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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）

総合研究報告書

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

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

研究要旨

野生ニホンジカ筋肉中の住肉孢子虫 *Sarcocystis* と、比較対象となるウマ由来 *Sarcocystis* シストを用いてウサギを用いた *in vivo* バイオアッセイにて腸管毒性を確認した。ウマ由来 *Sarcocystis* シストでは 10^3 以上の投与で出血性液体貯留を示したが、 -80°C で冷凍保存したシストは液体貯留を起こさなかった。一方、シカ由来の *Sarcocystis* は冷蔵保存した 10^7 シストの投与で非出血性の液体貯留を起こした。このように、同じ *Sarcocystis* 属原虫でも、ウマ由来 *Sarcocystis* とシカ由来 *Sarcocystis* は異なる腸管毒性を持つと考えられる。

たウサギ腸管ループ試験を行った。

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、その毒性発現量の検討や、ニホンジカに寄生する他種の *Sarcocystis* 属に関する情報は乏しい。そこで本研究では、ウマおよびニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の腸管毒性発現量を確認するため、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

B 研究方法

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

本研究の供試試料として、北海道、千葉県、岩手県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。

表面を PBS で湿らせた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 *Sarcocystis* 属シストを PBS 中に回収して数日中に試験に用いた。

投与ブラディゾイト数は、ウマ由来 *S. fayeri* で $10 \sim 10^5$ /loop、シカ由来 *Sarcocystis* spp. で $10^3 \sim 10^7$ /loop に調整した。

白色日本種、オス、21, 22 週齢、3.0 kg 体

重のウサギを 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 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 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 = 内容物重量 (g) /ループ長 (cm)

また、シストからゲノムを抽出し、18S リボソーム RNA (18S rRNA) 遺伝子を標的としたダイレクトシーケンシングによる遺伝子塩基配列解析を行った。シカ寄生 *Sarcocystis* 属シストについては、7 種類の *Sarcocystis* 属の Cytochrome C Oxidase subunit I (*cox1*) 遺伝子を標的とし、種特異的に増幅するプライマー (表 1) を用いた定性 PCR を行った [Abe et al., 2019]。

(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

岩手県産ニホンジカの骨格筋組織から分離したシストは、18S rRNA 遺伝子を標的としたダイレクトシーケンシングで、*S. japonica* と 99%、*S. cf. tarandi* と 98%、*Sarcocystis* sp. 1 T1-2019 と 97%の相同性を示した。さらに、*cox1* 遺伝子を標的とした種特異的検出プライマーを用いた定性 PCR において、*S. japonica* と *S. cf. tarandi* の *cox1* 遺伝子の増幅がみられた (図 2)。ウマ由来の *Sarcocystis* sp. は *S. fayeri* と同定された。

腸管ループ試験の結果、*S. fayeri* で 10^5 と 10^3 、北海道産シカ由来 *Sarcocystis* spp. で 10^5 、岩手県産シカ由来 *S. japonica* と *S. cf. tarandi* で 10^7 のブラディゾイト投与でループ内に液体貯留が認められた。一方、千葉県産シカ由来 *Sarcocystis* spp. は最大 10^6 の投与でも液体貯留を認めなかった。FA 値は、*S. fayeri*: 10^5 ; 0.67、 10^3 ;0.58、北海道産シカ由来 *Sarcocystis* spp.: 10^5 ;0.29、岩手県産シカ由来 *S. japonica*・*S. cf. tarandi*: 10^7 ;0.16 であった。

D 考察

ウマ寄生 *S. fayeri* シストでは最小量 10^3 で液体貯留を示した。一方、北海道に生息するエゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属では 10^5 、岩手県に生息するニホンジカ寄生 *S. japonica* と *S. cf. tarandi* では 10^7 bradyzoites で液体貯留を示した。しかし、千葉に生息するニホンジカ寄生の

Sarcocystis 属では、 10^6 以下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。

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内容物および粘膜面に充出血が認められたが、シカ寄生 *Sarcocystis* 属シストで液体貯留を示したサンプルでは内容物、腸管内腔粘膜面ともに充出血は認められなかったことから、エゾシカ寄生 *Sarcocystis* と *S. fayeri* は異なる毒性を持つことが推察される。

シカに寄生する *Sarcocystis* 属でも、エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属は 10^3 で液体貯留を起こした一方、岩手県生息のニホンジカに寄生していた *S. japonica* と *S. cf. tarandi* では 10^7 bradyzoites を必要としたこと、また、千葉に生息する野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属では 10^6 でも液体貯留を示さなかったことから、異なる地域の野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属種の間でも毒性に相違がある可能性が考えられる。

その原因として、地域の違いによる宿主の違い、または *Sarcocystis* 種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. tarandi* が発見された。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。千葉の野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属では (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。

【参考文献】

Aoki K, Ishikawa K, Hayashi K, Saito M, Sugita-Konishi Y, Watanabe M and Kamata Y. (2013). An Outbreak of Suspected Food Poisoning Related to Deer Meat Containing *Sarcocystis* Cysts. Jpn. J.

- Food Microbiol. **30**(1): 28-32. (in Japanese.)
- Aoki K, Hayashi M, Kouno T, Umehra S, Sakaguchi H, Washida K and Ishikawa K. (2017). An Outbreak of Suspected Food Poisoning Related to Consumption of Undercooked Deer Meat in Shiga Prefecture. Jpn. J. Food Microbiol. **34**(3): 166-169. (in Japanese.)
- Ota T, Nakano Y, Mizuno T, Shiozaki A, Hori Y, Yamanashi K, Hayakawa K, Hayakawa T, Fujimoto T, Nakamoto C, Maejima K, Wada Y, Terasoma F and Ohnisi T. (2019). First Case Report of Possible *Sarcocystis truncata*-induced Food Poisoning in Venison. Internal Medicine. **58**: 2727-2730.
- 中本 有美, 海野友梨, 深谷節子 (2017). 鹿肉が原因食品と疑われた有症事例について. 茨城衛生研究所年報. No. **55**: 33-36.
- 木村 裕亮 (2016). 国内野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* spp. の宿主生息地域における疫学的相違の解析. 岩手大学獣医公衆衛生学研究室卒業論文
- 永澤 アルミン (2017). 国内野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の腸管病原性解析. 岩手大学獣医公衆衛生学研究室卒業論文
- 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.
- 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
- 谷田 奈津美 (2019). ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属の腸管病原性解析. 岩手大学獣医公衆衛生学研究室卒業論文
- Abe N, Matsuo K, Moribe J, Takashima Y, Baba T and Gjerde B. (2019a). Molecular differentiation of five *Sarcocystis* species in sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (*coxI*) sequences. Parasitology Research. **118**: 1975-1979.
- Abe N, Matsuo K, Moribe J, Takashima Y, Irie T, Baba T and Gjerde B. (2019b). Morphological and molecular characteristics of seven *Sarcocystis* species from sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan, including three new species. IJP: Parasites and Wildlife. **10**: 252-262.
- 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 yesoensis*) in Hokkaido, Japan. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. **18**: 100327.

E. 結論

野生ニホンジカおよびウマ食用肉由来の住肉胞子虫はどちらも腸管毒性を有するが、種によっては毒性が確認できないものもある。毒性は腸管内に液体貯留を起こすものであるが、*S. fayeri* にのみ出血が認めら

れ、種によって異なる毒性であることが考えられる。また、毒性発現摂取量も種によって異なる可能性がある。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamazaki A., Hiroshima, T., Yamaguchi, Y., Shirafuji, Y., Taira, K., Saito, M., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., and Kamata, Y. (2020)

Presence of *Sarcocystis sybillensis* in Japanese sika deer (*Cervus nippon*) captured in its native territory and its phylogenetic relationship with *Sarcocystis nipponi*. Parasitol Res. **119** 7 2309-2315.

Yamazaki A., Shirafuji, Y., and Kamata, Y. (2020)

Establishment of a Novel Molecular Detection Method for *Sarcocystis* in Venison. Foodborne Pathog Dis. **18** 2 104-113.

Irie, T., Uruguchi, T., Ito, T., Yamazaki A., Takai, S., and Yagi, K. (2020)

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 2020年4月

Sato, H, Hiraya H., Sugiyama, T., Fukumoto, S., Matsuyama, R., Yanagawa, Y., Nakao, R., Irie, T., Taira, K., Yamazaki A., Hagiwara, K., Yoshida, A.,

Kamata, Y., and Ichikawa-Seki, M. (2021)

Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1. Parasitol Int. **80** 102222.

2. 学会発表

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

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 住肉孢子虫の腸管毒性研究

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

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 2 6 日、岩手大学、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* の腸管病原性解析

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

第 163 回日本獣医学会学術集会、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* に対する細胞応答の解析

日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回

学術講演会、*Sarcocystis* spp. の腸管毒性の比較検討

令和2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、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. その他

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

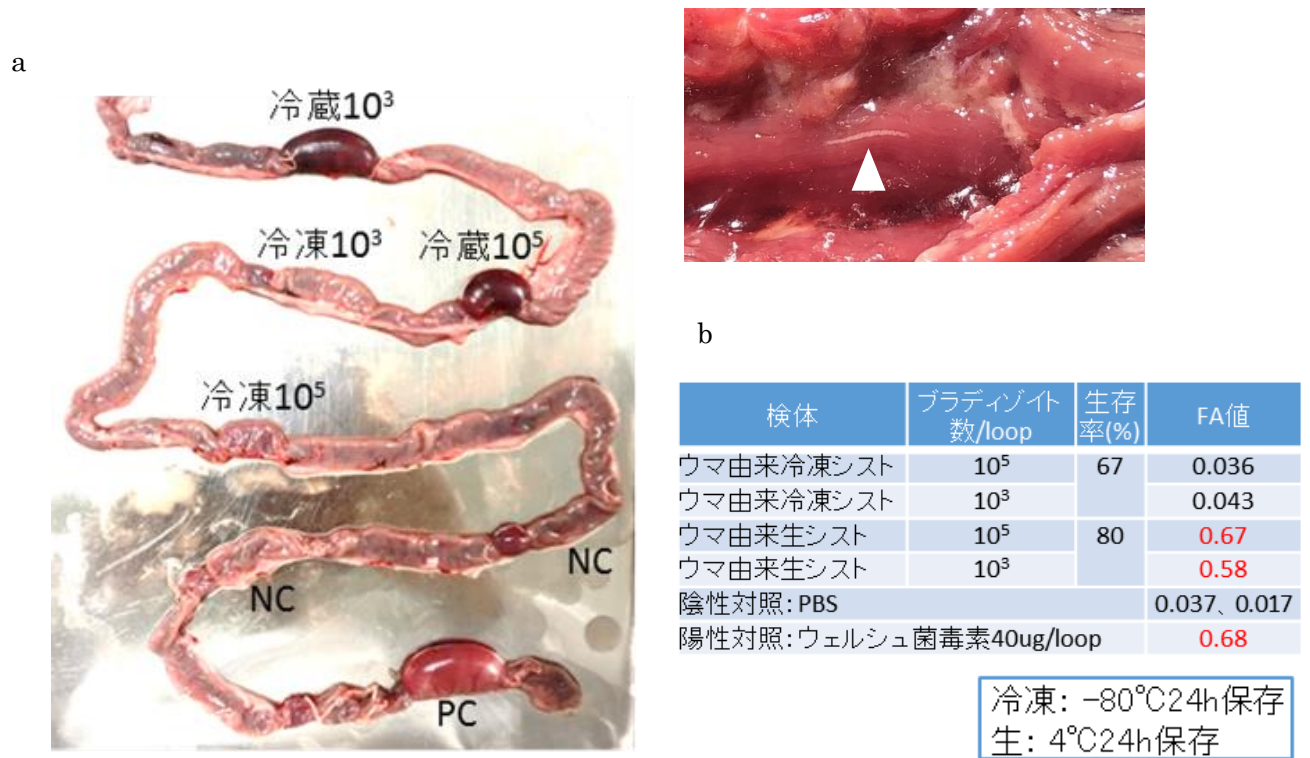


図1
a 冷凍および冷蔵ウマ由来 *Sarcocystis* 属シストを用いたウサギ腸管ループ試験
b ウサギ腸管ループ試験に用いたブラディゾイト数、生存率および FA 値

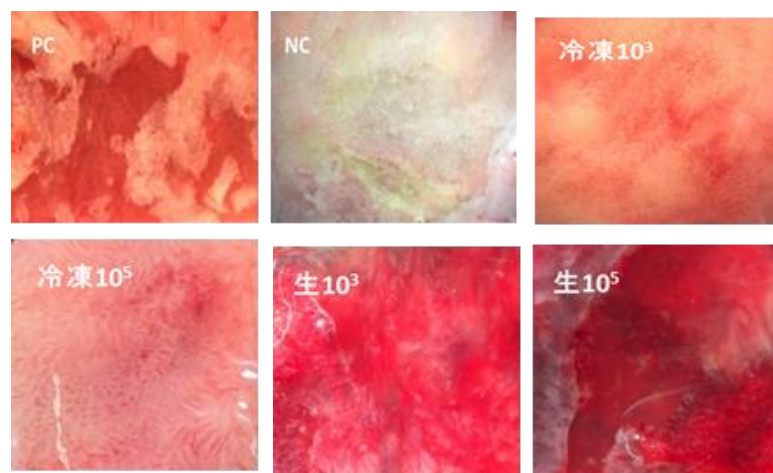


図2
冷凍および冷蔵ウマ由来 *Sarcocystis* 属シストを用いたウサギ腸管ループ試験
腸管内側の観察像

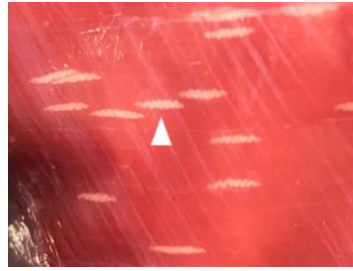


図1 シカ骨格筋組織中の *Sarcocystis* 属シスト (白矢印)

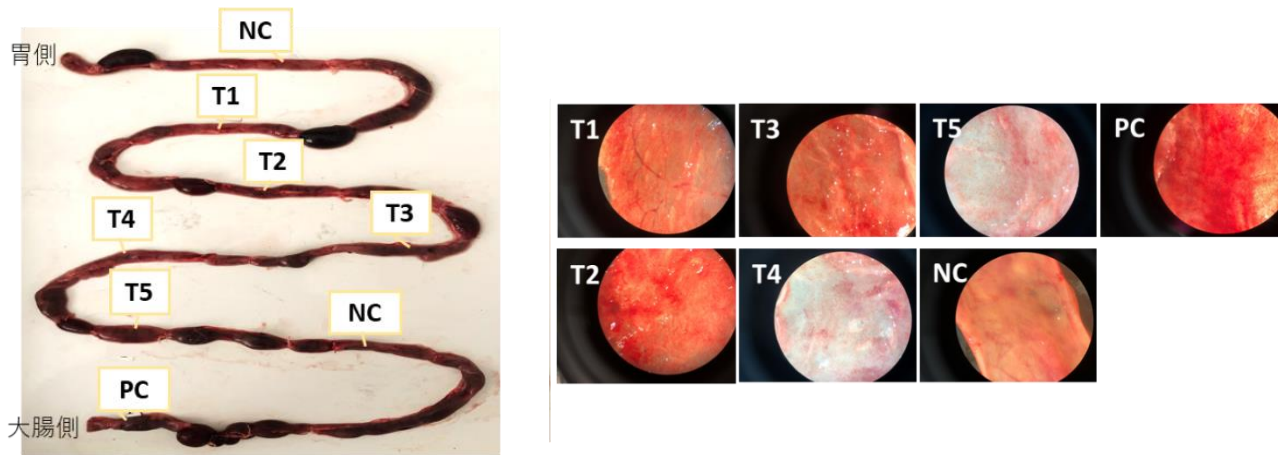


図3 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液投与ウサギ腸管ループ試験結果

(a) 腸管全体像, (b) ループ内腔の実体顕微鏡像 (10倍拡大像)

