

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）

ウマ由来 *S. fayeri* の腸管毒性因子の検討

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が、住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属は可食部である骨格筋に寄生し、シカ肉の生食で食中毒が発生したこと、シカでの陽性率が 100%であることから、ジビエ産業振興への障害となりうる。同属であるウマ寄生性の *S. fayeri* は、食中毒危害性が認められている。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、*S. fayeri* を用いて腸管毒性の解明を試みた。その結果、*S. fayeri* 由来の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、>25 kDa 分画投与ループで出血を認めた。他の分画を投与したループ全てで液体貯留を認めなかったことから、*S. fayeri* の出血因子は>25 kDa 分画に含まれており、15kDa、19kDa の下痢誘導因子とは別の因子であることが示唆された。

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、害獣の個体数管理を進めるにあたり、捕獲鳥獣をジビエとして利活用する取り組みが推進されている。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、可食部位に寄生する住肉胞子虫は、ヒト解体作業において寄生部分の廃棄というリスク軽減を図ることが出来ず、更にシカでの陽性率が 100%近いこと、シカ肉の生食で食中毒が既に発生していることから、ジビエ産業振興への障害となっている。食中毒事例

が認められたウマの *S. fayeri* と異なり、ジビエの住肉胞子虫は詳細が不明なため届出指定対象外であることから、食中毒リスクの高い状態で流通・提供されている。そのため住肉胞子虫の毒性解析は、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しく対応するためにも早急な解決が求められる。*Sarcocystis* 属の腸管毒性については、*S. fayeri* 寄生馬肉ホモジネート、シスト由来抽出液およびブラディゾイトを用いたウサギ腸管ループ試験にて液体貯留を認めたため、*S. fayeri* シスト内のブラディゾイトに下痢を誘発する因子が含

まれていることが報告されている [Kamata, 2012, Kamata et al., 2014, Saito, 2012]。ウシ寄生種である *Sarcocystis cruzi* の有する 15~16 kDa タンパク質がウサギに対する致死毒性を持つ [Saito et al., 1995] ことから、*S. fayeri* においても 15 kDa タンパク質について研究が進められ、ウサギに対して下痢原性があることが判明した [Kamata et al., 2014, Kamata, 2012, Saito, 2012]。さらに、この 15 kDa タンパク質は *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* のアクチン脱重合因子 (Actin Depolymerizing Factor, 以下 ADF) と高い相同性をもっており、*S. fayeri* の ADF であることが示され、その性質について調査研究が行われている [Irikura et al., 2017, Kamata et al., 2014]。

これまでに本研究室で *S. fayeri* の ADF 以外の腸管毒性因子について解析するためにウサギ腸管ループ試験を実施したところ、ADF に加えて約 19 kDa のタンパク質が下痢性腸管毒性を有する可能性が示された (山崎, 2019)。また、4°C で保存した *S. fayeri* シストから得たブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ腸管ループ試験において、出血を伴う液体貯留を認めた [谷田, 2019]。しかしながら、腸管出血に関与する因子は解析されていない。本研究では、シカ肉に寄生する *Sarcocystis* spp. と同属であるウマに寄生する *S. fayeri* を用いて出血性腸管毒性因子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、カナダ産ウマの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを分離した (図 1)。分離し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 (表 1)。ウマの骨格筋組織から、精密ピンセットを用いて *S. fayeri* シストを 200 個採取し、4°C で約 12 時間保存した。-80°C で凍結、37°C の恒温槽で解凍する凍結融解操作を 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×g、20°C で 10 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清中に白い浮遊物がみられた場合、Minisart SRP 15-AC (sartorius stedim biotech) を用いて濾過し、ゲル濾過クロマトグラフィーに用いた。ペリスタポンプ (ATTO) を用いて PBS で流路を平衡化した後、サンプル溶液を汲み上げ、Superdex 75 increase 10/300 GL (GE ヘルスケア) を用いて分画した。分画溶液の吸光度をバイオミニ紫外吸収モニターおよびデジミニレコーダー (ATTO) を用いて測定し、フラクションコレクター (ADVANTEC) にてフラクションを回収した。フラクション回収は、サンプル溶液を汲み上げ、PBS を流し始めた 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 0.1~0.2 mL/min とした。UV モニターで測定した吸光度を参考にフラクションを選出し、15%

ポリアクリルアミドゲルを用いた Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) でタンパク質を確認した (図 2、図 3)。電気泳動後のゲルは 2D-銀染色試薬・II (コスモバイオ) を使用して染色し、バンドを確認した。得られ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 分画の 4 つに分け, Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 10K (Merck) を用いて濃縮した。それぞれの分画のタンパク質濃度は NanoDrop One を用いて測定した。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。

供試したウサギは日本白色種 (Slc:JW/CSK, 日本エスエルシー株式会社) で, 実施 48 時間前から絶食させた。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, 空回腸の血管周囲に長さ約 3~6 cm の腸管結紮ループを作成し, 各ループに, 調製したウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイト由来フラクションをそれぞれ 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 20 μ g/loop 用量で 500 μ L, 陰性対照として PBS を 500 μ L 投与した。閉腹から約 18 時間後, ソム

ノペンチル (共立製薬) 200 mg/kg bw を静脈内投与してウサギを安楽殺し, 腸管を取り出してループ内の液体貯留を確認した。各ループの長さ (cm) と内容物の重量 (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 = (内容物の重量) / (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下で観察した。

(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

カナダ産ウマ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. fayeri* と同定された (相同性 100%)。

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ける 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, 全分画の各総液量の 1/4 を混合した分画で 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。実体顕微鏡で各ループの粘膜面を観察したところ, 陽性対照投与ループで粘膜の出血を, >25 kDa 分画投与ループで出血および微絨毛の腫

脹を認めた(表 3、図 3、図 4)。

D. 考察

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、>25 kDa 分画投与ループで高い液体貯留値を示しており、貯留した内容物は血様であった。実体顕微鏡での観察でも >25 kDa 分画投与ループで出血および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 分画および全分画を混合した分画、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。

今回の実施を含め、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、液体貯留は認めるが出血しない個体、液体貯留も出血も認めた個体がいた [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。今後は、>25 kDa 分画に含まれるタンパク質から出血因子を同定し、性質を解析していくことや、各分画の相互作用および前回の報告書にて記載した 19kDa タンパク質 pHRF (令和元年度研究報告書・後述) の毒性についてさらなる解析を行う必要がある。

【参考文献】

- 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.

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.)

Saito M, Taguchi K, Shibata Y, Kobayashi T, Shimura K and Itagaki H. (1995). Toxicity and Properties of the Extract from *Sarcocystis cruzi* Cysts. *J. Vet. Med. Sci.* **57**(6): 1049-1051.

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

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.

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

E. 結論

本研究により、*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が液体貯留を起こす因子とは別のものであること、出血因子が25kDa 以上の分子量依存的分画に存在する可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 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.
3. 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
 4. 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
 1. 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
 2. 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
 3. 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
なし

表1 18S rRNA 遺伝子を標的とした塩基配列解析に使用したプライマー

遺伝子名	プライマー名	配列 (5' to 3')	用途
	<i>Sarcocystis</i> 18S F	AGCCATGCATGTCTAAGTATAAG	18S rRNA 遺伝子増幅
	<i>Sarcocystis</i> 18S R	TTCCTCTAAGTGTTAAGGTTTCAC	
<i>Sarcocystis</i> 18S rRNA	<i>Sarcocystis</i> inside	CGCGGTAATTCCAGCTCCAA	シーケンス反応
	<i>Sarcocystis</i> inside	CTGCTGGCACCAGACTTGC	
	<i>Sarcocystis</i> var 1F	CGATGGATAACCGTGGTAATTCTATG	
	<i>Sarcocystis</i> var 1R	GCGAGCCTGCTTCAAACACTCT	

表2 ウマ寄生 *S. fayeri* 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	—	0.19	3.8	0.050
T2	17~50 kDa 分画	19 kDa (候補)	0.14	4.5	0.031
T3	15~37 kDa 分画	19 kDa (候補) +15 kDa	0.15	4.2	0.036
T4	15 kDa 分画	15 kDa	0.06	5.9	0.010
T5	T1~T4	19 kDa+15 kDa	0.05	5.1	0.001
PC	組換えウェルシュ菌毒素	20 µg/loop	1.63	3.7	0.440
NC		PBS	0.065	3.55	0.018



図1 ウマ骨格筋組織中の *S. fayeri* シスト(白矢印)

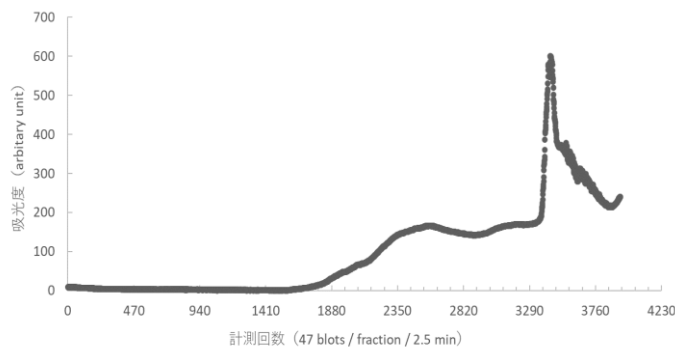


図2 UV モニターで測定した *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー分画像

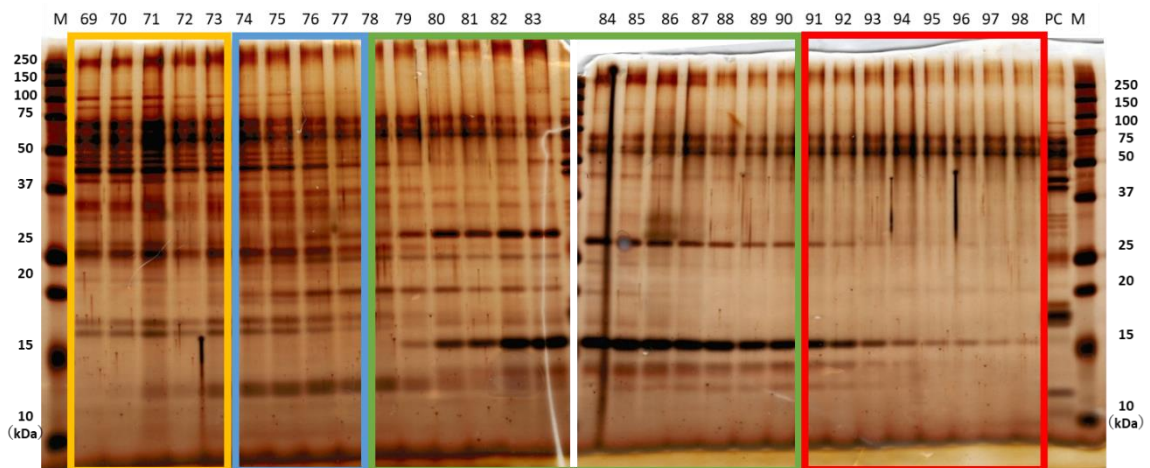


図3 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過クロマトグラフィー分画の SDS-PAGE (銀染色) 像 (フラクション 69~98)