T1 : 10^3 bradyzoites/loop, T2 : 10^4 bradyzoites/loop, T3 : 10^5 bradyzoites/loop,

T4 : 10^6 bradyzoites/loop, T5 : 10^7 bradyzoites/loop

NC : PBS, PC : 組換えウェルシュ菌毒素 20 μ g/loop

表2 シカ寄生 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ腸管ループ試験結果

番号	ブラディゾイト数 (bradyzoites/loop)	貯留物重量 (g)	ループ長 (cm)	FA 値
T1	10^3	0.44	6.9	0.064
T2	10^4	0.47	5.4	0.087
T3	10^5	0.55	5.8	0.095
T4	10^6	0.38	5.1	0.075
T5	10^7	0.59	3.6	0.164
PC	組換えウェルシュ菌毒素 20 μ g/loop	0.28	4.1	0.069
NC	PBS	0.33	5.5	0.055

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）

総合研究報告書

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

Sarcocystis 属原虫の冷凍処理による毒性の低減の検討

研究要旨

Sarcocystis 属の腸管毒性について、冷蔵および冷凍による影響を、ウサギを用いた腸管ループ試験(in vivo 試験)にて確認した。その結果、ウマ由来 *Sarcocystis*、シカ由来 *Sarcocystis* のどちらについても、 -80°C での冷凍保存試料では、最多 10^7 シストを投与したループ内でも液体貯留が認められなかった。 4°C 冷蔵シストを用いた場合、 10^3 、 10^7 シストの投与で液体貯留が認められなかったことを考えると、 -80°C の冷凍処理により、*Sarcocystis* 属が持つ腸管毒性が著しく低減されたことが考えられた。

A. 研究目的

Sarcocystis 属の毒性についてはこれまでに冷凍処理により失活できるという報告がある。馬肉に寄生する *S. fayeri* については既に冷凍処理の後流通する通知が発令されている。しかし、冷凍処理による毒性消失の根拠は乏しく、色素試験の報告にとどまっている。本研究は、*Sarcocystis* 属が確実に毒性を失活する冷凍条件を明らかにするため、いくつかの冷凍処理を施したウマ寄生性の *S. fayeri*、北海道エゾシカ寄生性の *Sarcocystis* sp. を用いたウサギ腸管ループ試験を行った。

B. 研究方法

本研究の供試験体として、カナダ産ウマおよび北海道エゾシカの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを分離し、BioMasher

II (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。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、投与数を調整してウサギ腸管ループ試験に用いた。ブラディゾイトの生存率は、トリパンプルーを用いた色素試験で行った。 $10\ \mu\text{L}$ 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。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は前項と同様の手順で行った。

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色素試験の非染色率結果は、4°C12~48時間の保存では80~100%、-20°C12時間保存で100%、-80°C24時間保存で67%、72時間保存で0%であった。腸管ループテストは、ウマ由来、シカ由来ともに、4°Cで保存したブラディゾイト 10^3 10^5 10^7 の投与のみで液体貯留をみとめた(前項 図1)。-20°C、-80°Cの冷凍処理をしたものは、すべての保存時間についても液体貯留を起こさなかった。FA値は、ウマ由来 *S. fayeri* を4°C24時間保存したブラディゾイト 10^3 で0.58、 10^5 で0.67、シカ由来 *Sarcocystis* sp. のうち *S. japonica* と *S. cf. tarandi* を4°Cで保存したブラディゾイト 10^7 で0.16、北海道産 *Sarcocystis* sp. 10^5 で0.29であった。-80°Cで72時間冷凍した北海道産 *Sarcocystis* sp. 10^5 は液体貯留を起こさなかった。

D. 考察

本研究において、ウマ由来 *Sarcocystis* 属シストを-80°Cや-20°Cで12~24時間保存した場合、色素試験は67~100%の非染色となり、4°Cで24時間保存した場合の80%と大差ないことが分かった。この非染色80%の4°C24時間保存 *S. fayeri* ブラディゾイトは 10^3 の投与で顕著な出血性液体貯留をおこしたことから、感染能を保持し生存を

持続していると考えられる。だが、生存率67%、100%である-80°C24時間、-20°C12時間保存のブラディゾイトは100倍量の 10^5 を投与しても腸管に液体貯留、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は独立しており、最速-20°C12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。-80°C72時間の保存で非染色率が0%となり、腸管ループ試験陰性となるが、上記のように非染色率が比較的高い数値でも毒性は失われたため、非染色率と毒性の消失は強く関連しないと考えられる。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に行っている [Honda et al., 2018]。しかし、本研究では非染色率が高いにも関わらず、ウサギ腸管ループ試験で液体貯留を示さなかったため、*Sarcocystis* 属、特に *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。

【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.

E. 結論

Sarcocystis 属原虫の腸管毒性はトリパンプルーを用いた色素試験の非染色率と強く関連しない。細胞膜の破壊がおこらずとも冷凍処理により毒性の発現が抑えられる可能性がある。実験上では最速-20°C12時間で *S. fayeri* の腸管毒性が失活した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

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

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

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

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 (予定を含む。)
寄生 *Sarcocystis. fayeri* の腸管毒性解析 1. 特許取得
最優秀賞受賞対象・辞退 2. 実用新案登録

3. その他

H. 知的財産権の出願・登録状況

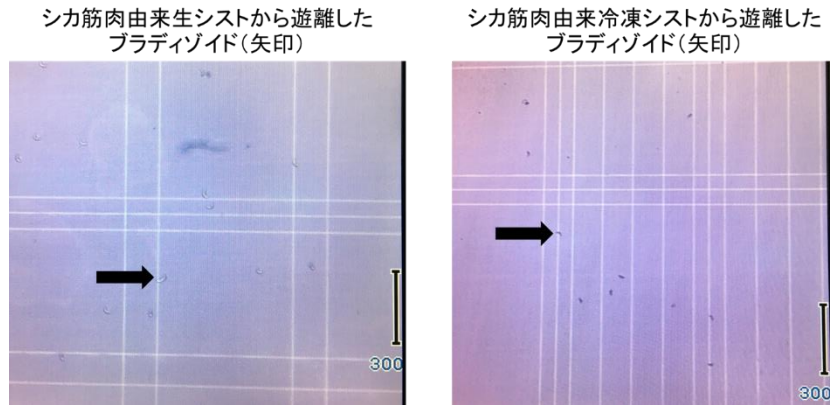


図1. ブラディゾイドのトリパンプブルーを用いたダイテスト像

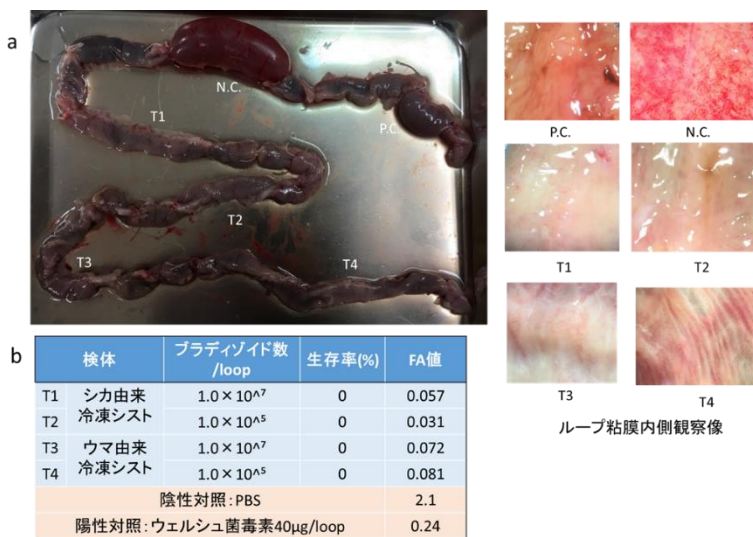


図2. a. ウサギ腸管ループ試験結果 (一回目)
b. ウサギ腸管ループ試験使用検体と FA 値

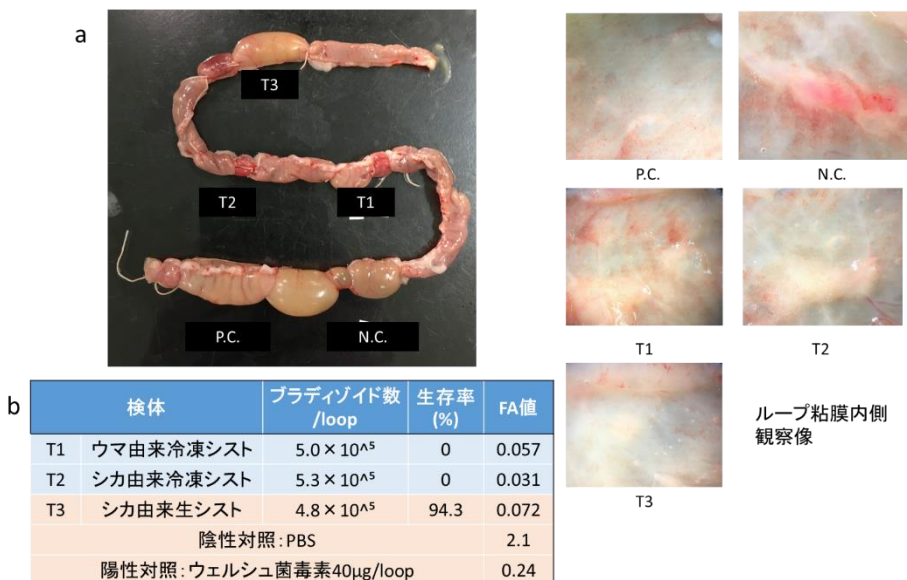


図3. a. ウサギ腸管ループ試験結果 (二回目)
b. ウサギ腸管ループ試験使用検体と FA 値

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）

総合研究報告書

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

Sarcocystis 属原虫の毒性タンパク質の検出および同定

研究要旨

Sarcocystis 属のシストが保有する腸管毒性タンパク質について同定を試みた。水溶性虫体タンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量依存的に分画し、それぞれの分画をウサギ腸管ループ試験に用いた。その結果、10～250 kDa に分布するタンパク質のうち、15kDa、15～25kDa のタンパク質を含む分画でループ内に液体貯留が認められた。既にアクチン脱重合因子と同定されている 15kDa の他に今回新たに発見された毒性候補タンパク質について、15～25kDa 分画内のタンパク質をアミノ酸配列解析したところ、推定ヒスタミン放出因子と同定された。ウマ由来、シカ由来の *Sarcocystis* 属原虫のどちらについても同じ結果であったため、この腸管毒性候補タンパク質は *Sarcocystis* 属に共通して保有される可能性が考えられる。

A. 研究目的

これまでにウマ寄生 *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。また、ニホンジカ寄生の *Sarcocystis* 属原虫については虫体由来タンパク質の毒性因子解析そのものも行われていない。そこで本研究では、ウマおよびニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属原虫の 15kDa タ

ンパク質、およびそれ以外の虫体タンパク質の腸管毒性を検証した。

B. 研究方法

ゲル濾過クロマトグラフィー法による *Sarcocystis* 属シストタンパク質の分画
凍結融解による *Sarcocystis* 属シスト水溶性成分の回収
カナダ産ウマおよび岩手県産ニホンジカの骨格筋から *Sarcocystis* 属シストを 200～1,500 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 II（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。試料から DNA 核

酸を抽出し、18S rRNA、*cox1* のダイレクトシーケンシングによって種を同定した。

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 およびウエスタンブロットでタンパク質分画の状態を確認した。ウエスタンブ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。SDS-PAGE でバンドが確認されたフラクションを分子量ごとに >25 kDa 分画、17~50 kDa 分画、15~37 kDa 分画、15 kDa 分画、<15kDa 分画に分け、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 10K (Merck) を用いて濃縮した。以上のサンプルを用いて、ウサギ腸管ループ試験を実施した。腸管ループ試験で液体貯留が見られた分画に含まれる約 19~26 kDa のタンパク質について、それぞれ nano-LC/MS/MS によりタンパク質同

定を行った。

C. 研究結果

カナダ産ウマの骨格筋組織から分離したシストは *S. fayeri* と同定された (相同性 100%)。ゲルろ過クロマトグラフィーにてウマ寄生 *S. fayeri* 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から、>25 kDa、20-75kDa、15-25kDa (15kDa 含む)、<15kDa の 4 つの領域を腸管ループ試験に供した。試験結果においては、20-75kDa、15-25kDa (15kDa) の分画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、>25 kDa 領域で 0.08、20-75kDa 領域で 0.30、15-25kDa (15kDa) で 0.20、<15kDa 領域で 0.07 であった (図 3a、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。また、同じく *S. fayeri* ブラディゾイト由来水溶性タンパク質分画を用いたウサギ腸管ループ試験において、実体顕微鏡の観察により >25 kDa 分画投与ループに出血および微絨毛の腫脹を認めた。この個体での FA 値は >25 kDa 分画で 0.050、17~50 kDa 分画で 0.031、15~37 kDa 分画で 0.036、15 kDa 分画で 0.010 であった。陽性対照では 0.440、陰性対照では 0.018 を示した。

岩手県産ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属原虫は *S. japonica* と *S. cf. tarandi* と同定された。ウサギ腸管ループ試験における FA 値は、>25 kDa 分画で 0.118、17~50 kDa 分画で 0.524、15~37 kDa 分画で 0.591、15 kDa 分画で 0.1 を

示した。陽性対照は0.24, 陰性対照は0.075であった(表1)。実体顕微鏡下で各ループの内腔粘膜を観察したところ, 17~50 kDa 分画投与ループおよび 15~37 kDa 分画投与ループで微絨毛が確認できず, 菲薄化していた。充出血は認められなかった。(図3)。

アミノ酸配列解析の結果、腸管ループ内に液体貯留が見られた15~25 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

S. fayeri 原虫の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。前項「ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の腸管毒性発現量の比較」にて示された、ブラディゾイトを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、タンパク質を分画して投与した本実験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。

同じく *S. fayeri* 原虫の虫体タンパク質を投与した別個体では>25 kDa 分画投与ループにて液体貯留値は低いものの腸粘膜の著しい充出血と血様の貯留物を認め、実体顕微鏡観察下で出血と微絨毛の腫脹を認めた。一方で、17~50 kDa 分画, 15~37 kDa 分画, 15 kDa 分画, つまり腸管毒性因子を含んだ分画を投与したループ全てで液体貯留を認めなかった。陽性対照投与ループでは高い液体貯留値を示したことから、被験体には *S. fayeri* のもつ腸管毒性因子に起因する下痢を発症しない一方、出血を起こす個体が存在し、その出血因子が>25 kDa 分画に含まれる可能性が示唆された。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。

本研究室で実施してきた *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液およびブラディゾイト由来水溶性タンパク質分画を用いたウサギ腸管ループ試験においても、非出血性液体貯留, 出血性液体貯留を認めた個体がいた[山口, 2018, 谷田, 2019]。したがって、ウサギにおいては下痢毒性因子に反応する個体, 出血因子に反応する個体, どちらにも反応する個体が存在すると推察される。また、馬刺し喫食による食中毒の主要症状は下痢, 嘔吐, 腹痛などで[Saito, 2012], 血便の報告はみられない。以上のこと

から、ヒトでは下痢を起こさず出血のみが起こった場合には自覚症状がないため、症例報告されないが、下痢等の発症有無に関わらず、腸管内において出血が起こっている可能性が考えられる。

液体貯留が見られた 15~50 kDa 分画および 15 kDa 分画において含まれる約 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* シストを摘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、*Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性は 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、*Sarcocystis* 属原虫により誘発されていることを確かめるには、腸管ルーブ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、ウサギ腸管ルーブ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、*Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性に関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、*Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性は複数の腸管毒性因子に関わる可能性が考えられることか

ら、>25kDa 分画内に含まれる可能性のある出血因子、HRF、ADF 単独とこれらを合わせた場合の腸管毒性の作用を明らかにする必要がある。

E. 結論

ウマ由来 *S. fayeri* およびシカ由来 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* は既知の毒性因子タンパク質 15kDa (ADF) 以外に 19kDa のタンパク質 (putative histamine-releasing factor; pHRF) を持つ可能性が示唆された。*Sarcocystis* に引き起こされる腸管毒性にヒスタミンが関与しており、アレルギー症状のひとつである可能性がある。

また、*S. fayeri* によって引き起こされる空回腸の出血性貯留の出血因子は液体貯留を起こす因子とは別であり、25kDa 以上の分子量分画に存在する可能性が示された。

【参考文献】

谷田 奈津美 (2019). ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属の腸管病原性解析. 岩手大学獣医公衆衛生学研究室卒業論文

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).

山崎朗子 (2019-2021)

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 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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamazaki A., Hiroshima, T., Yamaguchi, Y., Shirafuji, Y., Taira, K., Saito, M., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., and Kamata, Y. (2020)

Presence of *Sarcocystis sybillensis* in Japanese sika deer (*Cervus nippon*) captured in its native territory and its phylogenetic relationship with *Sarcocystis nipponi*. Parasitol Res. **119** 7 2309-2315.

Yamazaki A., Shirafuji, Y., and Kamata, Y. (2020)

Establishment of a Novel Molecular Detection Method for *Sarcocystis* in Venison. Foodborne Pathog Dis. **18** 2 104-113.

Irie, T., Uraguchi, T., Ito, T., Yamazaki A., Takai, S., and Yagi, K. (2020)

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 2020年4月

Sato, H, Hiraya H., Sugiyama, T., Fukumoto, S., Matsuyama, R., Yanagawa, Y., Nakao, R., Irie, T., Taira, K., Yamazaki A.,

Hagiwara, K., Yoshida, A., Kamata, Y., and Ichikawa-Seki, M. (2021)

Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1. Parasitol Int. **80** 102222.

2. 学会発表

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

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

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

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、平成30年度の事業内容報告

第163回日本獣医学会学術集会、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* に対する細胞応答の解析

日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会、*Sarcocystis* spp. の腸管毒性の比較

検討

(予定を含む。)

令和2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、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

1. 特許取得

なし

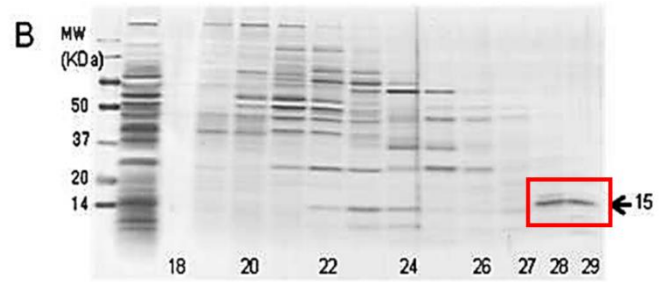
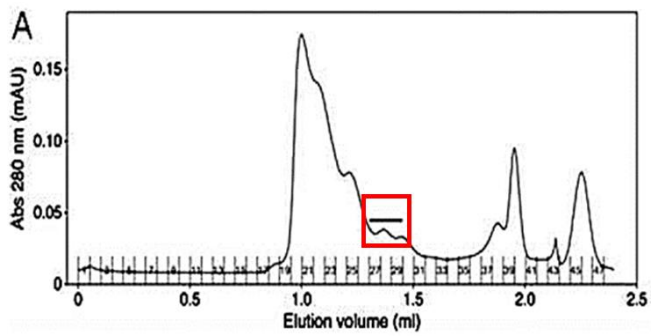
2. 実用新案登録

なし

3. その他

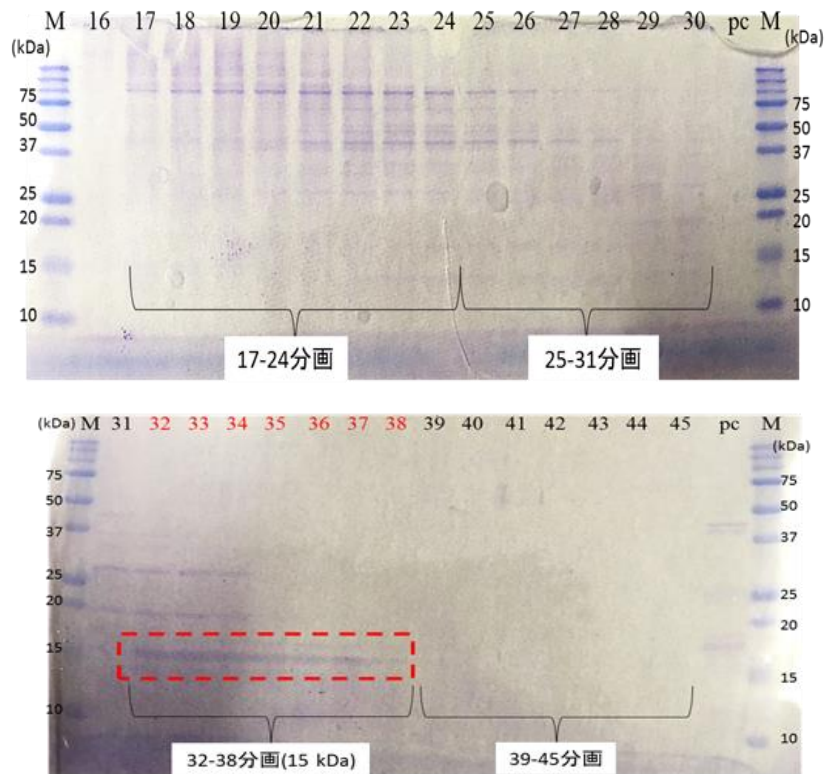
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況



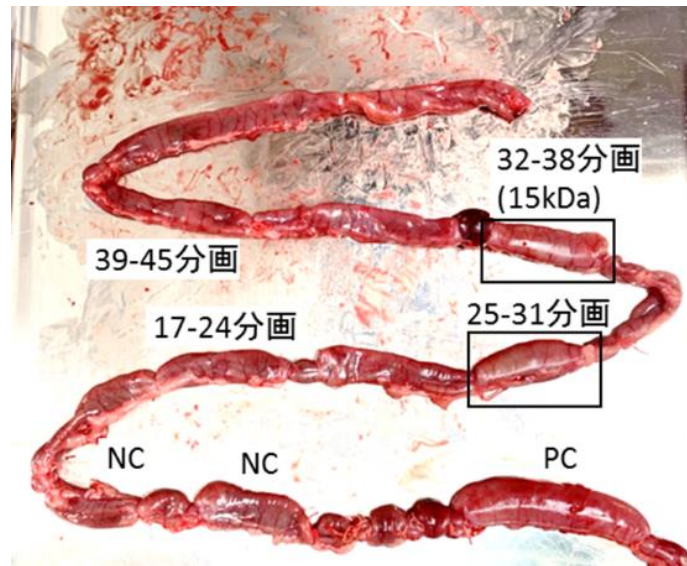
(J. Food Prot., Vol. 77, No. 5, 2014 から引用)

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。



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



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

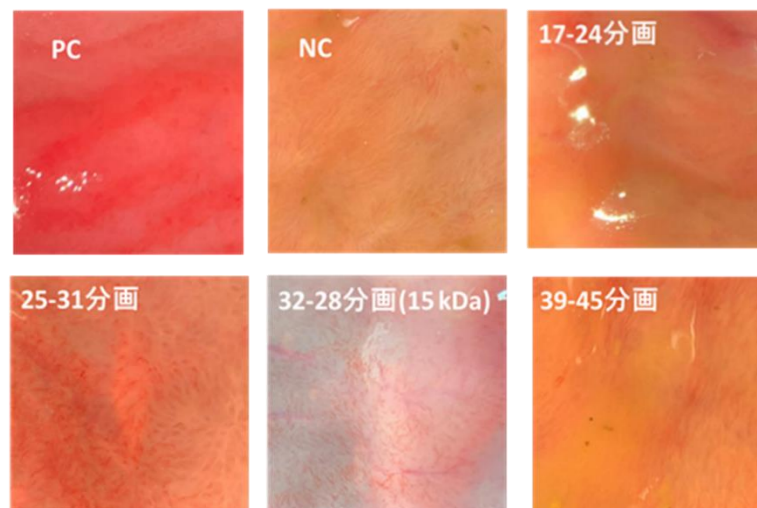


図4 ゲルろ過各分画を用いた腸管ループテスト結果
腸管ループ内側観察像

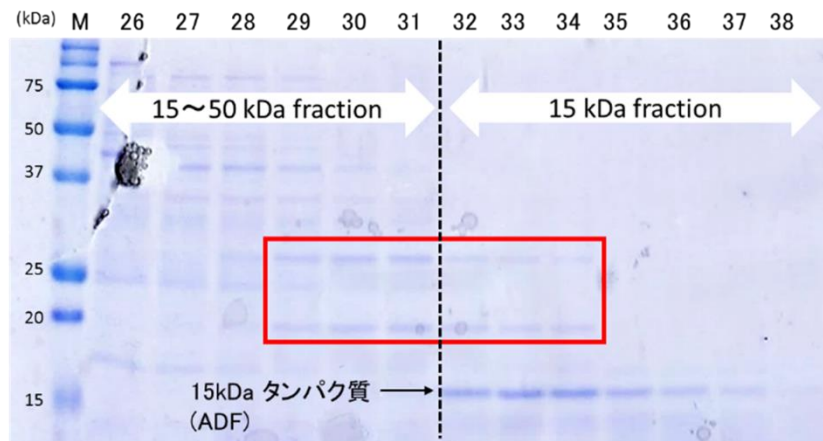


図5 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過分画の SDS-PAGE 像 (15~50 kDa 分画, 15 kDa 分画 フラクション 26-40)
2つの分画間にまたがって存在する約 26~19 kDa のタンパク質 (赤枠) について nanoLC-MS / MS を用いたアミノ酸シーケンシングを行った

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 **MAKEWGYADH** **NGPDHWHEFY** **PIAKGDNQSP** **IELHTKDIH** **DPSLKAWTAS**
51 **YDPGSAKTIL** **NGRTRCRVVF** **DDTYDRSMLR** **GGPLTAFYRL** **RQFHLHWGSS**
101 **DDHGSEHTVD** **GVKYAAELHL** **VHWNPKYNTY** **GGALKQPDGI** **AVVGVFLKIG**
151 **REKGEFQLFL** **DALDKIKTKG** **KEAPFTNFD** **SCLFPTCRDY** **WTYRGSFTTP**
201 **PCEECIVWLL** **LKEPITVSSD** **QVAKLRSLFS** **SAENEPPVPL** **VRNWRFPQFL**
251 **KGRVVRASFK**

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** **EVAFEVATKR** **IVKGAEDYGI**
51 **ADNSEEDGGG** **VDSTSETVVD** **VVDAFRLQET** **PFSKKEFGTY** **IKGYMQRVKG**
101 **HLEKNHPDRV** **DKFMGAQAL** **VKKILGQFDD** **FQFFLGESAD** **CEAGVVFAYY**
151 **KDGEAPRLI** **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6 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

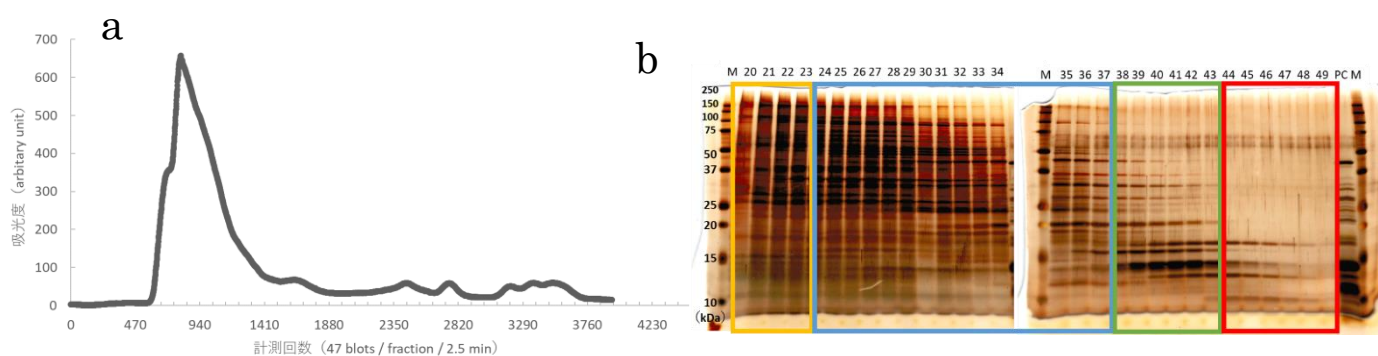


図1 .シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト由来タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー分画像

(a) UVモニター (b) 銀染色)

黄 : >25 kDa 分画 青 : 17~50 kDa 分画 (含 19 kDa) 緑 : 15~37 kDa 分画 (含 15, 19 kDa) 赤 : 15 kDa 分画

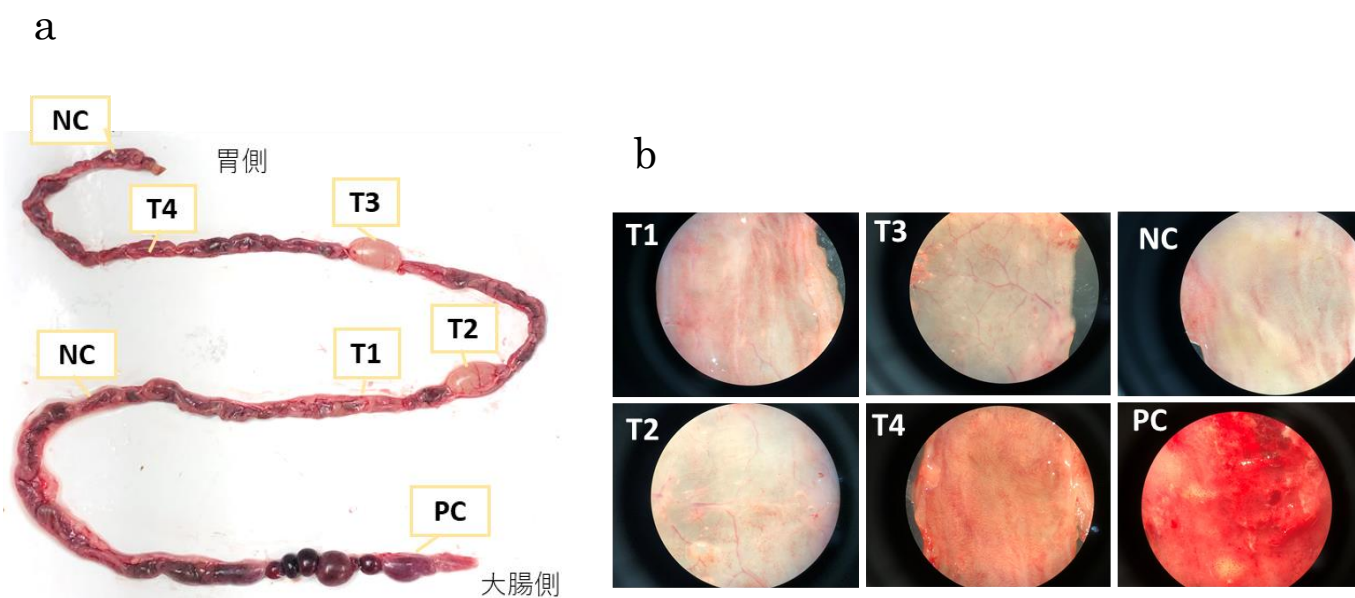


図3 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過クロマトグラフィー分画投与ウサギ腸管ループ試験結果