M : 分子量マーカー, PC : 組換え *S. fayeri* ADF (17.2 kDa)

(枠) 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

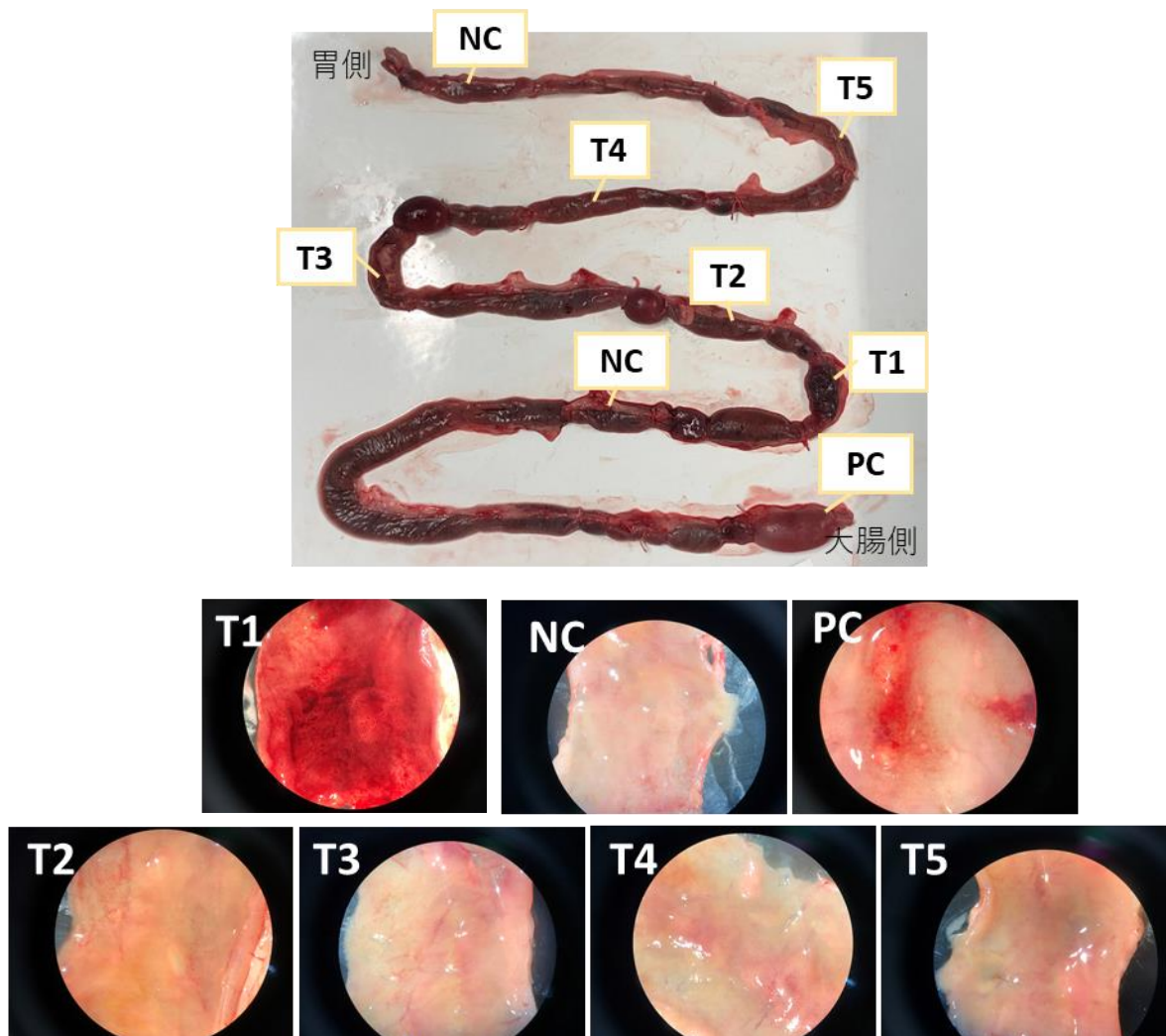


図4 *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過クロマトグラフィー分画投与ウサギ腸管ループ試験結果 (2回目)
(a) 腸管全体像, (b) ループ内腔の実体顕微鏡像 (10倍拡大像)

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, T5 : T1~T4
NC : PBS, PC : 組換えウェルシュ菌毒素 20 µg/loop

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）

シカ由来 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* の腸管毒性発現量の検討
研究代表者 山崎 朗子 岩手大学農学部助教

研究要旨

住肉胞子虫はシカ肉の生食で有症事例を起こしたことが報告されている。特にシカでの陽性率が100%であることと、好適寄生部位が可食部位である骨格筋であることから、ジビエ産業振興への障害となっている。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である。本研究では岩手県釜石市で捕獲されたシカ肉に寄生していた *Sarcocystis* 属原虫を用いて腸管毒性の発現最小量を明らかにすべく、腸管ルーptestを行った。シカ肉から分離した *S. japonica* および *S. cf. tarandi* を用いたウサギ腸管ルーptestにおいて、 10^7 ブラディゾイトを投与したルーptestで液体貯留を示した。本研究課題の昨年度報告にて示したウマ寄生 *S. fayeri* の液体貯留発現投与量 10^3 ブラディゾイトと比較すると、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* の下痢毒性は *S. fayeri* より低いことが推察される。

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

前述の通り、シカ肉喫食でも馬肉喫食による食中毒事例と類似の有症苦情事例が報告され、検体から *Sarcocystis* 属が検出されている [Aoki et al., 2013, Aoki et al., 2017, 中本他, 2017, Ota et al., 2019]。本研究室で国内各地のニホンジカを対象とした疫学調査を行ったところ、全ての地域で9割以上のシカ骨格筋に *Sarcocystis* 属が寄生していること [木村, 2016], その98%を *Sarcocystis* sp. HM050622, *S. tarandi*, *S. pilosa*

の3種が占めていることが明らかになった [廣嶋, 2018]。また、本研究室でシカ寄生 *Sarcocystis* 属の腸管毒性解析を行ったところ、4℃保存シストから得られたブラディゾイト懸濁液を用いたマウスおよびウサギ腸管ルーptestにて液体貯留を認めた [永澤, 2017, 山口, 2018]。一方で、産地の異なるニホンジカから採取した *Sarcocystis* 属シスト由来ブラディゾイトを用いたウサギ腸管ルーptestでは液体貯留を認めなかったことから、ニホンジカの生息地域ごとに

Sarcocystis 属の優勢種が異なることが腸管毒性の相違に影響している可能性が示された [谷田, 2019]。しかし、シカ寄生 *Sarcocystis* 属における腸管毒性発現量の詳細な解析はまだ行われていない。

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、シカ寄生性の *S. fayeri* を用いて腸管毒性の発現最小量の解明を試みた。

B. 研究方法

本研究の供試検体として、岩手県に生息する野生ニホンジカの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを分離した (図 1)。

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、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]。

ニホンジカの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを 50 個採取し、4°C で約 12 時間保存した後、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。

ブラディゾイト数算出後、ブラディゾイト懸濁液を 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 ,

10^7 bradyzoites/loop に調製し、ウサギ腸管ループ試験に用いた。

供試したウサギは日本白色種 (Slc:JW/CSK, 日本エスエルシー株式会社) で、15 週齢・体重 2.5 kg であった。実施 48 時間前から絶食させた。

鎮静・麻酔後開腹し、空回腸の血管周囲に長さ約 4~6 cm の腸管結紮ループを作製した。各ループに、調製したブラディゾイト懸濁液をそれぞれ 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 投与した。閉腹から約 18 時間後にウサギを安楽殺し、腸管を取り出してループ内の液体貯留の確認および FA 値の算出を行った。

また、各ループの腸管内腔粘膜面を実体顕微鏡下で観察した。

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)。

供試した *Sarcocystis* 属ブラディゾイト量は、 3.725×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 95%) であった。

FA 値は、 10^7 bradyzoites/loop で 0.164, 10^6 bradyzoites/loop で 0.075, 10^5 bradyzoites/loop で 0.095, 10^4 bradyzoites/loop で 0.087, 10^3 bradyzoites/loop で 0.064, 陽性対照で 0.069, 陰性対照で 0.055 を示した。実体顕微鏡下で各ループの粘膜面を観察した結果, 陽性対照投与ループ, 10^5 および 10^4 bradyzoites/loop 投与ループで出血を認めた (表 2、図 3)。

D. 考察

本研究で用いた岩手県産ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属シスト 50 個から抽出したゲノムを 18S rRNA 遺伝子を標的とした塩基配列解析した結果, *S. japonica* (LC481014.1) と 99%, *S. cf. tarandi* (LC481019.1) と 98%, *Sarcocystis* sp. 1 T1-2019 (LC466169.1) 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 では *S. japonica* と *S. cf. tarandi* の遺伝子において増幅がみられた。

LC466169.1 は 2019 年に GeneBank に登録された, エゾシカから形態学的に分類した Type1 *Sarcocystis* 属の 18S rRNA 遺伝子配列であり, *S. truncata*, *S. silva*, *Sarcocystis* sp. NA-1, *Sarcocystis* sp. HM050622 と同じクラスターを形成した [Irie et al., 2019]。一方で, Type1 *Sarcocystis* 属について *cox1* 遺伝子を標的とした塩基配列解析の結果, *S. silva* および *S. truncata* と別のクレードを形成した

ことから, *S. japonica* という新種であることが明らかとなった [Abe et al., 2019]。

以上のことから, 本研究に用いた *Sarcocystis* 属は *S. japonica* と *S. cf. tarandi* の 2 種であったことが推察され, これは岩手県内のニホンジカにおける *Sarcocystis* 属の混合感染の可能性を示している。

シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ腸管ループ試験において, 10^7 bradyzoites/loop 投与ループで液体貯留を示した。本研究室谷田の研究によると, 4°C で 12 時間保存したウマ寄生 *S. fayeri* シストを 4.1×10^3 bradyzoites/loop 投与したループで液体貯留を示し, 千葉県産ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ腸管ループ試験では液体貯留を示さなかった [谷田, 2018]。したがって, 岩手県産シカ寄生 *Sarcocystis* 属は腸管毒性を有するが, *S. fayeri* より毒性が低いこと, ならびに千葉県産シカ寄生 *Sarcocystis* 属より毒性が高いことが推察される。

先述の通り, 野生ニホンジカにおける *Sarcocystis* 属の優勢種は生息地域によって異なることが知られている。Irie らは, 北海道の野生エゾシカ 65 頭に寄生する *Sarcocystis* 属の種同定を行った結果, 95.4% のシカから *S. tarandi*-like, 92.3% から *S. pilosa*, 29.2% から *S. truncata*-like (Type1) が検出されたと報告している [Irie et al., 2019]。また, 岐阜の野生ニホ

ンジカ 53 頭での調査では、94.3%のシカから *S. japonica*, 54.7%から *S. pilosa*, 41.5%から *S. cf. tarandi* が検出されている。このうち、*S. japonica* は、Type1 *Sarcocystis* 属のことを指し、*S. cf. tarandi* は Irie らの報告で *S. tarandi*-like と報告されたものを指す [Abe et al., 2019]。さらに、本研究室廣嶋が北海道の野生エゾシカ寄生 *Sarcocystis* 属の種同定 (n=27) を行った結果、*Sarcocystis* sp. HM050622 が 48%, *S. pilosa* が 26%, *S. tarandi* が 22%, その他が 4%であった。一方、千葉の野生ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* 属の種同定 (n=17) の結果、*Sarcocystis* sp. HM050622 が 47%, *S. pilosa* が 47%, *S. tarandi* が 6%であった [廣嶋, 2017]。*Sarcocystis* sp. HM050622 は新種である *S. japonica* に属すと考えられている [Abe et al., 2019]。このことから、北海道産シカ寄生 *Sarcocystis* 属と千葉県産シカ寄生 *Sarcocystis* 属での毒性に違いがあると推察されている [谷田, 2019]。

本研究室谷田が腸管ループ試験に用いた千葉県産シカ寄生 *Sarcocystis* 属は、*Sarcocystis* sp. HM050622, *S. tarandi* および *S. pilosa* であった可能性が高く [谷田, 2019], 今回用いた *S. japonica* および *S. cf. tarandi* と同一または類似の性質をもつと考えられる。しかし、腸管ループ試験の結果から千葉県産シカ寄生 *Sarcocystis* 属と岩手県産シカ寄生 *Sarcocystis* 属の腸管毒性の程度に違いが認められた。岩手県における疫学調査は行われ

ておらず、今回検出された 2 種の寄生率および 2 種以外の *Sarcocystis* 属の分布が明らかでない。そのため、今回使用した岩手県産シカには、*cox1* 遺伝子を標的とした種特異的プライマーで検出できる 7 種以外の *Sarcocystis* 属が寄生している可能性が考えられ、千葉県産シカ寄生種を使用した結果との相違が生まれたと推測される。今後シカ肉検体を用いる際には、今回使用した種特異的プライマーでは検出できない種の存在や寄生率の違いを考慮に入れることで、種による毒性の違いを解析することができると考える。

【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 (*cox1*) 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

本研究により、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* は 10^7 ブラディゾイトの投与により非出血性の液体貯留を起こすことが分かった。*S. fayeri* が 10^3 ブラディゾイトの投与で出血性の液体貯留を示したことと比較すると、*S. fayeri* よりも弱い毒性である可能性が示唆される。

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., 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	なし 2. 実用新案登録 なし
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)	3. その他 なし
1. 特許取得	

表1 シカ寄生 *Sarcocystis* 属の *cox1* 遺伝子を標的とした種特異的検出プライマー

種	プライマー名	配列 (5' to 3')	増幅産物サイズ (bp)
<i>Sarcocystis</i> sp. type1 (<i>Sarcocystis japonica</i> n. sp.)	T1F	TTGCATGTTCGTTGGTGCTG	590
	T1R	TATCCATACCGCCATTGCCC	
<i>Sarcocystis</i> sp. type2 (<i>Sarcocystis</i> cf. <i>tarandi</i>)	T2F	CCGGTAGTCCAAGGCAGTT	305
	T2R	GCCATTGCCCATCACAACTC	
<i>Sarcocystis</i> sp. type3 (<i>Sarcocystis matsuoae</i> n. sp.)	T3F	ATTGCTGTTGCACTCGTTTCG	211
	T3R	ACATCGCCAAGCCGATACTC	
<i>Sarcocystis</i> sp. type4 (<i>Sarcocystis pilosa</i>)	T4F	TTGTATCCAGTGCCTCAGC	332
	T4R	CATACCGCCATTGCCCATGA	
<i>Sarcocystis</i> sp. type5 (<i>Sarcocystis gierdei</i> n. sp.)	T5F	GCCAGGCTATGATTCTGGCT	284
	T5R	CATACCGCCATTGCCCATGA	
<i>Sarcocystis</i> sp. type6 (<i>Sarcocystis</i> cf. <i>taeniata</i>)	T6F	CGGGAGCCGTTTAAATGCTG	382
	T6R	TGACTGCCCATGATAGTGCC	
<i>Sarcocystis</i> sp. type7 (<i>Sarcocystis ovalis</i>)	T7F	ACTATCTTTTGACGGCGGGG	491
	T7R	GGCGTTATTTACCCACCCA	

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	組換えウエルシュ菌毒素 20 μg/loop	0.28	4.1	0.069
NC	PBS	0.33	5.5	0.055

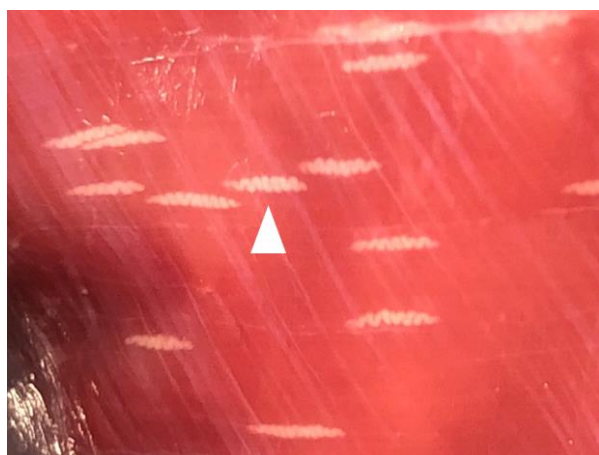


図1 シカ骨格筋組織中の *Sarcocystis* 属シスト (白矢印)

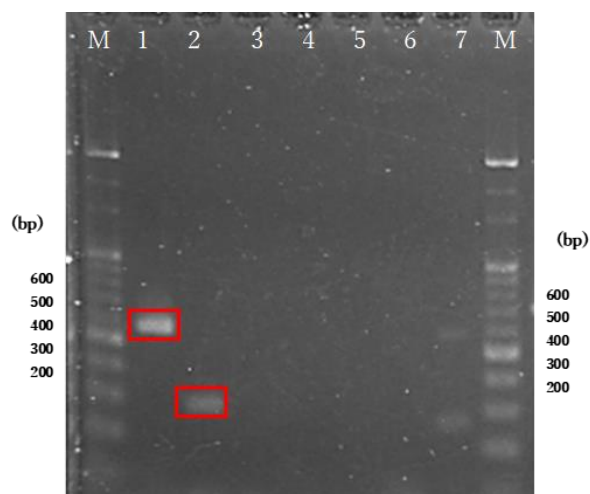
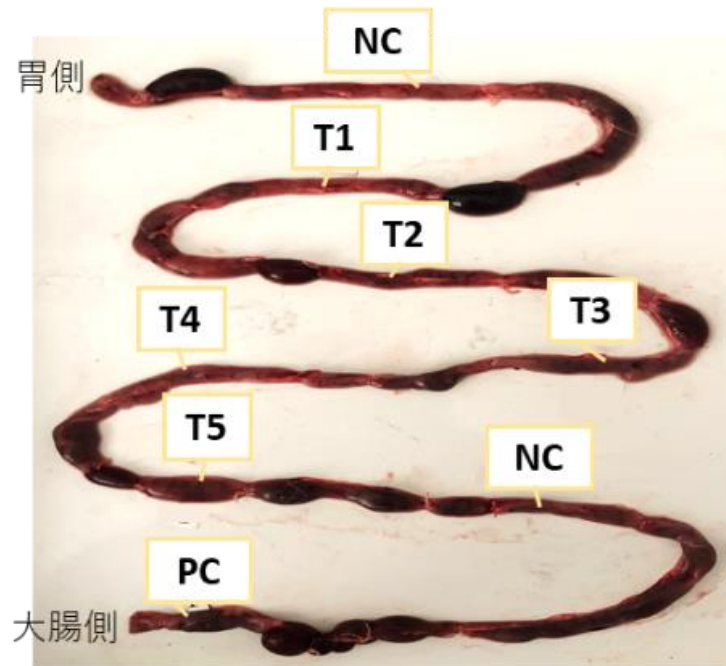


図2 *Sarcocystis* 属の種特異的 *cox1* 遺伝子検出プライマーを用いた定性 PCR 法による増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

M : DNA Personal Marker

1 : *Sarcocystis* sp type 1 (*S. japonica* n. sp., 590 bp) , 2 : *Sarcocystis* sp type 2 (*S. cf. tarandi*, 305 bp) , 3 : *Sarcocystis* sp type 3 (*S. matuoae* n. sp., 211 bp) , 4 : *Sarcocystis* sp. type 4 (*S. pilosa*, 332 bp) , 5 : *Sarcocystis* sp. type 5 (*S. gjerdei* n. sp., 284 bp) , 6 : *Sarcocystis* sp. type 6 (*S. cf. taeniata*, 382 bp) , 7 : *Sarcocystis* sp. type 7 (*S. ovalis*, 491 bp)

(a)



(b)