(a) 腸管全体像, (b) ループ内腔の実体顕微鏡像 (10倍拡大像)

T1 : >25 kDa 分画, T2 : 17~50 kDa 分画 (含 19 kDa), T3 : 15~37 kDa 分画 (含 15, 19 kDa), T4 : 15 kDa 分画

NC : PBS, PC : 組換えウェルシュ菌毒素 20 μ g/loop

M : 分子量マーカー, PC : 組換えシカ寄生 *Sarcocystis* 属 ADF (13.3 kDa)

表1 シカ寄生 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* 由来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

番号	サンプル	腸管毒性因子	貯留物重量 (g)	ループ長 (cm)	FA 値
T1	>25 kDa 分画	—	0.2	1.7	0.118
T2	17~50 kDa 分画	19 kDa (候補)	1.1	2.1	0.524
T3	15~37 kDa 分画	19 kDa (候補) +15 kDa	1.3	2.2	0.591
T4	15 kDa 分画	15 kDa	0.2	2.0	0.1
PC	組換えウェルシュ菌毒素	20 µg/loop	0.6	2.5	0.24
NC		PBS	0.15	2.0	0.075

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）
総合研究報告書
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

ウマ由来 *Sarcocystis* 属とシカ由来 *Sarcocystis* 属の経口毒性の検討

研究要旨

これまでに行った研究の結果、宿主の異なる *Sarcocystis* 属原虫の腸管毒性の相違点が明らかになったが、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。本研究では、同じくウサギを用いて *Sarcocystis* 属原虫の経口投与試験を行い、種による相違と共に腸管ループ試験結果との比較検討を行った。

A. 研究目的

住肉胞子虫が引き起こす下痢については、これまでに腸管ループテストでの確認が行われている。しかし、食中毒症状が発現する機序として、胃酸による化学的消化が毒性発現に何らかの影響を及ぼす可能性を考慮する必要がある。同様に、住肉胞子虫に関しても、先行研究において経口投与試験が行われている。*S. fayeri* ブラディゾイトをウサギに経口投与すると、 5.5×10^6 bradyzoites で食欲不振や沈鬱、軟便、 1.5×10^7 bradyzoites では水溶性の下痢、 5.5×10^7 bradyzoites では重篤な水溶性下痢から死亡し、小腸粘膜上皮に傷害が起こることが明らかになっている [Saito et al., , 2013]。しかし、シカ寄生 *Sarcocystis* 属では未検討であるため、本研究では、*S. fayeri* ならびにシカ寄生 *Sarcocystis* 属の経口摂取による病原性の解析を実施し、ウマ・シカ寄生 *Sarcocystis* 属の毒性を比較検討した。

B. 研究方法

カナダ産ウマと岩手県産ニホンジカ骨格筋から精密ピンセットを用いて *S. fayeri* と *S. japonica* および *S. cf. tarandi* のシストを回収し、ホモジナイズしてブラディゾイト懸濁液を 10^5 - 10^6 と 10^7 bradyzoites/mL に調製した。実験ウサギは日本白色種 (Slc:JW/CSK, 日本エスエルシー株式会社)、それぞれ 16 週齢・体重 2.6 kg, 17 週齢・体重 2.9 kg で、実験まで自由採食・採水とした。投与前の状態観察を行った後、ウサギを保定し、胃ゾンデを用いてブラディゾイト懸濁液を 1 mL 経口投与した。サンプルの投与後は、PBS を用いてフラッシュし、経時的に状態を観察した。

C. 研究結果

1. ウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験

1. 2.3×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 80%), 6.5×10^6 bradyzoites/mL (非染色率 92%) のウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイトを用いた経口投与の結果、どちらもウサギの状態および糞便に顕著な変化を認めなかった。

2. シカ寄生 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験

10^5 bradyzoites/mL (非染色率 97%) を投与した結果、20 時間後には、やや沈鬱状態となり、呼吸数の増加を認めた。糞便は通常通り固形であった (表 1, 図 1a, b)。投与 24 時間後は、沈鬱状態でやや冷感があり、飲水欲・食欲の低下、軟便を認めた (表 1, 図 1c, d)。投与から 46 時間後には動けるまで回復し、飲水していた。投与から 96 時間後には食欲も戻り、小ぶりだがほぼ通常の糞便を認めた (表 1, 図 1e, f)。

D. 考察

1. ウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験

S. fayeri ブラディゾイト 1.23×10^7 (非染色率 80%), 6.5×10^6 (非染色率 92%) の投与ではウサギの状態および糞便ともに、投与後に顕著な変化は認められなかった。

斉藤らが行った *S. fayeri* ブラディゾイト 5.5×10^6 , 1.5×10^7 および 5.5×10^7 bradyzoites/mL を用いたウサギ経口投与試験では、 5.5×10^6 bradyzoites/mL 投与ウサギでは、食欲・飲水の廃絶、沈鬱、軽度の軟便、 1.5×10^7 bradyzoites/mL 投与ウサギでは、上記に加えて水様性下痢が観察され、それぞれ 48 時間後までに回復したが、 5.5×10^7

bradyzoites/mL 投与ウサギでは、同様の症状を認めた後、48 時間までに全例死亡している [Saito et al., 2013]。

これらの結果から、経口投与における *S. fayeri* の最小発症量が 10^6 bradyzoites/mL であることが示唆された。しかし、先行研究で用いられたウサギは 10 週齢であったが、本研究に供試したウサギは 16 週齢および 17 週齢であったため、年齢や体の大きさ、個体差などの違いで症状が観察されなかった可能性が考えられる。

2. シカ寄生 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験

S. japonica および *S. cf. tarandi* ブラディゾイトを 10^7 (非染色率 97%) 程度投与したところ、投与 20 時間後にはやや沈鬱状態を示し、投与 24 時間後には沈鬱状態でやや冷感、飲水欲・食欲の低下、軟便を認め、投与から 46 時間後には動けるまで回復した。今回の結果は、過去の研究において 1.5×10^7 bradyzoites/mL の *S. fayeri* ブラディゾイトを経口投与したウサギと類似の症状を示していた [Saito et al., 2013]。このことから、今回採取した *S. japonica* および *S. cf. tarandi* には消化作用を受けての腸管毒性がある可能性が示唆された。しかしながら、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* は、シカの生息域によって優勢種が異なることが報告されている [Abe et al., 2019, Irie et al., 2019, 廣嶋, 2018]。したがって、今後はニホンジカの生息域やその地域における優勢種を考慮に入れて解析することで、種による毒性の相違を明らかにする必要がある。

参考文献

Saito M, Arai Y, Kamata Y, Konishi Y and Hashimoto K. (2013). Diarrheagenicity of *Sarcocystis fayeri* in Rabbits. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. **66**: 813-815. (in Japanese.)

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 yesoensis*) in Hokkaido, Japan. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports. **18**: 100327.

Abe N, Matsuo K, Moribe J, Takashima Y, Baba T and Gjerde B. (2019a). Molecular differentiation of five *Sarcocystis* species in sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (*coxI*) sequences. Parasitology Research. **118**: 1975-1979.

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

E. 結論

本研究ではウマ寄生の *S. fayeri* を 10^5 ブラディゾイト経口投与では、ウサギの状態および糞便に変化は認められなかった。既報とも合わせ

ると、*S. fayeri* が腸管毒性を発症させる最小経口投与量が 10^6 程度であることが示唆された。シカ寄生の *S. japonica* および *S. cf. tarandi* では経口投与による腸管毒性が認められ、その最小発症量は 10^7 ブラディゾイトであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamazaki A., Hiroshima, T., Yamaguchi, Y., Shirafuji, Y., Taira, K., Saito, M., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., and Kamata, Y. (2020)

Presence of *Sarcocystis sybillensis* in Japanese sika deer (*Cervus nippon*) captured in its native territory and its phylogenetic relationship with *Sarcocystis nipponi*. Parasitol Res. **119** 7 2309-2315.

Yamazaki A., Shirafuji, Y., and Kamata, Y. (2020)

Establishment of a Novel Molecular Detection Method for *Sarcocystis* in Venison. Foodborne Pathog Dis. **18** 2 104-113.

Irie, T., Uraguchi, T., Ito, T., Yamazaki A., Takai, S., and Yagi, K. (2020)

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 2020年4月

Sato, H, Hiraya H., Sugiyama, T., Fukumoto, S., Matsuyama, R., Yanagawa, Y., Nakao, R., Irie, T., Taira, K., Yamazaki A.,

Hagiwara, K., Yoshida, A., Kamata, Y., and Ichikawa-Seki, M. (2021)
Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1. *Parasitol Int.* **80** 102222.

2. 学会発表

第 163 回日本獣医学会学術集会、ウマ寄生 *Sarcocystis. fayeri* に対する細胞応答の解析

日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会、*Sarcocystis* spp. の腸管毒性の比較検討

令和 2 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、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

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



図1 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験結果
 (a) 投与 20 時間後, (b) 投与 20 時間後糞便, (c) 投与 24 時間後, (d) 投与 24 時間後糞便,
 (e) 投与 96 時間後, (f) 投与 96 時間後糞便

表1 シカ寄生 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* 属ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験

時間	症状
投与 20 時間後	やや沈鬱, 呼吸数の増加, 通常の糞便
投与 24 時間後	沈鬱, やや冷感, 飲水欲・食欲の低下, 軟便
投与 46 時間後	動けるまで回復, 飲水あり
投与 96 時間後	食欲の回復, 小ぶりだが通常の軟便

*Sarcocystis*属原虫による細胞傷害性およびサイトカイン産生誘導の解析

研究要旨

Sarcocystis 属原虫の腸管毒性候補タンパク質について、既報の 15kDa タンパク質 (ADF: アクチン脱重合因子) と異なる新規候補タンパク質 HRF (ヒスタミン放出因子) が確認された。このことから、*Sarcocystis* 属原虫による下痢はアレルギー反応である可能性が示唆される。このことを確認するため、*Sarcocystis* 属原虫ブラディゾイトを用いた細胞刺激実験を行った。その結果、L929 線維芽細胞への直接敵刺激に対して細胞傷害は認められなかった。一方、U937 マクロファージへの刺激に対しては、インターロイキンよりも MIP、MCP、IL-8、RANTES 等のケモカインが多く産生された。このことから、*Sarcocystis* 属に引き起こされる腸管毒性にはアレルギーの関連が示唆された。これまでの *in vivo* 試験による腸管毒性比較においては、ウマ寄生 *Sarcocystis* 属の方がシカ寄生 *Sarcocystis* 属より強い腸管毒性を示したが、サイトカイン産生に関してはシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトによる刺激の方がウマ寄生 *Sarcocystis* 属原虫ブラディゾイトによる刺激よりも倍以上のサイトカインを誘導した。この生体反応と細胞反応の相違点については、今後さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

ウシ寄生種である *Sarcocystis cruzi* の有する 15~16 kDa タンパク質はウサギに対する致死毒性をもつが [Saito et al., 1995], このタンパク質を含むシスト抽出物をウサギに皮下接種することで炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor- α , 以下 TNF- α) が血中で上昇するという報告 [Nakamura et al., 1999] や、培養マクロファージ細胞の TNF- α 放出を誘導するという報告がある [Fayer et al., 1988]。 *S. fayeri* においても、各種濃度の組換え 15 kDa タンパク質 (recombinant ADF, 以下 rADF) で刺激した RAW264 細胞培養上清を加えた培養線維芽細胞 (L929) の生存率が用量依存的に減少することがわかり、rADF が培養マクロファ-

ージ細胞の細胞毒性物質生産を誘導している可能性が示された [Irikura et al., 2017]。さらに、rADF を RAW264 細胞に曝露した後 RT-PCR を行ったところ、TNF- α 遺伝子が発現したと報告されている [Irikura et al., 2017]。このことから、摂取された *S. fayeri* シストから放出されたブラディゾイトが、組織に侵入することなく腸管腔内で消化され、ADF 分子を放出し、これが腸管組織に吸収されると細胞毒性シグナルが誘導されることによって腸管腔内の体液蓄積が誘発される、という一連の流れが *S. fayeri* による食中毒症状のメカニズムであると考えられている [Irikura et al., 2017]。

しかしながら、ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトによる細胞傷害性や、TNF- α 以外のサイトカイン発現誘導

に関する解析は行われていない。

そこで本研究では、ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトによる細胞への物理的・化学的傷害の解析、誘発されるサイトカインの比較検討を行った。

B. 研究方法

1. ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いた L929 細胞刺激試験

L929 細胞は、10%ウシ血清 (Fetal bovine serum, 以下 FBS) (Corning), ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (以下 P/S) (Sigma-Aldrich) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 以下 DMEM) (Sigma-Aldrich) を用いて、細胞培養用 12 well プレート (TrueLine) に 1.0×10^5 cells/mL になるよう播種し、37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。

ウマおよびニホンジカの骨格筋組織から、50 個の *Sarcocystis* 属シストを PBS 中に回収し、4°C, -20°C で約 12 時間保存した。その後、BioMasher II (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。前項と同様にトリパンブルーを用いてブラディゾイト色素試験を行った。

また、PBS 中に回収した 50 個のシストを 4°C で約 12 時間保存し、凍結融解操作を 5 回繰り返した後、BioMasher II (ニッピ) を用いてホモジナイズし、 $10,000 \times g$, 20°C で 10 分間遠心分離して上清を回収した。

12 well プレートに播種した L929 細胞に、ブラディゾイト懸濁液を Multiplicity of Infection (MOI) 1 および 10 で、シスト凍結融解上清を最終濃度 1/100 にて添加し、経時的に

顕微鏡下で観察を行った。このとき、試料を培地に直接添加したウェルと、12 well 用 Millicell Hanging Cell Culture Insert (Merck) に添加したウェルの 2 種類に分けた (図 1)。

2. ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いた U937 細胞刺激試験

U937 細胞は、10% FBS, P/S を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich) を用いて、37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。細胞培養用 12 well プレートに 1.0×10^5 cells/mL になるよう播種し、Phorbol 12-myristate 13-acetate (以下 PMA) (AdipoGen) を 1 ウェルあたり 40 ng/mL 添加してマクロファージへと分化させた。PMA 添加から 24 時間後に、各ウェルの培地を無血清 RPMI-1640 培地へ交換した。

ウマおよびニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液ならびにシスト凍結融解上清の調製は 1. と同じ手法で実施した。

12 well プレートに播種した U937 細胞に、ブラディゾイト懸濁液を MOI 1 あるいは 10 で、シスト凍結融解上清は、濃度が 1/100 となるように添加した。陰性対照には無血清 RPMI-1640 培地を用いた。添加から 24 時間後に顕微鏡下で観察した後、培養上清を回収し、-20°C で保存した。

回収した U937 細胞の培養上清を Quantibody Human Cytokine Array 1 (RayBiotech) のプロトコルに従って処理した。アレイスライドのスキニングおよび画像データ解析はフィルジェン株式会社に委託した。

C. 研究結果

1. ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いた L929、U937 細胞刺激試験

ウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイトおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトのどちらかで刺激しても、インサートの有無や MOI に関わらず、24 時間後までに顕著な変化を認めなかった (図 2a, b, 3a, b 図 4a, b, 5a, b)。

2. ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いた U937 細胞由来サイトカインの測定

U937 細胞の培養上清中のサイトカインを測定した結果、ウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイト添加培養上清では、4°C および -20°C 保存ブラディゾイト添加培養上清のどちらにおいても、MIP-1 α 、MMP-9、RANTES、VEGF の分泌増加、IFN- γ の分泌減少を認めたが、IL-6、IL-12、TNF- α は検出されなかった (図 6a, b)。また、4°C 保存ブラディゾイト添加培養上清において IL-8 の分泌増加および IL-10 の分泌減少を認めた (図 6a, b)。

シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト添加培養上清では、4°C および -20°C 保存ブラディゾイト添加培養上清のどちらにおいても IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IFN- γ 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MMP-9、RANTES、TNF- α 、VEGF の分泌増加、IL-12、GRO の分泌減少を認めた (図 7a, b)。また、4°C 保存ブラディゾイト添加培養上清において GM-CSF の分泌増加を認めた (図 7a, b)。

D. 考察

ウマ寄生 *S. fayeri* とニホンジカ寄生 *S.*

japonica および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト、ならびに凍結融解シスト上清を用いた刺激試験の結果、インサートの有無や MOI に関わらず、L929 細胞の顕微鏡像に顕著な変化を認めなかった。このことから、ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトは L929 細胞を物理的に傷害しないこと、ブラディゾイトからの分泌性刺激物質等による傷害も起こさない可能性が示唆された。さらに、物理的に破壊した *Sarcocystis* 属ブラディゾイトから溶出したタンパク質による L929 細胞傷害も起こらない可能性が示された。

L929 細胞、RAW264 細胞、Caco-2 細胞を rADF10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1 日刺激しても顕微鏡下における細胞の状態は正常で安定しており、細胞傷害を受けた様子を示さなかった一方で、rADF 刺激 RAW264 細胞培養上清を加えた L929 細胞の生存率が減少する報告されている [Irikura et al., 2017]。この報告では、ブラディゾイトが腸管腔内で酵素によって消化されて ADF 分子を放出、これが腸管腔から吸収されると細胞毒性シグナルが誘導されて体液貯留が誘発されると考察している [Irikura et al., 2017]。このことから、ヒトが馬肉やシカ肉を喫食した際同様に、*Sarcocystis* 属シストまたはブラディゾイトを胃酸程度の pH1~1.5 下に置き、ペプシンなどの消化酵素処理を施すことで、細胞に与える影響についてさらなる解析が進められると考える。また、腸管上皮細胞である Caco-2 細胞を用いた同様の実験によって、腸管への影響を明らかにする必要がある。

U937 細胞刺激試験の結果、MOI に関わらず顕微鏡観察における細胞の状態に顕著な変化を認めなかったことから、マクロファージ細胞に

においてもブラディゾイトおよび上清中タンパク質による物理的および化学的傷害が起こる可能性は低いことが示唆された。先述の通り、L929 細胞, RAW264 細胞, Caco-2 細胞を rADF10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 1 日刺激しても安定しており, 細胞傷害感受性を示さなかったが, rADF で刺激した RAW264 細胞の培養上清を加えた L929 細胞の生存率が減少するという報告がある [Irikura et al., 2017]。したがって, 細胞自体には変化を認めなかったが, 培養上清中には L929 細胞致死活性を有する物質が含まれている可能性が考えられる。このことを明らかにするために, U937 細胞と L929 細胞あるいは Caco-2 細胞を共培養する複合培養系を用いて, 細胞生存率などを解析する必要がある。これにより, *Sarcocystis* 属の腸管毒性発症機序の解明に寄与することができると考えられる。

S. fayeri ブラディゾイト添加による U937 細胞刺激培養上清では, 陰性対照と比較して MIP-1 α , MMP-9, RANTES, VEGF の分泌増加, IFN- γ の分泌減少を認めたが, IL-6, IL-12, TNF- α は検出されなかった。

一方, *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト添加培養上清では, 陰性対照と比較して IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , MMP-9, RANTES, TNF- α , VEGF の分泌増加, IL-12, GRO の分泌減少を認めた。

S. fayeri について, 腸管毒性因子である ADF が RAW264 細胞の TNF- α 遺伝子発現を誘導したという報告があるが [Irikura et al., 2017], 今回のサイトカイン解析では TNF- α の産生を認めなかった。本研究で用いた U937 細胞はヒト単球の株化細胞であり, マウスマクロ

ファージである RAW264 細胞を用いるよりもヒト体内での免疫反応を反映していると考えられる。したがって, *S. fayeri* のヒトに対する腸管毒性には TNF- α が関与していない可能性が示された。その一方で, *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト刺激培養上清では, TNF- α を含め, *S. fayeri* 刺激では増加しなかったサイトカインが多く認められたことに加えて, 産生量も上回っていた (図 8a, b)。これは, *S. fayeri* と *S. japonica* および *S. cf. tarandi* の腸管毒性発生に関わる可能性のあるサイトカイン, さらには発生メカニズムが異なることを示唆している。ブラディゾイトを投与した腸管ループテストでは毒性発現最小投与ブラディゾイト数が *S. fayeri* では 10^3 , *S. japonica* および *S. cf. tarandi* で 10^7 と大きく異なり, 出血の有無も考慮すると *S. fayeri* の毒性が *S. japonica* および *S. cf. tarandi* よりも強いことが示唆されるが, サイトカイン誘導結果は逆に *S. japonica* および *S. cf. tarandi* 刺激での産生量は *S. fayeri* 刺激の倍以上であった。

また, どちらにおいても RANTES や MIP-1 α が顕著な産生増加を認めた。RANTES は好酸球の遊走作用や活性化に関与しており, 喘息発作中の患者血清中で上昇すること, アレルギー性結膜炎患者の涙液中に存在すること, アトピー性皮膚炎の湿疹部位で mRNA が発現することが報告されている [Kanda and Chihara, 2004]。さらに, MIP-1 α は急性期の炎症に関与し, 気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液中で増加することが確認されている [Kanda and Chihara, 2004]。VEGF も双方で増加を認めたサイトカインであり, 血管新生や血管透過性の亢進を誘導

する [菅村他, 2005]。このことから, *Sarcocystis* 属による腸管毒性は, アレルギーおよび炎症反応が相互に関与している可能性が示唆された。

しかし, この試験はあくまで *Sarcocystis* 属によって誘発されるサイトカインを明らかにすることが目的であり, それぞれのサイトカインがどのように腸管毒性に関わっているかは, より詳細な研究を進めていく必要がある。さらに, 今回の結果と合わせて, 腸管粘膜組織切片で遊走細胞や微絨毛などの観察をすることで, *Sarcocystis* 属の腸管毒性がどのようなメカニズムで発生するのか解析していく必要がある。

【参考文献】

- Fayer R, Andrews C and Dubey J.P. (1988). Lysates of *Sarcocystis cruzi* Bradyzoites Stimulate Raw 264.7 Macrophages to Produce Tumor Necrosis Factor (Cachectin). The Journal of Parasitology. **74**(4): 660-664.
- Irikura D, Saito M, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Sugiyama K, Watanabe M, Yamazaki A, Izumiyama S, Sato H, Kimura Y, Doi R and Kamata Y. (2017). Characterization of *Sarcocystis fayeri*'s actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea. Gene to Cells. **22**: 825-835.
- Kamata Y. (2012). Food Poisoning Due to Raw Horsemeat Containing *Sarcocystis* Parasite. Jpn. J. Food Microbiol. **29**(1): 47-52. (in Japanese.)
- Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Bessho T, Inui T, Watanabe M and Sugita-Konishi Y. (2014). A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning. J. Food Prot. **77**(5): 814-819.
- Kanda A and Chihara J. (2004). Chemokines in Allergy. Japanese Journal of Clinical Chemistry. **33**(2): 79-89. (in Japanese.)
- Nakamura Y, Saito M, Shibata Y and Itagaki H. (1999). Induction of tumor necrosis factor α and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*. Veterinary Parasitology. **85**: 235-243.
- Saito M. (2012). Food Poisoning Caused by *Sarcocystis fayeri* Associated with Ingestion of Raw Horse Meat. The Journal of Veterinary Epidemiology. **16**(2): 114-125. (in Japanese.)
- 菅村 和夫, 宮園 浩平, 宮澤 恵二, 田中 伸幸編 (2005). サイトカイン・増殖因子用語ライブラリー, pp221-223. 羊土社, 東京

E. 結論

本研究により、*Sarcocystis* 属ブラディゾイトは L929 細胞および U937 細胞に対する物理的・化学的傷害を起こさないが、アレルギーや炎症に関わるサイトカインおよびケモカインを誘発することがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Yamazaki A., Hiroshima, T., Yamaguchi, Y., Shirafuji, Y., Taira, K., Saito, M., Kobayashi, N., Sugita-Konishi, Y., and Kamata, Y. (2020)

Presence of *Sarcocystis sybillensis* in Japanese sika deer (*Cervus nippon*) captured in its native territory and its phylogenetic relationship with *Sarcocystis nipponi*. Parasitol Res. **119** 7

2309–2315.

Yamazaki A., Shirafuji, Y., and Kamata, Y. (2020)

Establishment of a Novel Molecular Detection Method for *Sarcocystis* in Venison. *Foodborne Pathog Dis.* **18** 2 104–113.

Irie, T., Uraguchi, T., Ito, T., Yamazaki A., Takai, S., and Yagi, K. (2020)

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 2020 年 4 月

Sato, H, Hiraya H., Sugiyama, T., Fukumoto, S., Matsuyama, R., Yanagawa, Y., Nakao, R., Irie, T., Taira, K., Yamazaki A., Hagiwara, K., Yoshida, A., Kamata, Y., and Ichikawa-Seki, M. (2021) Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) from

Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1. *Parasitol Int.* **80** 102222.

2. 学会発表

第 163 回日本獣医学会学術集会、ウマ寄生 *Sarcocystis fayeri* に対する細胞応答の解析

日本食品衛生学会創立 60 周年記念第 116 回学術講演会、*Sarcocystis* spp. の腸管毒性の比較検討

令和 2 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、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

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

表1 ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いた L929 細胞刺激試験結果

宿主	保存条件	ブラディゾイト数 (/mL)	非染色率 (%)	MOI
ウマ	4°C	6.5×10^6	93	1.27
	-20°C	8.0×10^6	69	1.56
	凍結融解		1.08 mg/mL	0.011 mg/mL
シカ	4°C	17×10^7	98	2.31
				23.06
	-20°C	96×10^7	93	1.31
				13.06
	凍結融解		11.754 mg/mL	0.012 mg/mL
NC			10%FBS-P/S-DMEM	

表2 ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いた U937 細胞刺激試験結果

宿主	保存条件	ブラディゾイト数 (bradyzoites/mL)	非染色率 (%)	MOI
ウマ	4°C	11×10^6	100	1.16
				11.58
	-20°C	7.5×10^6	40	1.58
				15.79
	凍結融解		1.681 mg/mL	0.017 mg/mL
シカ	4°C	17×10^7	98	3.39
				33.9
	-20°C	96×10^7	93	1.92
				19.2
	凍結融解		11.754 mg/mL	0.012 mg/mL
NC			無血清 RPMI-1640 培地	

表3 *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清中サイトカイン解析結果

	4°C MOI=1	4°C MOI=10	-20°C MOI=1	-20°C MOI=10	F&T*	NC
IL-1 α	0.00	0.00	0.00	0.31	0.00	0.00
IL-1 β	0.00	0.00	0.00	1.14	0.00	0.00
IL-2	0.00	0.00	0.00	2.23	1.06	3.28
IL-4	0.00	0.00	0.02	0.36	1.33	0.44
IL-5	0.00	0.00	0.25	2.76	1.12	8.28
IL-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-8	356.11	480.30	297.52	272.02	294.75	289.63
IL-10	15.62	0.00	116.42	71.49	141.61	101.42
IL-12 p70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00
GM-CSF	0.00	0.00	0.00	0.31	1.81	3.36
GRO	0.00	0.00	0.00	2.20	1.47	7.17
IFN γ	0.00	0.00	0.00	1.36	2.03	33.77
MCP-1	5919.80	7604.72	7408.78	5860.40	7760.12	8046.37
MIP-1 α	202.82	1701.46	323.76	163.22	239.96	121.62
MIP-1 β	0.00	438.99	0.00	0.00	0.00	0.00
MMP-9	5.09	73.75	15.46	15.08	8.95	3.26
RANTES	313.72	718.77	398.67	333.36	337.25	228.26
TNF- α	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VEGF	58.67	75.38	46.92	57.91	62.12	39.64

(pg/mL)

*F&T ; Freeze&Thaw (凍結融解シスト上清)

(数字) 灰色 : 濃度がマイナス, 青色 : 検量線測定範囲以下, 濃赤色 : 検量線測定範囲以上
(塗りつぶし) 黄色 : 非検出, オレンジ : 分泌増加, 水色 : 分泌減少

表4 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清中サイトカイン解析結果

	4℃ MOI=1	4℃ MOI=10	-20℃ MOI=1	-20℃ MOI=10	F&T*	NC
IL-1 α	25.41	11.60	0.00	40.27	0.00	0.00
IL-1 β	4.55	29.41	2.49	19.20	0.00	0.04
IL-2	116.19	86.43	87.98	60.18	154.90	52.79
IL-4	622.99	10.82	2.85	6.57	0.09	0.01
IL-5	0.00	5.86	0.00	0.00	0.00	0.00
IL-6	38.97	1039.15	21.91	34.92	0.00	6.61
IL-8	573.22	517.37	590.53	475.20	458.64	168.48
IL-10	151.02	272.29	175.96	97.53	324.93	210.71
IL-12 p70	0.00	0.00	0.00	1.03	1.06	5.81
GM-CSF	28.88	12.05	2.32	1.82	0.00	0.00
GRO	0.67	3.64	8.05	3.72	0.08	171.95
IFN γ	0.00	120.35	106.84	9.13	52.02	0.00
MCP-1	18194.84	2831.44	20624.83	3937.56	16705.40	16560.23
MIP-1 α	1638.91	6291.06	6747.01	7648.88	3477.70	129.63
MIP-1 β	877.79	2135.59	3942.12	5802.91	2238.84	4.87
MMP-9	92.52	132.56	196.76	388.16	164.23	40.50
RANTES	528.71	666.31	2182.25	1911.96	1533.28	527.30
TNF- α	68.83	25.67	20.41	328.74	0.00	0.00
VEGF	198.91	106.13	398.16	250.50	305.79	180.74