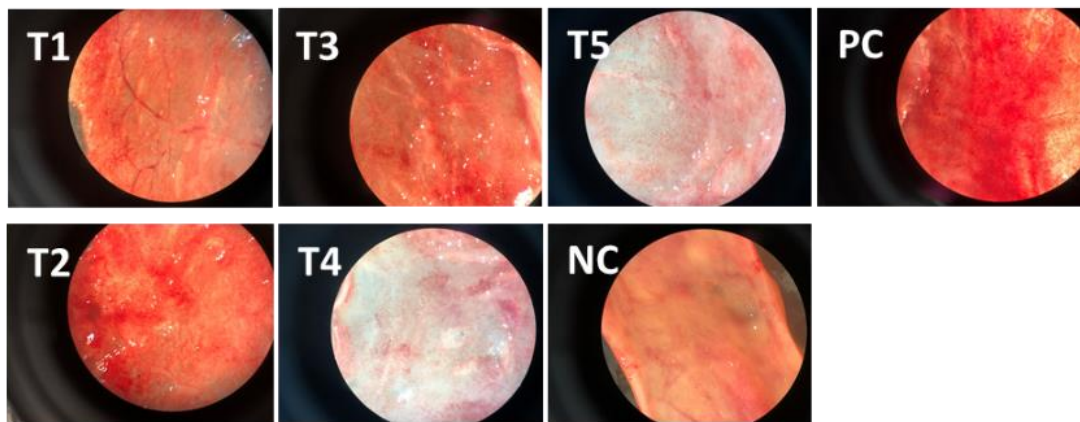


図3 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液投与ウサギ腸管ループ試験結果

(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

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)

シカ由来 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* の毒性発現因子の検討

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。本研究では岩手県釜石市で捕獲されたシカ肉に寄生していた *Sarcocystis* 属原虫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、腸管ループテストを行った。シカ肉由来の *S. japonica* および *S. cf. tarandi* の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、17~50 kDa 分画および15~37 kDa 分画投与ループに非出血性液体貯留がみられた。15~37 kDa 分画には *S. fayeri* の腸管毒性候補因子である ADF、17~50 kDa 分画には本研究課題にて昨年度に報告した19kDa タンパク質 (pHRF) が含まれることから、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* にも *S. fayeri* 同様に ADF、19kDa タンパク質が存在する可能性が示された。しかし、*Sarcocystis* 属に関しては遺伝子情報が少ないため、この毒性候補タンパク質のアミノ酸配列および塩基配列は同定出来なかった。

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、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* では、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 (谷田 2019、山崎 2019)。しかし、シカ肉に寄生し

ている住肉胞子虫がどのような毒性因子を保有しているかは不明であるため、その解明を試みた。

B. 研究方法

岩手県産の野生ニホンジカの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シスト 200 個採取してホモジナイズし、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×g, 20°C で 10 分間遠心分離して上清を回収した。回収した上清中に白い浮遊物がみられた場合、Minisart SRP 15-AC (sartorius stedim biotech) を用いて濾過した。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実施した。フラクション回収は、サンプル溶液を汲み上げ、PBS を流し始めた 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。流速は約 0.2 mL/min とした。UV モニターで測定した吸光度を参考にフラクションを選出し、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) でタンパク質を確認した。電気泳動後のゲルは 2D-銀染色試薬・II (コスモバイオ) を使用して染色し、バンドを確認した。得られたシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト由来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を第一部 2.4. 1. 同様に、分子量ごと >25 kDa 分画, 17~50 kDa 分画, 15~37 kDa 分画, 15 kDa 分画の 4 つに分け、Amicon

Ultra-4 Centrifugal Filter Devices 10K (Merck) を用いて濃縮した。それぞれの分画のタンパク質濃度は NanoDrop One を用いて測定した。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。供試したウサギは日本白色種 (Slc:JW/CSK, 日本エスエルシー株式会社) で、12 週齢・体重 2.39 kg であった。実施 48 時間前から絶食させた。

鎮静・麻酔後開腹し、空回腸の血管周囲に長さ約 3~6 cm の腸管結紮ループを作製した。各ループに、調製したシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト由来フラクションをそれぞれ 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 投与した。閉腹から約 18 時間後、ウサギを安楽殺し、腸管を取り出してループ内の液体貯留の確認および FA 値の算出を行った。腸管ループ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

シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾ

イト由来水溶性タンパク質の分画中に UV モニターで吸光度を測定した結果、測定開始から約 30 分後にピークが現れた (図 1)。結果をもとに、フラクション 20~49 を用いて SDS-PAGE 後の銀染色にてバンドを確認した (図 2)。これに基づいて、全体のタンパク質分画を *S. fayeri* ブラディゾイト由来水溶性タンパク質分画同様に、>25 kDa 分画 (20~24), 17~50 kDa 分画 (25~37), 15~37 kDa 分画 (38~43), 15 kDa 分画 (44~49) に分けた。各分画のタンパク質濃度は、3.002 mg/mL (>25 kDa 分画), 1.929 mg/mL (17~50 kDa 分画), 0.296 mg/mL (15~37 kDa 分画), 0.082 mg/mL (15 kDa 分画) で、PBS にて *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質分画の濃度に調製し、腸管ループ試験に用いた。

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、陽性対照投与ループにおいて充出血を認めたほか、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 (図 3)。

D. 考察

シカ寄生 *Sarcocystis* 属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、17~50 kDa 分画および 15~37 kDa 分画

投与ループに液体貯留がみられた。15~37 kDa 分画には *S. fayeri* で腸管毒性候補因子として従来報告されてきた ADF が含まれていることから、シカ寄生 *Sarcocystis* 属においても ADF が腸管病原性を有する物質であることが示唆された。また、17~50 kDa 分画には従来報告されてきた ADF が含まれないにも関わらず、投与ループで液体貯留を示したことから、シカ寄生 *Sarcocystis* 属にも *S. fayeri* 同様、ADF 以外の腸管毒性因子が存在する可能性が示された。

腸管粘膜面の観察結果から、陽性対照投与ループにおいて充出血を認め、液体貯留のあった 17~50 kDa 分画および 15~37 kDa 分画投与ループでは微絨毛が確認できず、腸壁が菲薄化していた。これは、シカ寄生 *Sarcocystis* 属の有する腸管病原性因子が、ウェルシュ菌毒素 CPILe-b とは異なるメカニズムによって下痢を引き起こしている可能性を示唆している。また、第一部の結果を踏まえると、*S. fayeri* の腸管毒性とも相違点があることが推察される。*S. fayeri* で液体貯留を認めたループと今回のループの腸管粘膜組織切片を観察、比較することでこれらの毒性の相違を明らかにすることができると思われる。

【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

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

E. 結論

本研究の結果, *S. fayeri* だけでなくシカ寄生 *S. japonica* および *S. cf. tarandi* にも既報の 15kDa タンパク質 (ADF) 以外に 19kDa の腸管毒性因子が存在することが分かった。

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	(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
H. 知的財産権の出願・登録状況	なし

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

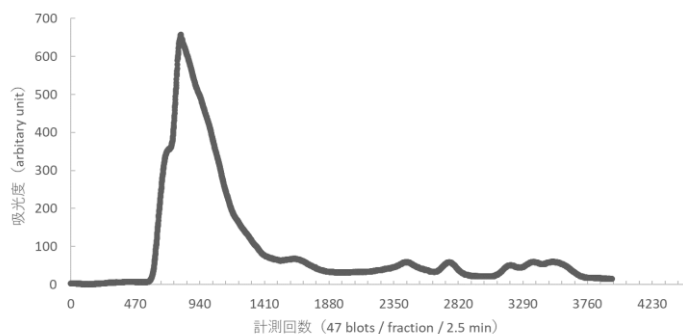


図1 . UV モニターで測定したシカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト由来タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー分画像

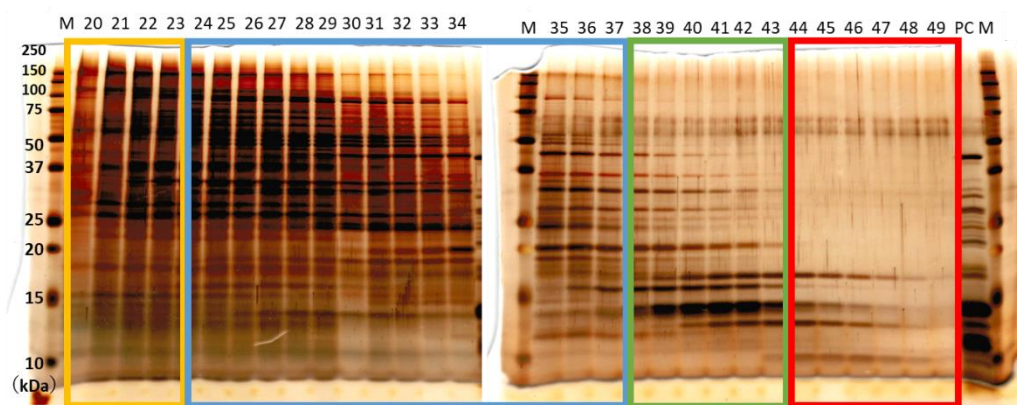


図2 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過分画の SDS-PAGE (銀染色) 像

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

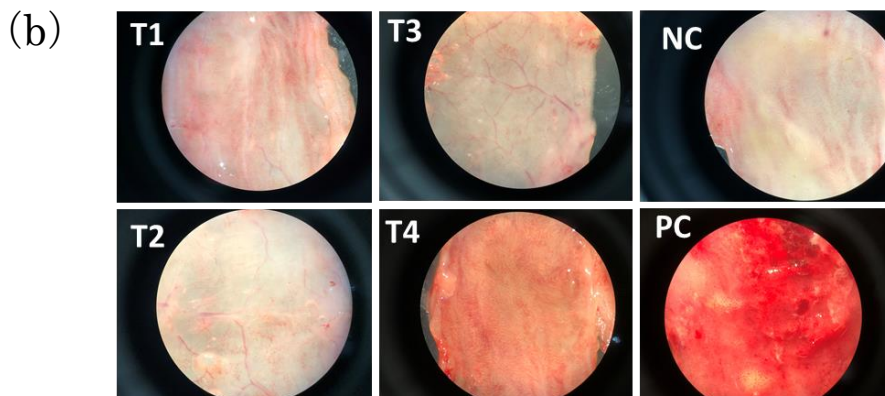
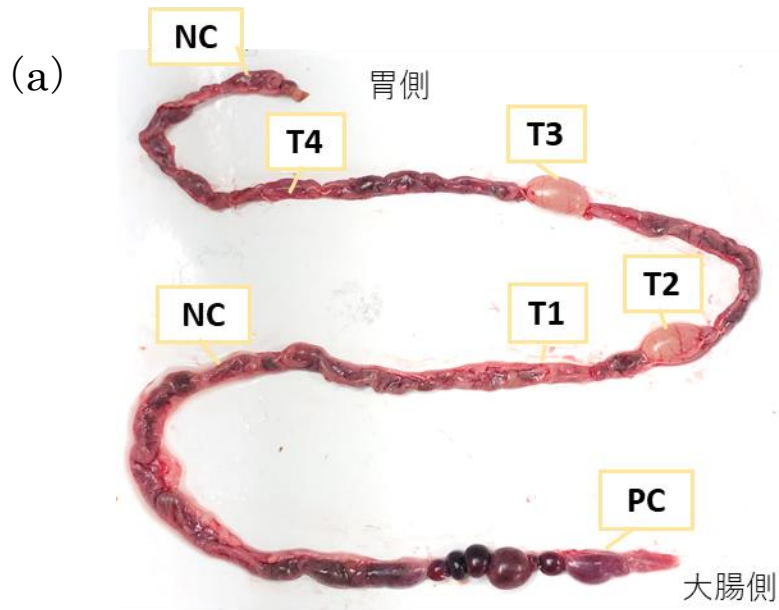


図3 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト由来タンパク質ゲル濾過クロマトグラフィー分画投与ウサギ腸管ループ試験結果
 (a) 腸管全体像, (b) ループ内腔の実体顕微鏡像 (10倍拡大像)

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

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）

シカ由来 *S. japonica*・*S. cf. tarandi*、ウマ由来 *S. fayeri* の経口毒性の検討
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、シカでの陽性率が高いこと、シカ肉の生食で有症事例が発生していることから、ジビエ産業振興の障害となっている。しかし、シカ肉に寄生する住肉胞子虫の毒性発現機序が不明なため、早急な解決が求められる。本研究では岩手県釜石市で捕獲されたニホンジカに寄生していた *Sarcocystis* 属原虫と、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて経口摂取による毒性発現の有無および毒性発現量の検討を試みた。*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。既報では 10^6 の投与で、食欲・飲水の廃絶、沈鬱、軽度の軟便、 10^7 投与で更に水様性下痢が観察され、48 時間までに全例死亡していることから、*S. fayeri* の最小発症経口投与量が 10^6 であることが示唆された。*S. japonica* および *S. cf. tarandi* を 10^7 投与したところ、やや冷感、飲水欲・食欲の低下、軟便を認めたのち回復したことから、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* にも経口による腸管毒性発現が示唆された。

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
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。そこで、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

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) ウサギ経口投与試験の試料調製
ウマの骨格筋組織から、精密ピンセットを用いて 50 個の *S. fayeri* シストを 200 μ L の PBS 中に回収し、4°C で約 12 時間保存した後、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。ブラディゾイト懸濁液 10 μ L 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、Bueker-Turk 血球計算盤 (サンリード硝子) を用いて 1 mL あたりのブラディゾイト数の算出およびブラディゾイト色素試験を行った。ブラディゾイト数算出後、ブラディゾイト懸濁液を 10^5 bradyzoites/mL に調製した。

(2) ウサギ経口投与試験

供試した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。

2. シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験

(1) ウサギ経口投与試験の試料調製

同様の手法で、ニホンジカの骨格筋組織から *Sarcocystis* 属シストを 50 個採取してホモジナイズし、ブラディゾイト懸濁液とした。ブラディゾイト数算出後、ブラディゾイト懸濁液を 10^7 bradyzoites/mL に調製した。同様にウサギ経口投与試験を実施した。

供試したウサギは日本白色種 (Slc:JW/CSK, 日本エスエルシー株式会社) で、11 週齢・体重 2.3 kg であった。実験まで自由採食・採水とした。

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
経口投与試験に使用した *S. fayeri* ブラディゾイト量は 1.23×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 80%), 6.5×10^6 bradyzoites/mL (非染色率 92%) であった。1 回目の試験では、ウサギの状態および糞便ともに、投与後に顕著な変化を認めなかった。2 回目も同様に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
経口投与試験に使用した *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト量は 1.05×10^8 bradyzoites/mL (非染色率 97%) であった。

ウサギの状態観察を開始した投与 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

採取したシスト50個から得られた *S. fayeri* ブラディゾイト量は、 1.23×10^7 bradyzoites/mL (非染色率80%), 6.5×10^6 bradyzoites/mL (非染色率92%) で、それぞれ 10^5 になるよう希釈して投与したが、1回目・2回目ともに、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 *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を行っている[Saito et al., 2013]。これによると、 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。

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、年齢や体の大きさなどの要因で症状が観察されなかった可能性が考えられる。また、後述の *S. fayeri* ブラディゾイト由来タンパク質を用いたウサギ腸管ループ試験の結果から、個体によって反応性の違いを認めることがある。したがって、様々な週齢、投与量を組み合わせて発症の有無を観察する必要があると考える。

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

採取したシスト50個から得られた *S. japonica* および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト量は 1.05×10^8 bradyzoites/mL (非染色率97%) で、 10^7 になるように希釈して投与したところ、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 (*cox1*) 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

本研究の結果、ウマ寄生の *S. fayeri*、シカ寄生の *S. japonica* および *S. cf. tarandi* のどちらにも経口毒性があることが分かった。その最小発症量は *S. fayeri* で 10^6 ブラディゾイトであり、*S. japonica* および *S. cf. tarandi* では 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

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結果

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

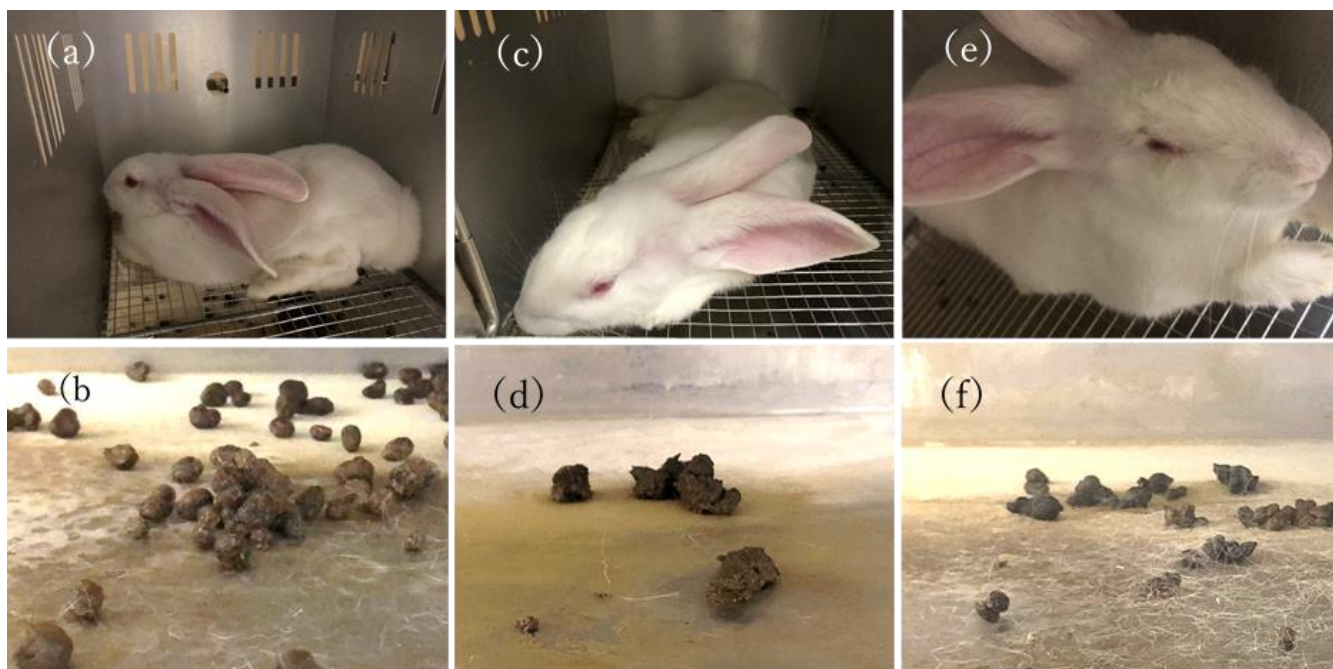


図1 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いたウサギ経口投与試験結果

(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

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 属原虫によるサイトカイン産生誘導の解析

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、シカでの陽性率が高いこと、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。本研究では岩手県釜石市で捕獲されたニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属原虫と、ウマ寄生性の *S. fayeri* を用いて住肉胞子虫の細胞に対する傷害性を解明するために、サイトカイン産生誘導を解析した。その結果、*S. fayeri* ブラディゾイト刺激によりヒトマクロファージ細胞から MCP-1, MIP-1 α , MMP-9, RANTES, VEGF の分泌増加を認めた。その一方で、IFN- γ , IL-6, IL-12, TNF- α は検出されなかった。シカ寄生 *Sarcocystis* 属でも同様のケモカイン産生であったが、産生量は *S. fayeri* の二倍以上だった。*S. fayeri* の腸管毒性因子 ADF が RAW264 細胞の TNF- α 遺伝子発現を誘導するとの報告があったが、本研究では認められなかった。RANTES, MIP-1 α , VEGF はアレルギー指標でもあることから、*Sarcocystis* 属の腸管毒性は、アレルギーと炎症反応が相互に関与する可能性がある。

研究分担者

入江隆夫・宮崎大学・宮崎大学農学部准教授

A. 研究目的

これまでの報告に述べた通り、馬肉喫食およびシカ肉喫食による食中毒症状は *Sarcocystis* 属が有する 15 kDa タンパク質；ADF に起因する可能性が示されている [Irikura et al., 2017, Kamata et al., 2014, Kamata, 2012, Saito, 2012] が、詳しい腸管病原性は未だ明らかになっていない。

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, 生きたままヒトに摂取された *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で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, ならびに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

(1) L929 細胞刺激試験の試料調製

ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトが線維芽細胞に与える影響を解析するために, L929 細胞を用いた細胞刺激試験を実施した。