(pg/mL)

*F&T ; Freeze&Thaw (凍結融解シスト上清)

(数字) 灰色 : 濃度がマイナス, 青色 : 検量線測定範囲以下, 濃赤色 : 検量線測定範囲以上 (塗りつぶし) 黄色 : 非検出, オレンジ : 分泌増加, 水色 : 分泌減少

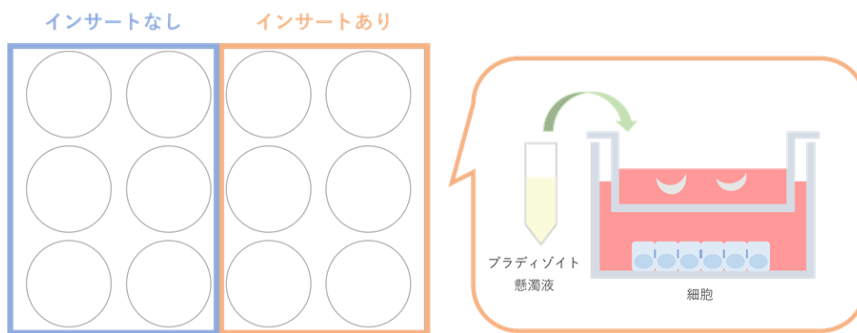


図1 L929細胞刺激試験概要図

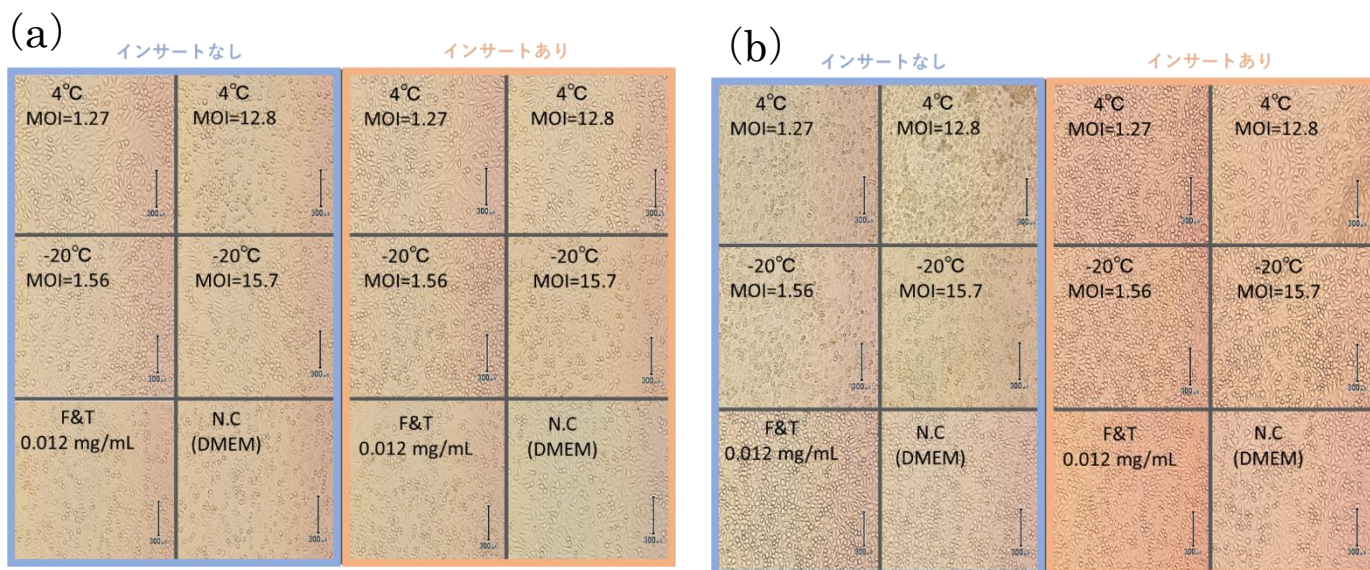


図2 *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液を用いた L929 細胞刺激試験結果
(a) 添加前, (b) 添加 9 時間後

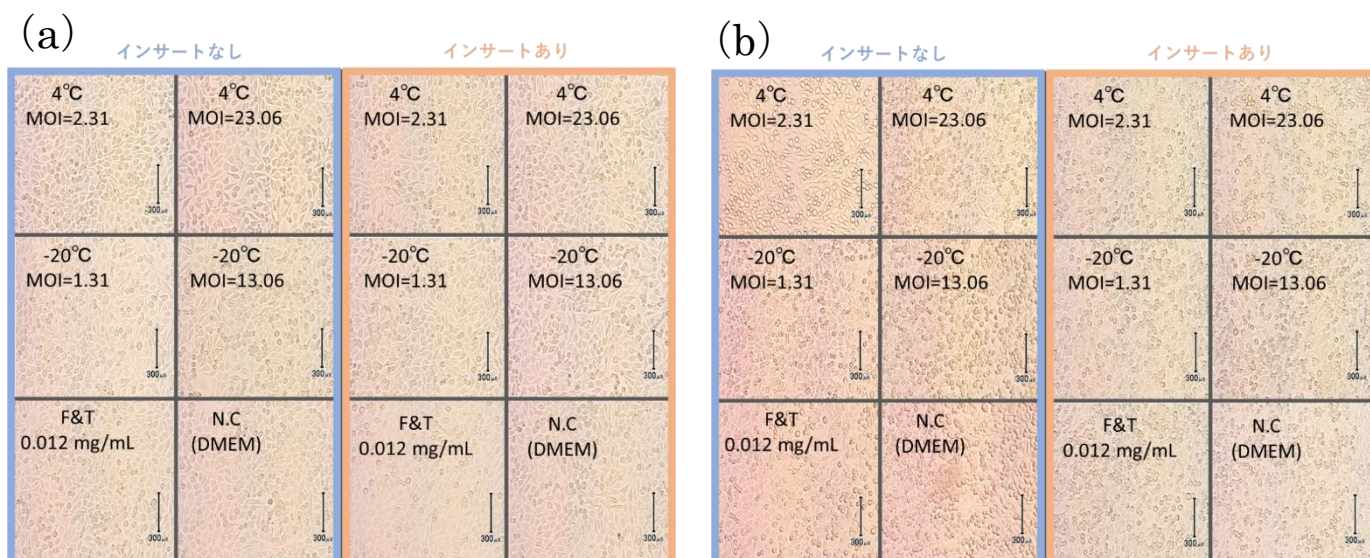


図3 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いた L929 細胞刺激試験結果
(a) 添加前, (b) 添加 24 時間後

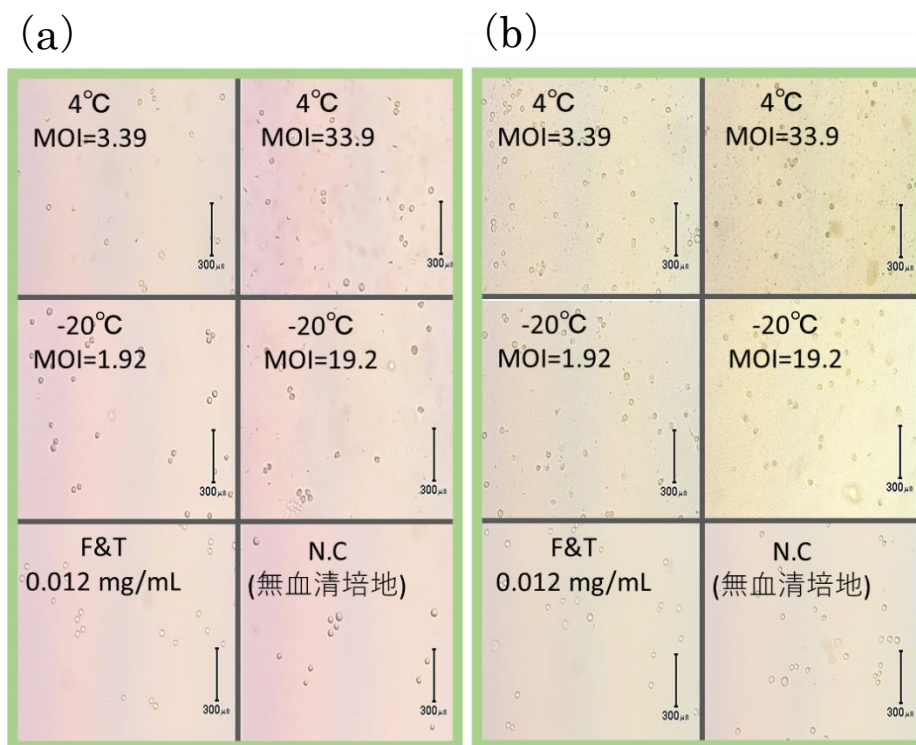
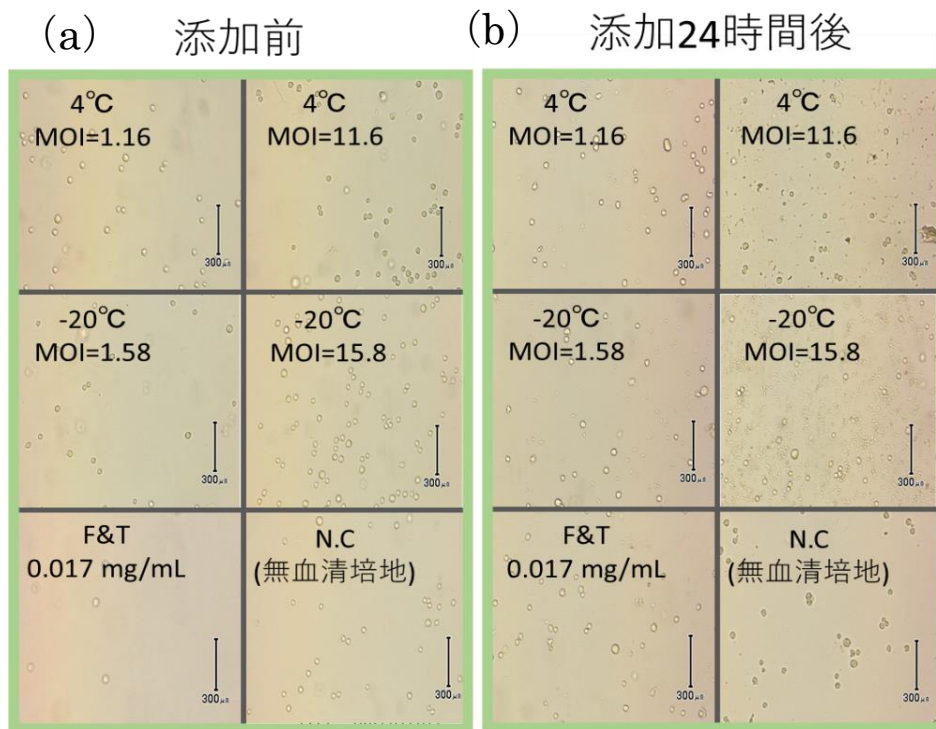


図5 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いた U937 細胞刺激試験結果
 (a) 添加直後, (b) 添加 24 時間後

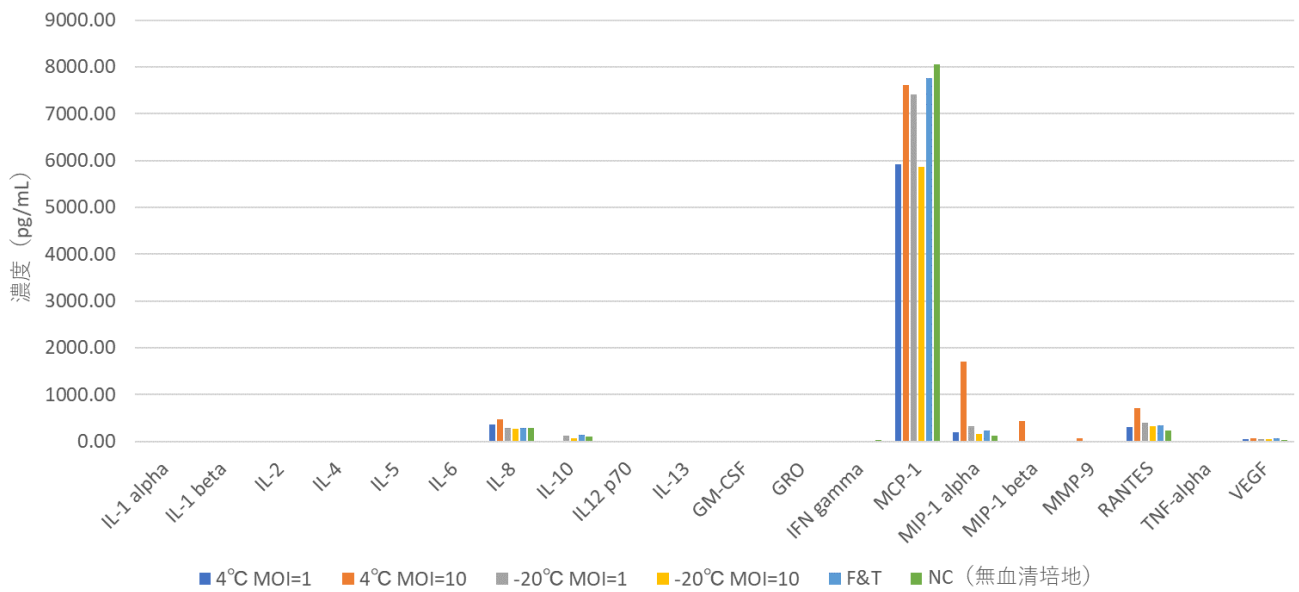


図 6 (a) *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果

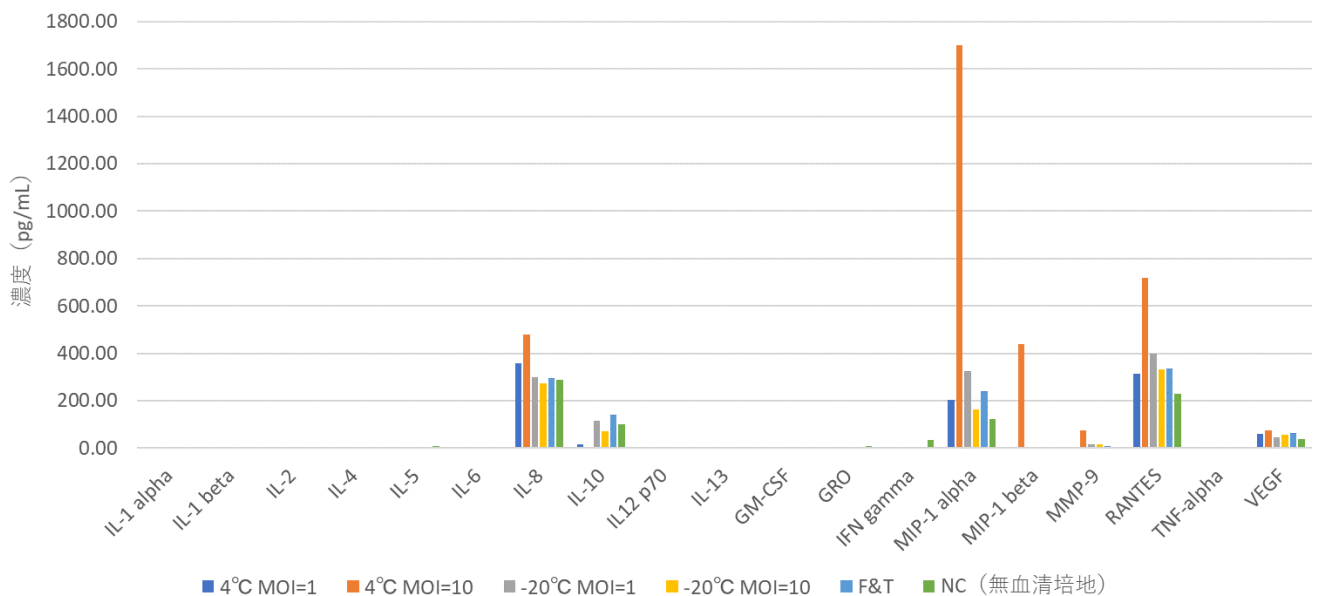


図 6 (b) *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果 (MCP-1 を除く)