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, 37°C, 5% CO₂ インキュベーターにて培養した。25 cm² 細胞培養フラスコ (greiner) にて 1~3×10⁵ cells/mL 程度に維持されるよう 3~4 日ごとに数回継代した後, 細胞培養用 12 well プレート (TrueLine) に 1.0×10⁵ cells/mL になるよう播種した。継代時には 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) を用いて細胞を剥離した。

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 200 μ L の 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。ブラディゾイト懸濁液 10 μ L 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, Bueker-Turk 血球計算盤 (サンリード硝子) を用いて 1 mL あたりのブラディゾイト数の算出およびブラディゾイト色素試験を行った。

また, 同様の方法で 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。上清中のタンパク質濃度を、NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

(2) L929 細胞刺激試験

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あるいはシスト凍結融解上清を添加し、刺激試験を行った。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)。

ブラディゾイト懸濁液は、算出したブラディゾイト数をもとに、1細胞あたり懸濁液中ブラディゾイト数 (Multiplicity of Infection; MOI) がおよそ 1 および 10 になるよう各ウェルに添加した。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、10%FBS-P/S-DMEM を用いた。

添加後、経時的に顕微鏡下で観察を行った。

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

(1) U937 細胞刺激試験の試料調製

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% CO_2 インキュベーターにて培養した。25 cm^2 細胞培養用

フラスコにて $1 \sim 3 \times 10^5$ cells/mL 程度に維持されるよう 3~4 日ごとに数回継代した後、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. (1) と同じ手法で実施した。

(2) U937 細胞刺激試験

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あるいはシスト凍結融解上清を添加し、刺激試験を行った。ブラディゾイト懸濁液は、MOI がおよそ 1, 10 になるように、シスト凍結融解上清は、濃度が 1/100 となるようにそれぞれ添加した。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。

(3) 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の解析

回収した U937 細胞の培養上清を用いて、上清中に含まれる各種サイトカインの解析を行った。

-20°C で保存した培養上清を解凍し、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ャン

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 細胞刺激試験

L929 細胞刺激試験に使用したウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイトの量は、4°C 保存で 6.5×10^6 bradyzoites/mL (非染色率 93%)、-20°C 保存で 8.0×10^6 bradyzoites/mL (非染色率 69%) であり、凍結融解シスト上清中タンパク質濃度は 1.08 mg/mL であった (表 1)。また、シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトの量は、4°C 保存で 17×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 98%)、-20°C 保存で 96×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 93%) であり、凍結融解シスト上清中タンパク質濃度は 11.754 mg/mL であった (表 1)。

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)。

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 細胞刺激試験に使用したウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイトの量は、4°C 保存で 11×10^6 bradyzoites/mL (非染色率 100%)、-20°C 保存で 7.5×10^6 bradyzoites/mL (非染色率

40%) であり、凍結融解シスト上清中タンパク質濃度は 1.68 mg/mL であった (表 2)。

シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトの量は、4°C 保存で 17×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 98%)、-20°C 保存で 96×10^7 bradyzoites/mL (非染色率 93%) であり、凍結融解シスト上清中タンパク質濃度は 11.754 mg/mL であった (表 2)。凍結融解シスト上清は、*S. fayeri* 凍結融解シスト上清と同じ濃度にするため、添加時に 10 倍希釈した。

ウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイトおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイトどちらで刺激しても、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 4a, b, 5a, b)。

U937 細胞の培養上清を回収し、Quantibody Human Cytokine Array 1 (RayBiotech) を用いて上清中に含まれるサイトカインを解析した結果、ウマ寄生 *S. fayeri* ブラディゾイト添加培養上清では、表に示す通り、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 (表 3, 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 (表 3, 図 6a, b)。

シカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト添加培養上清では、表に示す通り、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 (表 4, 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 (表 4, 図 7a, b)。

D. 考察

ウマおよびシカ寄生 *Sarcocystis* 属ブラディゾイト, 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という報告がある [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, これが腸管内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。

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。前述の通り, 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、シカ寄生 *Sarcocystis* 属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、シカ寄生 *Sarcocystis* 属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* とシカ寄生

Sarcocystis 属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。

また、どちらでも産生増加を認めたサイトカインおよびケモカインに着目すると、RANTES や MIP-1 α がある。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, pp 221-223. 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	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℃ MOI=1	4℃ MOI=10	-20℃ MOI=1	-20℃ 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°C MOI=1	4°C MOI=10	-20°C MOI=1	-20°C 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

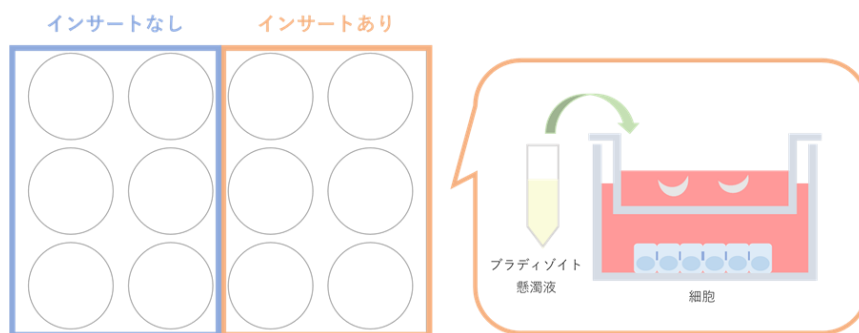


図1 L929 細胞刺激試験概要図

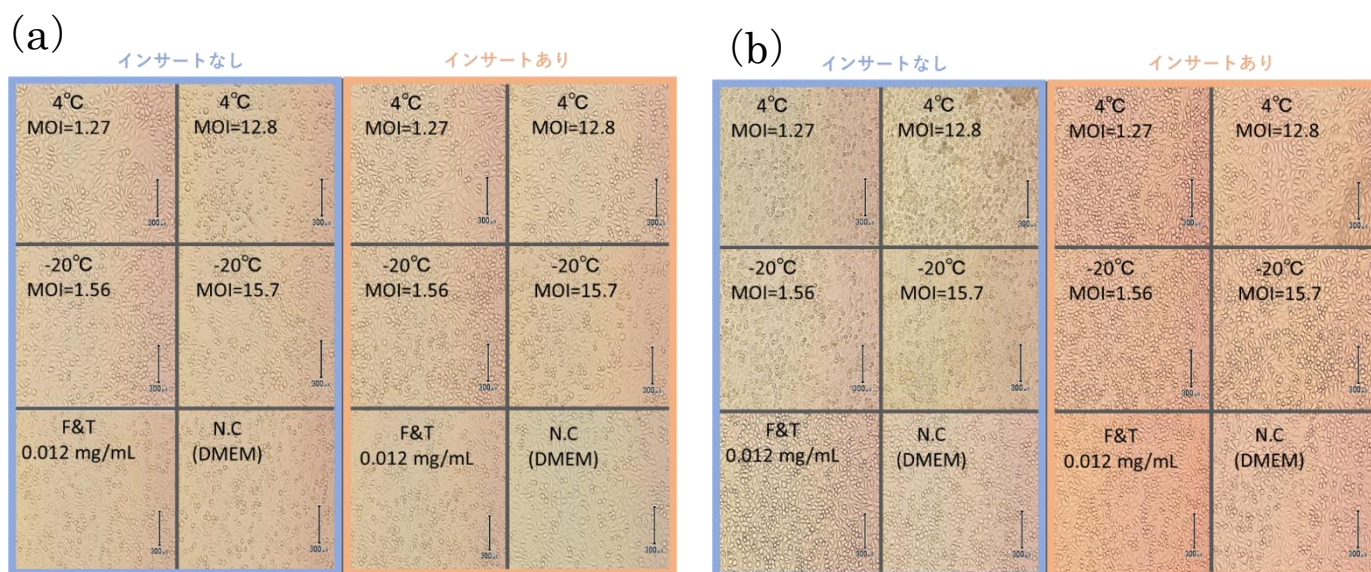


図2 *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液を用いた L929 細胞刺激試験結果
(a) 添加前, (b) 添加 9 時間後

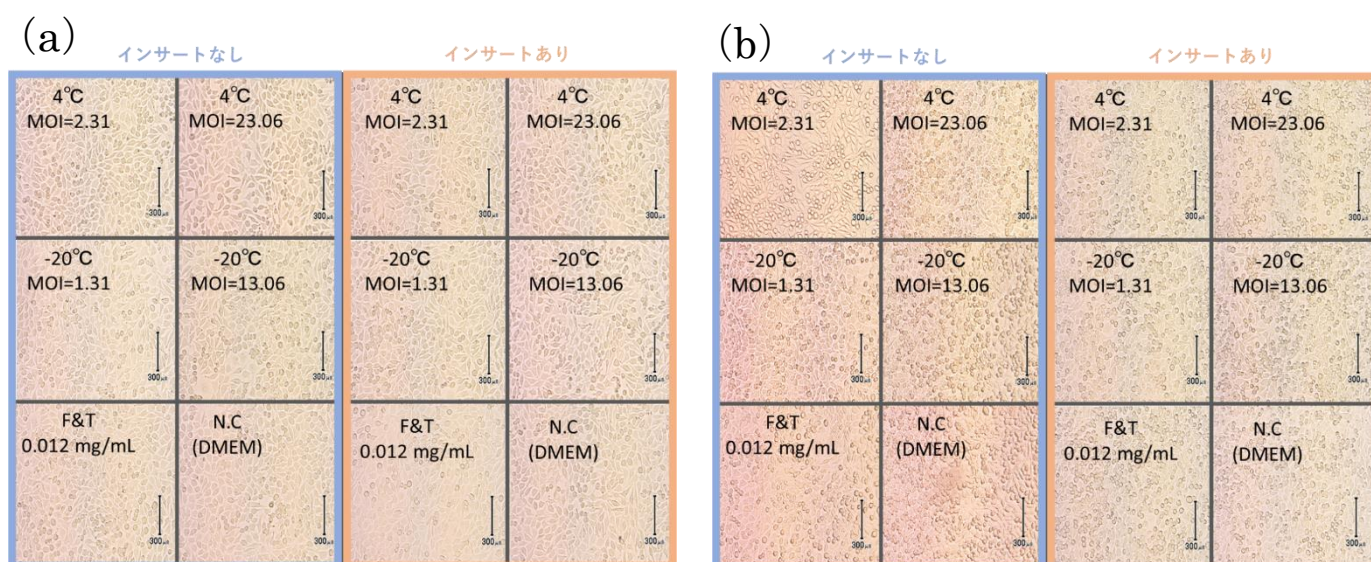


図3 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いた L929 細胞刺激試験結果
(a) 添加前, (b) 添加 24 時間後

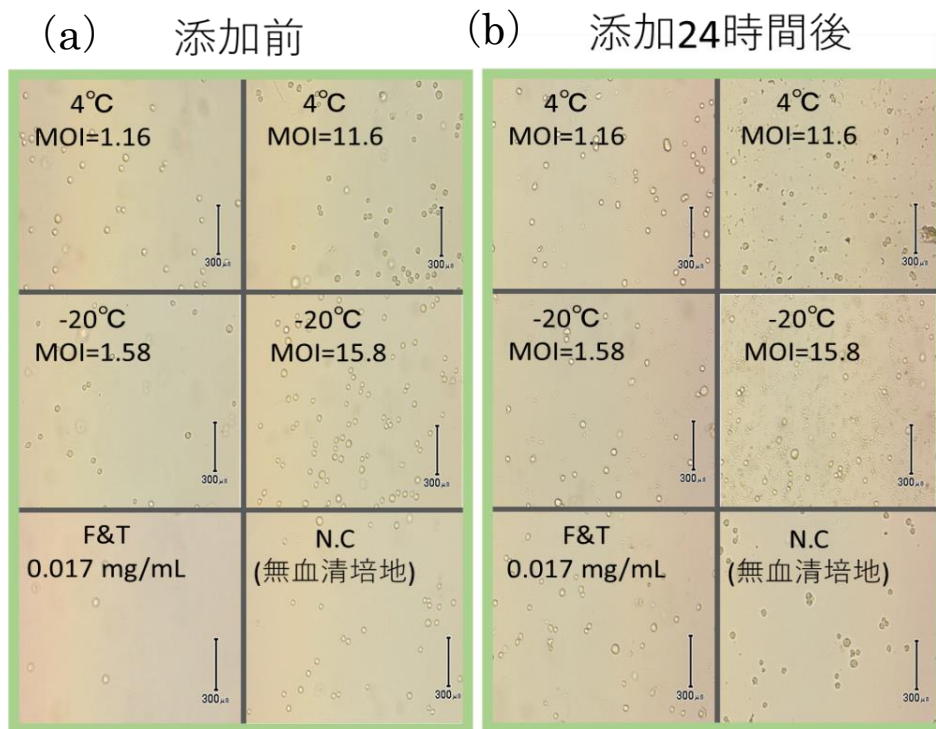


図4 *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液を用いた U937 細胞刺激試験結果
(a) 添加前, (b) 添加 24 時間後

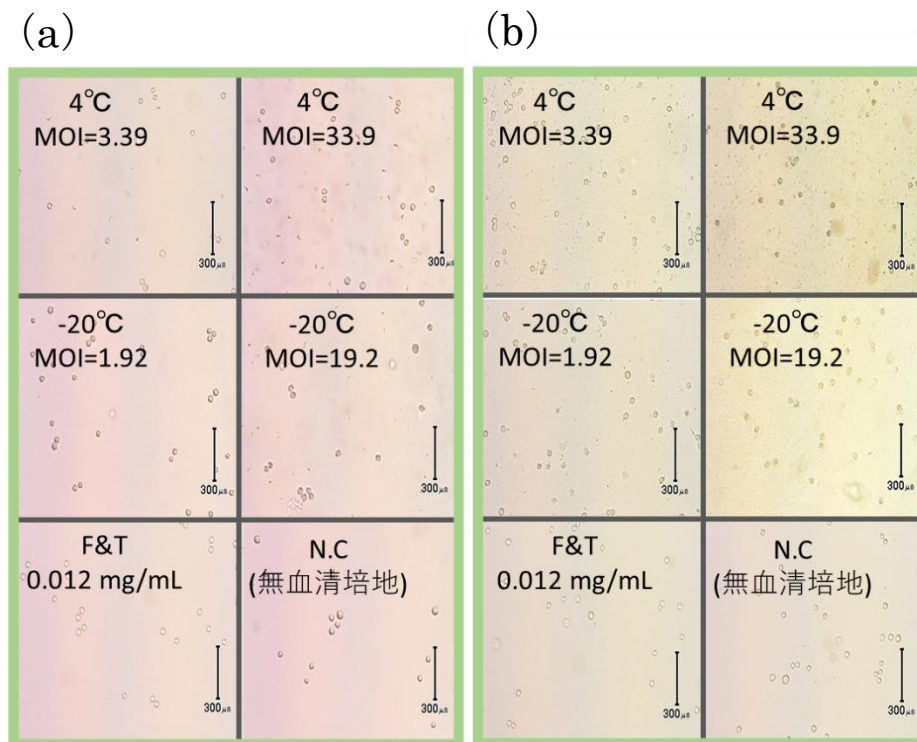


図5 シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液を用いた U937 細胞刺激試験結果
(a) 添加直後, (b) 添加 24 時間後

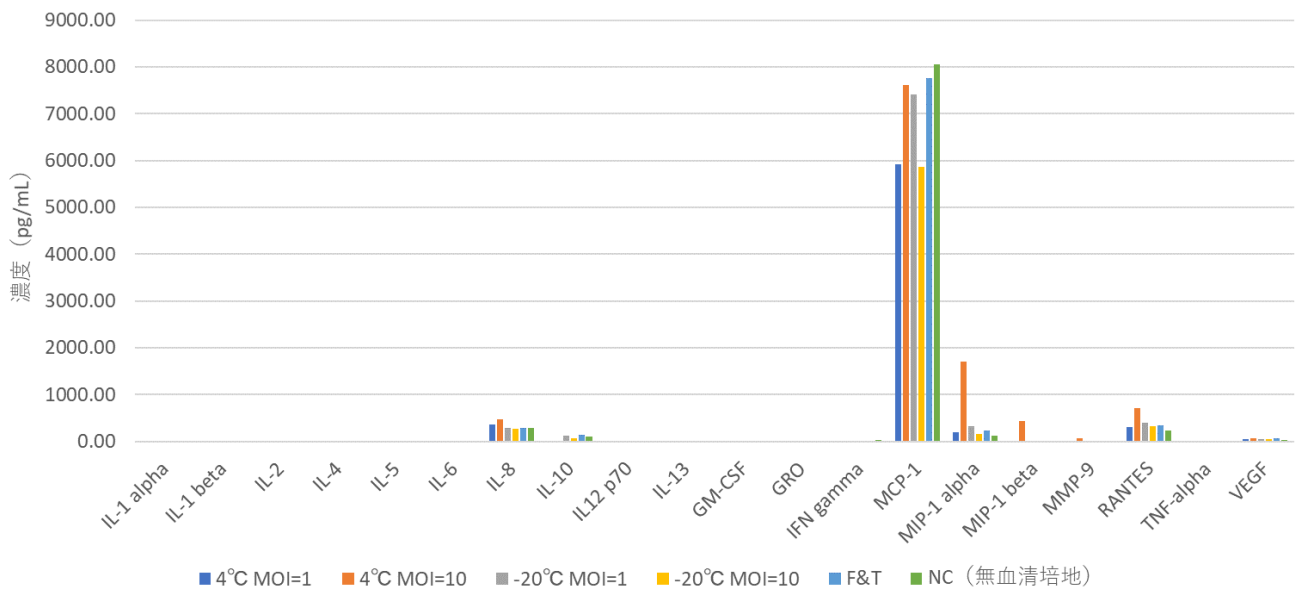


図 6 (a) *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果

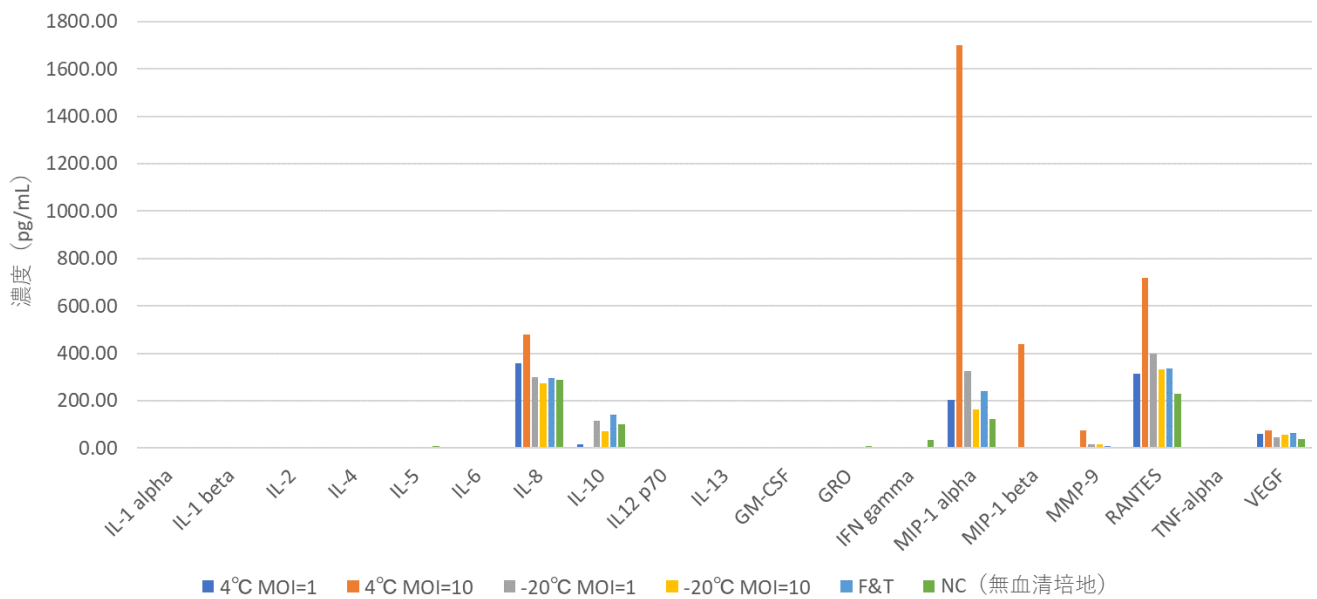


図 6 (b) *S. fayeri* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカ

イン解析結果 (MCP-1 を除く)