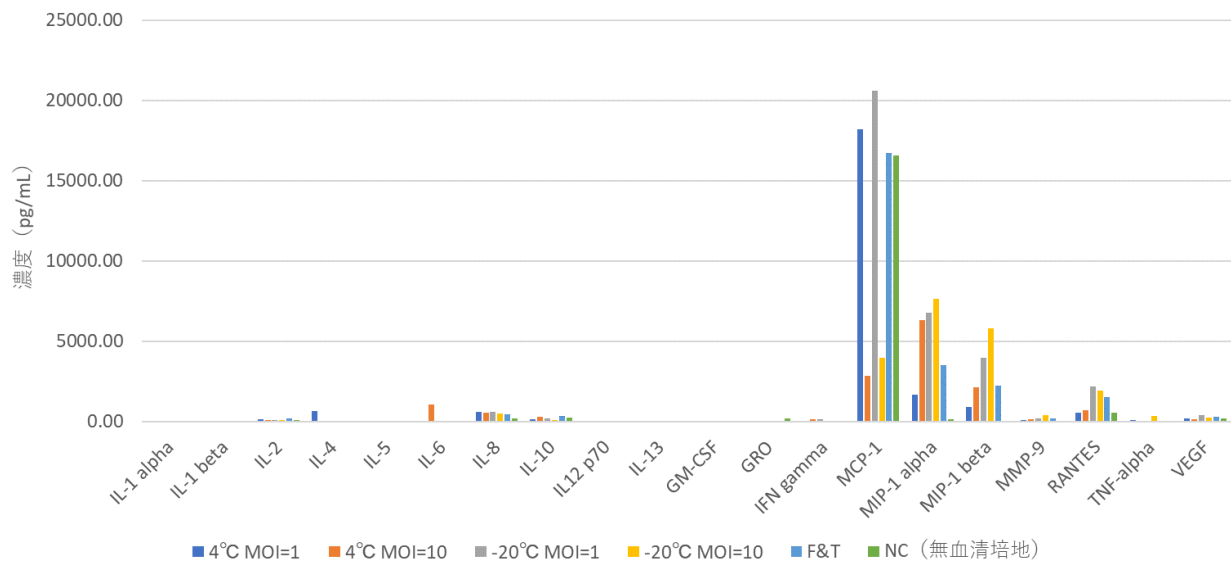


図 7 (a) シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果

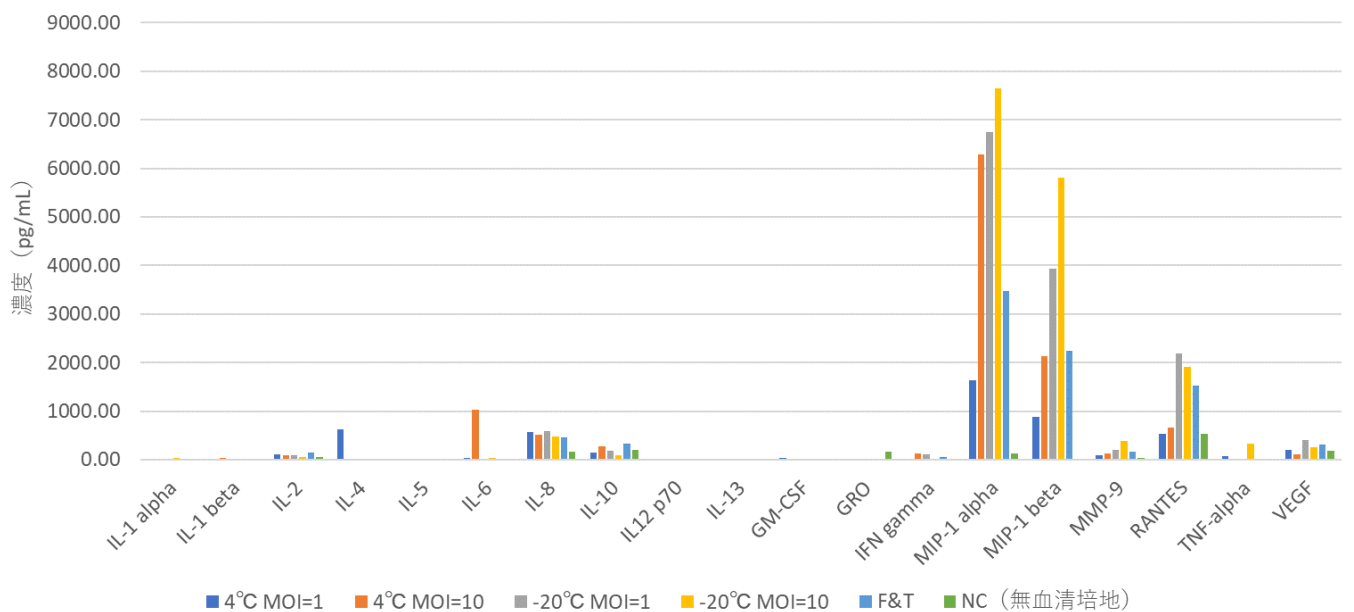


図 7 (b) シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果 (MCP-1 を除く)

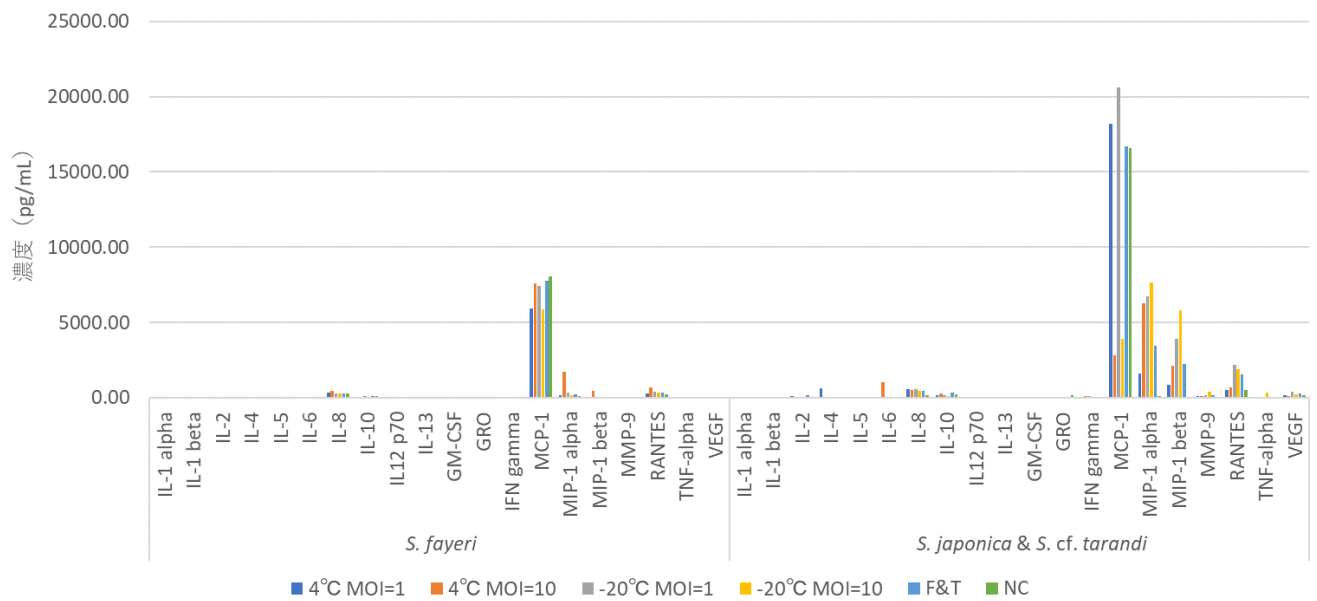


図 8 (a) *S. fayeri* およびシカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果の比較

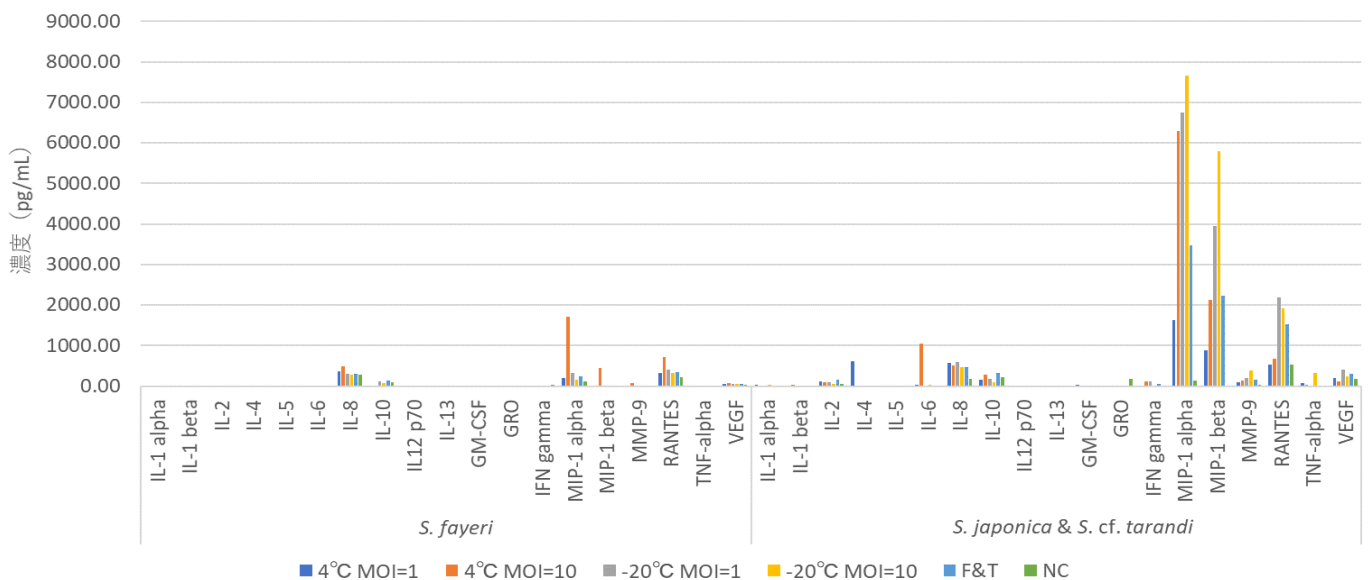


図 8 (b) *S. fayeri* およびシカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果の比較 (MCP-1 を除く)

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）

総合研究報告書

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

北海道のエゾシカにおける住肉孢子虫の疫学的研究

研究要旨

ジビエの可食部筋肉には高率に住肉孢子虫 (*Sarcocystis* 属原虫) が寄生することが知られており、この原虫の寄生したシカ肉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。そこで本研究では、特に流通量の多いエゾシカについて、筋肉内に寄生する *Sarcocystis* の生活環の解明を目指し、寄生状況の調査および感染虫種の同定を行った。

北海道内のエゾシカ 65 頭について、横隔膜に寄生する *Sarcocystis* の病理組織学的検査と、検出されたシストに対して、18S rRNA 遺伝子およびシトクローム *c* オキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子を対象に塩基配列を解析し、分子系統解析による種の同定を行った。その結果、*S. truncata* の近縁種、*S. tarandi* の近縁種、および *S. pilosa* の 3 種類が同定され、その寄生率は 29.2%、95.4%、92.3% と非常に高いものだった。

本研究結果から、エゾシカにおける高率な *Sarcocystis* の寄生状況、および既に報告のある *S. ovalis* と併せ、北海道には少なくとも 4 種が存在することが示された。*S. ovalis* についてはカラス科の鳥類が終宿主動物のひとつであることが判明しているが、他の 3 種については、いずれも終宿主不明であるが、近縁種の状況から推測すると、*S. truncata* の近縁種はネコ科の動物、他の 2 種はイヌ科の動物であると考えられる。今後

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

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孢子虫 (*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。そこで本研究では、特に食用利用の盛んなエゾシカに着目し、筋肉内に寄生する *Sarcocystis* の生活環の解明を目指し、まず寄生状況の調査および感染虫種の同定を行った。

B. 研究方法

2015年10月から2018年6月に道内で捕獲されたエゾシカ65頭について、横隔膜に寄生する *Sarcocystis* の病理組織学的検査を実施した。検出されたシストに対して、18S rRNA 遺伝子領域(約1600bp) 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(約1000bp) を対象に塩基配列を解析し、分子系統解析による種の同定を行った。

C. 結果

検査したエゾシカ横隔膜65件のうち、全検体において少なくとも1種の *Sarcocystis* の寄生を認めた。組織学的評価から、これらは Narisawa らの既報(2008)の形態と一致する3つのタイプを示していた。各タイプのシストについて遺伝子解析を行った結果、タイプ1から3の順に、*S. truncata* の近縁種、*S. tarandi* の近縁種、および *S. pilosa* であることが明らかとなった。種ごとの寄生状況は、順にシスト陽性19件(29.2%)、62件(95.4%) および60件(92.3%)であった。

D. 考察

本研究結果から、エゾシカにおける高率な *Sarcocystis* の寄生状況、および既に報告のある *S. ovalis* と併せ、少なくとも4種が存在することが示された。*S. ovalis* については我々の先行研究によりカラス科の鳥類が道内における終宿主動物のひとつであることが判明している。他の3種については、いずれも終宿主が特定された報告は世界的にもないものの、近縁種の状況から推測すると、*S. truncata* の近縁種はネコ科の動物、他の2種はイヌ科の動物であると考えられる。

特に、*S. tarandi* の近縁種および *S. pilosa* は、どちらも90%以上という感染率の高さであり、前項の山崎の研究結果からも、エゾシカ肉から分離した *Sarcocystis* シストから遊離させたブラディゾイトによる腸管毒性が明らかになっていることから、流通量の多いエゾシカ肉による食中毒リスクが危惧される。

本研究で示されたように野生動物であるシカ肉は住肉胞子虫が混合感染している状況であるため、これら全ての種に毒性があるのか、それとも種特異性であるのかは不明である。前項で示した、ウマ由来 *Sarcocystis* とシカ由来 *Sarcocystis* を用いたウサギ腸管ループ試験の結果が異なる腸管毒性を示すことは、少なくともウマ寄生性の *S. fayeri* とシカに寄生する *S. fayeri* 以外の *Sarcocystis* 属の種の違いに起因す

るとも考えられ、今後は毒素因子の種間相違についても着目することが重要であり、同時に国内に分布する4亜種のニホンジカに寄生する優勢種の有無、その種の毒性強度を正確に把握することは、わが国のジビエの安全な流通に大きく貢献すると考えられる。

E. 結論

現在、国内に流通しているジビエの中で圧倒的シェアを占めるエゾシカ肉について、*Sarcocystis* が非常に高率に感染していることが分かった。この感染は混合感染であり、少なくとも北海道内のエゾシカは4種の *Sarcocysts* に感染している。これらのなかで、*S. tarandi* の近縁種および *S. pilosa*

が90%以上の個体に感染している優勢種であることが明らかになった。

今後はこれらの種が腸管毒性を有するか、また、その毒性の性質を詳細に検討する必要がある。

G. 研究発表

学会発表等

岐阜県産野生ホンシュウジカに寄生する住肉胞子虫の遺伝子解析

阿部仁一郎, 森部絢嗣, 高島康弘, 松尾加代子, 入江隆夫, 馬場孝

第88回日本寄生虫学会大会, 2019年3月15-16日, 長崎

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）

総合研究報告書

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

代表研究者 山崎朗子 岩手大学農学部共同獣医学科

九州産ジビエ（キュウシュウジカ、イノシシ、アナグマ）

試料採集と寄生虫の探索

研究要旨

ジビエの食中毒危害要因として注視されている住肉胞子虫はシカでの高保有率から、シカ肉喫食は公衆衛生上のリスクとなり得ると危惧されている。本研究チームはこれまで、特に流通量の多いエゾシカを優先的に調査してきたが、九州地方に分布するニホンジカは亜種が異なるキュウシュウジカであること、また九州では本州以北と異なりシカよりもイノシシの消費量が多いことに加え、国内のジビエの中でも高級品として扱われるアナグマの捕獲量が全国の約7割を占めることなどから、新たに九州地方で捕獲されるジビエとして、キュウシュウジカ、イノシシ、アナグマにおける住肉胞子虫の流行状況を調査した。その結果、キュウシュウジカでは100%(63/63)の筋肉に住肉胞子虫のシストがみられ、種としては *Sarcocystis japonica* を含む複数が存在しており、それらが混合感染していた。イノシシでは45%(5/11)に *S. miesheriana* の寄生を認めた。アナグマでは不検出であった。

分担研究者 入江隆夫

宮崎大学 農学部獣医学科 准教授

A. 研究目的

九州産ジビエ（キュウシュウジカ、イノシシ、およびアナグマ）を対象に、住肉胞子虫の流行状況の把握を研究目的とした。

B. 研究方法

昨年度依頼した処理施設から、検査試料（横隔膜）としてキュウシュウジカ63検体、イノシシ11検体を得た。各横隔膜から実体顕微鏡を用いて住肉胞子虫の寄生を確認した。陽性の試料はホルマリン固定し、パラフィン包埋の後、組織切片を作成し、各種染色により組織学的評価を行っ

た。また、陽性の試料からはシストを6個ずつ顕微鏡観察下でピンセットを用いて単離し、DNA抽出を行い遺伝解析に用いた。

C. 結果

キュウシュウジカは63検体すべてに住肉胞子虫の寄生を認めた。形態学的には複数種の存在が疑われており、大型の *S. japonica* の他、中～小型、シスト壁も厚～薄まで様々なものがみられているが、現時点では分子学的解析は完了していないためすべての種同定には至っていない。イノシシは5検体（45.5%）が陽性であ

り、寄生種はいずれも *Sarcocystis miेशeriana* 単独であった。

アナグマからは住肉胞子虫は検出されなかったが、宮崎肺吸虫の成虫が検出された (1/53; 1.9%)。

D. 考察

キュウシュウジカにおいても、ホンシュウジカ、エゾシカ同様に高い住肉胞子虫の寄生が認められた。また、他地域のシカと同様に、混合感染の個体の割合も高いようである。引き続き分子学的解析をすすめ、本州、北海道のシカに寄生する種と同一であるか、またその保有の割合に類似性があるかなど、評価する必要がある。イノシシでは約半数の個体に *S. miेशeriana* を認めたが、これは本州のイノシシでの流行状況と一致した (松尾ら, 2016)。

一方、今回の調査ではアナグマにおいて住肉胞子虫の寄生は確認できなかった。本州のアナグマにおいては過去に寄生例も報告されていることから (Kubo et al., 2009)、九州産アナグマには本当に流行がないのか、またもし寄生例が検出された場合には食中毒原性の有無について評価するため、さらに多くの検体を用いて評価する必要がある。

一方で、アナグマからは宮崎肺吸虫が検出されたものの、検出率は過去に同地域で報告されている 30%前後という状況 (芦沢ら, 1977, 1980) とは乖離があった。おそらく清流にしか生息できない第一中間宿主の分布が変化してきたことによると考えられるが、当該地域では未だ人獣共通である肺吸虫の分布がみられるため、ヒトへの感染源となるサワガニの調理の際には注意が

必要であろう。

E. 結論

九州地方で主に消費されているジビエについても住肉胞子虫が検出された。シカでの保有率が高いのは他地域と同様であったが、動物種によって混合感染、単独感染と異なっており、また、寄生が見られない動物もいた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

第 35 回 生態学・疫学談話会, 2021 年 04 月 15 日, オンライン

野生生物の *Sarcocystis* 属原虫、特にシカ科動物寄生種について
入江隆夫

Journal of Veterinary Medical Science, 2022, 84: 454-456.

Sporadic endemicity of zoonotic *Paragonimus* in raccoon dogs and Japanese badgers from Miyazaki Prefecture, Japan.

Ishida M, Kaneko C, Irie T, Maruyama Y, Tokuda A, Yoshida A.

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

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）

総合研究報告書

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

北海道および九州産ジビエ（エゾシカ、キュウシュウジカ、イノシシ、アナグマ）における寄生虫の探索

研究要旨

Sarcocystis 属原虫を含む寄生虫類について、生息地の環境が大きく異なる各地域から採取したジビエを用いて疫学調査を行った。国内で特に流通量の多いエゾシカ、生息地の離れた九州地方のキュウシュウジカ、ニホンジカ以外のジビエとして、イノシシ、アナグマを対象とした。*Sarcocystis* 属の保有率は、エゾシカ、キュウシュウジカともに100%、イノシシ 45.5%、アナグマ 0%と動物種によって大きく異なった。寄生種については、エゾシカでは *S. pilosa*、*S. ovalis* が確認された。キュウシュウジカでは現在のところ未同定であるが、形態的特徴から混合感染が示唆される。一方イノシシでは *S. miesherianan* の単独感染であった。また、北海道のカラス類から *S. ovalis*、キタキツネから *S. Pilosa* のスポロシストが確認されたため、各種の終宿主である可能性が考えられる。これらの疫学的相違は、宿主の動物種・亜種および生息地、接触する他の宿主等に起因すると考えられる。

分担研究者 入江隆夫

宮崎大学 農学部獣医学科 准教授

A. 研究目的

ジビエの中でも特に消費量の多いエゾシカ、および比較的捕獲頭数の多いキュウシュウジカ、イノシシ、およびアナグマを対象に、筋肉内の住肉孢子虫 (*Sarcocystis*) の流行状況、すなわち寄生している種の同定と、種ごとの寄生率を評価するとともに、その感染源動物 (終宿主動物) の特定を目的に調査研究を行った。

B. 研究方法

北海道内のエゾシカ 65 検体、九州内のキュウシュウジカ 63 検体、イノシシ 11 検体、アナグマ 53 検体を得た。各試料から実体顕微鏡にて住肉孢子虫の寄生を確認した。陽性の試料はホルマリン固定し、パラフィン包埋の後、組織切片を作成し、各種染色により組織学的評価を行った。また、陽性の試料からはシストを 6 個ずつ顕微鏡観察下でピンセットを用いて単離し、DNA

抽出を行い 18S rRNA 遺伝子領域(約 1600bp) 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(約 1000bp) を標的遺伝子とした遺伝解析に用いた。

C. 結果

すべてのエゾシカ検体に少なくとも 1 種の住肉胞子虫の寄生を認めた(陽性率 100%)。キュウシュウジカについてもすべての検体に住肉胞子虫の寄生を認めた。

終宿主動物においては、ハシブトガラスから *S. ovalis* のスポロシストを検出し、また、アカギツネ(キタキツネ)から *S. pilosa* のスポロシストを検出した。エゾシカやキュウシュウジカにおいては大型のシストを形成する *S. japonica* の寄生率は低かった。イノシシについては 11 検体中 5 検体(45.5%) が陽性であり、寄生種はいずれも *S. miesheriana* 単独であった。

アナグマについては横隔膜検体を 7 件入手し検査したが、筋肉内に住肉胞子虫の寄生は認めなかった。

D. 考察

エゾシカについては合計、北海道内合計 65 検体を検査した。すべての検体に少なくとも 1 種の住肉胞子虫の寄生を認めた(陽性率 100%)。種としてはエゾシカには最低でも 4 種が流行していることが明らかとなった。一方で、共同研究として参加したホンシュウジカの調査では、これら 4 種に加えてさ

らに 3 種、合計 7 種の流行を認めた。キュウシュウジカについては、調査期間終了までに 63 検体入手し、すべての検体に住肉胞子虫の寄生を認めている。形態学的には複数種の存在が疑われているが、現時点では分子学的解析は完了しておらず、エゾシカおよびホンシュウジカとの比較はできていない。

ニホンジカに寄生数する住肉胞子虫種のうち、2 種について終宿主動物の調査を実施した。その結果、ハシブトガラスが *S. ovalis* の終宿主となることを本邦で初めて報告し、アカギツネ(キタキツネ)が *S. pilosa* の終宿主となることを世界で初めて証明した。また、ホンシュウジカにおいては大型のシストを形成する *S. japonica* の濃厚な寄生例がみられたが、エゾシカやキュウシュウジカにおいてはこの種の寄生率は低く、また濃厚例もみられなかった。この種の住肉胞子虫の終宿主動物に関する情報は世界的にも報告がないが、本州とその他の地域とで個体密度の異なる肉食/雑食の動物の関与が疑われた。

イノシシについてはこれまでに 11 検体を検査し、5 検体(45.5%) が陽性であり、寄生種はいずれも *S. miesheriana* 単独であった。この陽性率は本州での調査事例とも差がなかった。また系統学的に終宿主動物としてはイヌ科動物が示唆されているため、おそらく北海道を除く全国的に野犬とイノシシとでその生活環が維持されていると考えられる。

アナグマについては宮崎市および周辺自治体に協力を依頼し、交通事故死体の提供により、これまでに評価に利用できる横隔膜検体を7件入手し、検査したが、筋肉内に住肉胞子虫の寄生は認めなかった。*すみません、昨年9件と記述しましたが、2件はタヌキでしたので修正しました。

一方、アナグマ膀胱に高率に寄生していた *Tetragomphus melis* を形態学的に同定し、分子情報を初めて解析した。ヒトおよび動物への病原性は未解明であるが、ここまでの知見をもとに、論文投稿の準備中である。また、アナグマ等に寄生を認めた人獣共通寄生虫である肺吸虫属吸虫について、感染源動物である淡水産カニの調査結果と合わせ、論文投稿・受理に至った。

今後はキュウシュウジカにおける分子学的解析を進め、流行種を同定し、ホンシュウジカやエゾシカで検出されている種と比較する。また、優占種の違いとその原因、すなわち終宿主動物について、新たな調査研究にも着手したい。

アナグマについても、過去には検出例が知られることから、検体の採集地点を変えるなどして研究継続予定である。

E. 結論

北海道、九州地方で消費されているジビエについて、どちらにも住肉胞子虫が効率的に検出された。しかし、イノシシ、アナグマについては検出率が低く、シカとは異なり単独感染である等、相違点が多くあった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 2017, 10, 54-57.

First molecular detection of *Sarcocystis. ovalis* in the intestinal mucosa of a Japanese jungle crow (*Corvus macrorhynchos*) in Hokkaido, Japan.

Irie T, Ikeda T, Nakamura T, Ichii O, Yamada N, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K.

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 2019, 18, 100327.

Molecular characterization of three *Sarcocystis* spp. from wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan.

Irie T, Ichii O, Nakamura T, Ikeda T, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K.

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 2019, 10, 252-262.

Morphological and molecular characteristics of seven *Sarcocystis* species from sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan, including three

new species.

Abe N, Matsuo K, Moribe J, Takashima Y, Irie T, Baba T, Gjerde B.

International journal for parasitology: Parasites and wildlife, 2020, 11: 29-31.

First report of *Sarcocystis pilosa* sporocysts in feces from red fox, *Vulpes vulpes schrencki*, in Hokkaido, Japan.

Irie T, Uruguchi K, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K.

Journal of Veterinary Medical Science, 2022, 84: 454-456.

Sporadic endemicity of zoonotic *Paragonimus* in raccoon dogs and Japanese badgers from Miyazaki Prefecture, Japan.

Ishida M, Kaneko C, Irie T, Maruyama Y, Tokuda A, Yoshida A.

学会発表等

岐阜県産野生ホンシュウジカに寄生する住肉胞子虫の遺伝子解析

阿部仁一郎, 森部絢嗣, 高島康弘, 松尾加代子, 入江隆夫, 馬場孝

第 88 回日本寄生虫学会大会, 2019 年 3 月 15-16 日, 長崎

第 35 回 生態学・疫学談話会, 2021 年 04

月 15 日, オンライン

野生生物の *Sarcocystis* 属原虫、特にシカ科動物寄生種について

入江隆夫

Journal of Veterinary Medical Science, 2022, 84: 454-456.

Sporadic endemicity of zoonotic *Paragonimus* in raccoon dogs and Japanese badgers from Miyazaki Prefecture, Japan.

Ishida M, Kaneko C, Irie T, Maruyama Y, Tokuda A, Yoshida A.

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

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, Ikeda T, Nakamura T, Ichii O, Yamada N, Ito T, Yamazaki A, Takai S, Yagi K.	First molecular detection of <i>Sarcocystis</i> oocysts in the intestinal mucosa of a Japanese jungle crow (<i>Corvus macrorhynchos</i>) in Hokkaido, Japan.	Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports	10	54-57	2017
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	2018
Abe N, Matsuo K, Moribe J, Takashima Y, Irie T, Baba T, Gjerde B.	Morphological and molecular characteristics of seven <i>Sarcocystis</i> species from sika deer (<i>Cervus nippon centralis</i>) in Japan, including three new species.		10	252-262	2019
Yamazaki A., Hiroshima, T., Yamaguchi, Y., Shirafuji, Y., Taira, K., Saito, M., Kobayashi, N., Sugitani, Y., and Konishi, Y., and Kamata, 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> .	Parasitol Res	119	2309-2315	2020
Yamazaki A., Shirafuji, Y., and Kamata, Y.	Establishment of a Novel Molecular Detection Method for <i>Sarcocystis</i> in Venison	Foodborne Pathog Dis	18	104-113	2020

Irie, T., Uraguchi, T., Ito, T., Yamazaki A., Takai, S., and 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 for parasitology	11	29-31	2020
Sato, H, Hirayama, H, Sugiyama, T, Fukumoto, S, Matsuyama, R, Yanagawa, Y, Nakao, R, Irie, T, Taira, K, Yamazaki A, Hagiwara, K, Yoshida, A, Kamata, Y, Ichikawa-Seki, M.	Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (<i>Cervus nippon yesoensis</i>) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1.	Parasitol Int	80	102222	2021
Ishida M, Kaneko C, Irie T, Maruyama Y, Tokuda A, Yoshida A.	Sporadic endemicity of zoonotic <i>Paragonimus</i> in raccoon dogs and Japanese badgers from Miyazaki Prefecture, Japan.	Journal of Veterinary Medical Science	84	454-456	2022