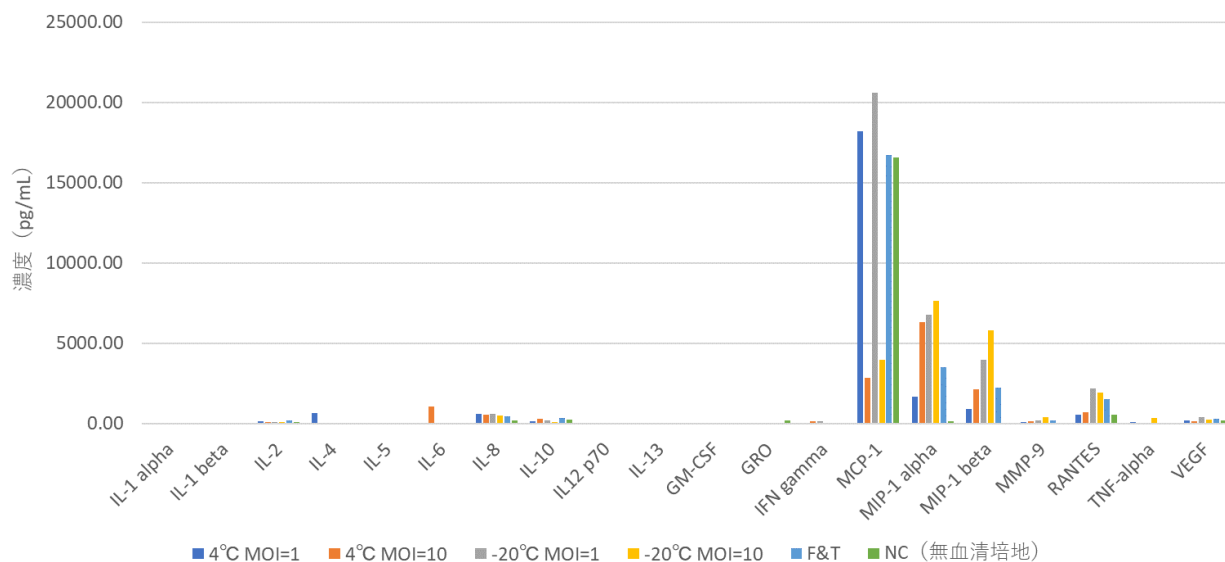


図 7 (a) シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果

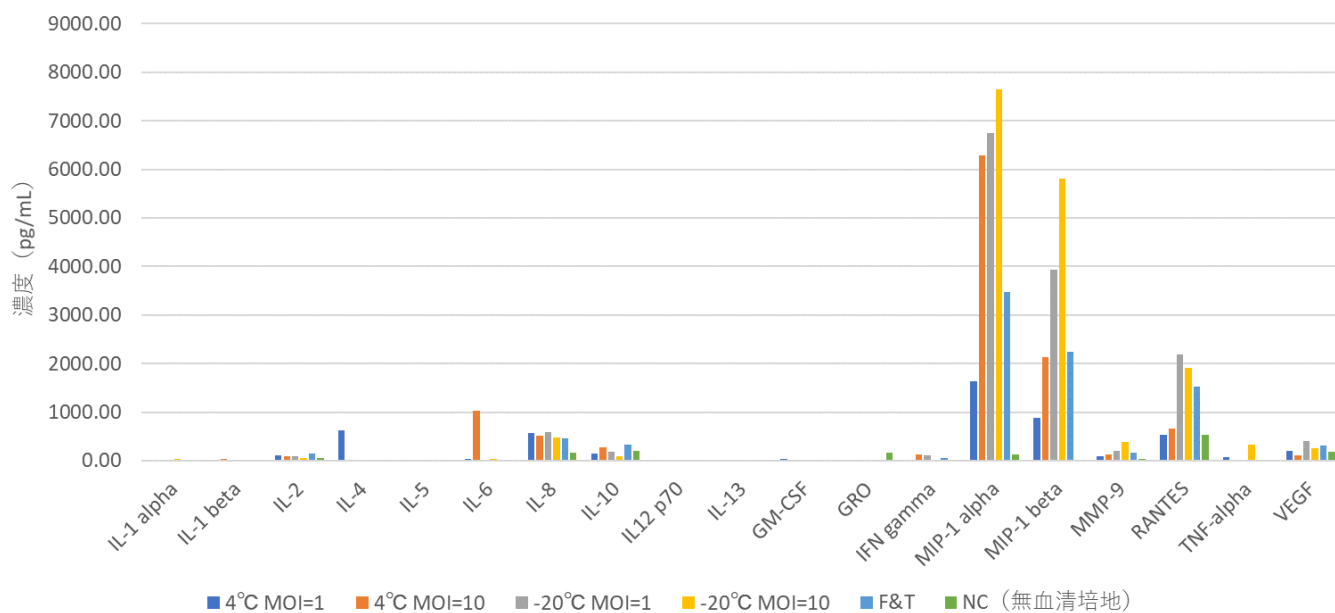


図 7 (b) シカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果 (MCP-1 を除く)

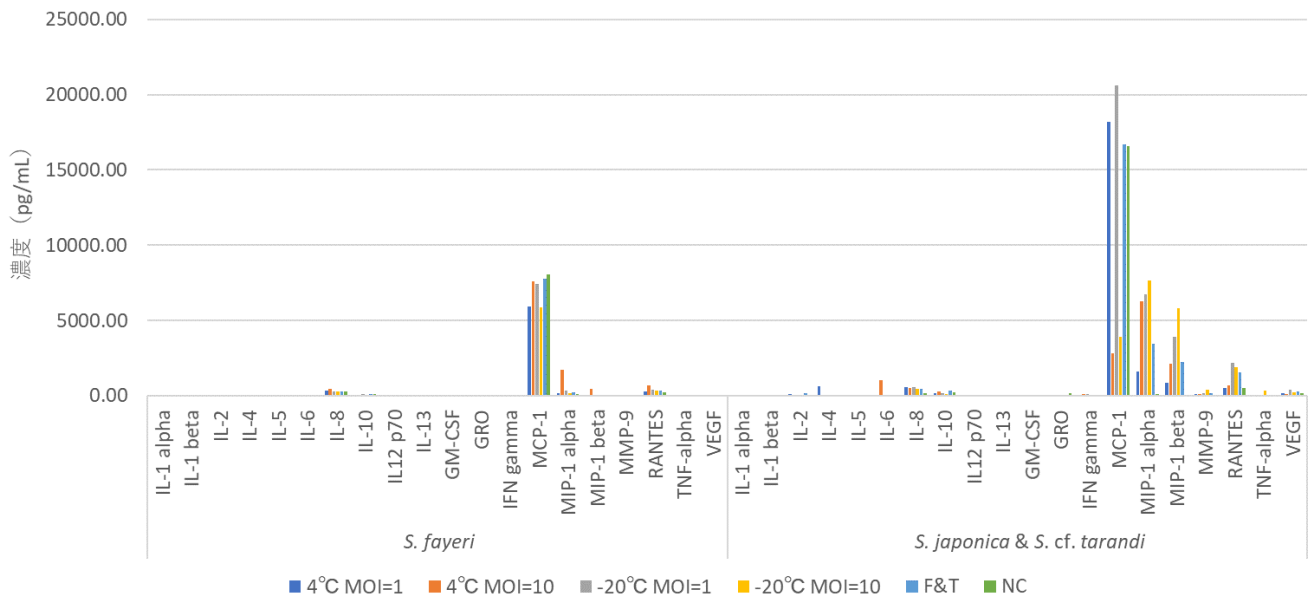


図 8 (a) *S. fayeri* およびシカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果の比較

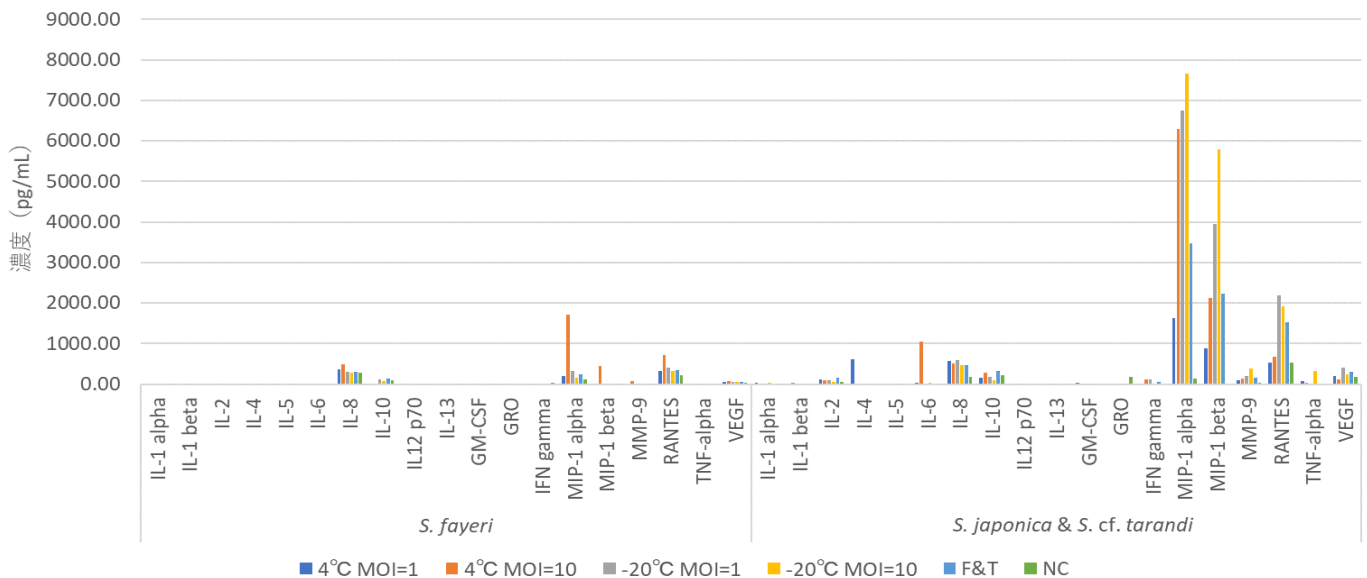


図 8 (b) *S. fayeri* およびシカ寄生 *S. japonica* n. sp. および *S. cf. tarandi* ブラディゾイト懸濁液刺激 U937 細胞培養上清サイトカイン解析結果の比較 (MCP-1 を除く)