

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09185

研究課題名(和文)ジビエ住肉胞子虫による寄生虫性食中毒のリスク評価

研究課題名(英文) Risk assessment for parasitic food poisoning caused by Sarcocystis species in sika deer

研究代表者

阿部 仁一郎 (Abe, Niichiro)

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・微生物部・総括研究員

研究者番号：10321936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：わが国において、野生のシカに寄生する住肉胞子虫の分類は不明であった。本研究では形態学的、遺伝学的手法により、国産野生シカに少なくとも7種の存在を明らかにした。すなわち、3つの新種(*Sarcocystis japonica*, *S. matsuoae*, *S. gjerdei*)と2つの既知種(*S. pilosa*, *S. ovalis*)、さらに既知種に近縁な2つの未同定種(*S. cf. tarandi*, *S. cf. taeniata*)である。本研究ではこれら7種を鑑別するマルチプレックスPCR法とリアルタイムPCR法を確立し、その手法は食中毒での原因種の同定や固有宿主を同定する際に有効な手段となるであろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の野生シカに寄生する住肉胞子虫の分類は、形態類似種との鑑別が困難なため不明であった。本研究ではシカ寄生種の分類に遺伝学的手法を導入することで新種の存在を示し、これまで混沌としたわが国のその分類に明確な方向性をもたらした。近年、ジビエ嗜好の高まりとともに、不適切な調理による健康被害が発生している。シカ肉に寄生する住肉胞子虫が原因とされているが寄生種の同定には至らず、効果的な検査法も確立されていなかった。本研究成果である住肉胞子虫の分類及びマルチプレックスPCRやリアルタイムPCRによる寄生種の同定法は、食中毒事例での原因究明や固有宿主の探索に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In Japan, the classification of *Sarcocystis* species found in sika deer has been unclear. The present study has provided molecular and morphological evidence for the presence of seven *Sarcocystis* spp., including three new species, in sika deer in Japan, that is, *S. japonica* n. sp., *S. cf. tarandi*, *S. matsuoae* n. sp., *S. pilosa*, *S. gjerdei* n. sp., *S. cf. taeniata* and *S. ovalis*. Multiplex PCR and real-time PCR assays capable of identifying the seven species found in this study has been developed and might become useful in future studies aimed at identifying the causative species in *Sarcocystis* related food poisoning or the definitive hosts of these species.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生虫 寄生原虫 住肉胞子虫 シカ ジビエ 食品衛生

1. 研究開始当初の背景

住肉胞子虫は食物連鎖を巧みに利用し、肉食動物と草食動物の間を行き来する寄生性の原虫である。草食動物の体内では、肉眼的に識別困難な微小なサルコシストと呼ばれる形態でその筋肉に寄生している。2011年に、馬肉の生食(馬刺し)を原因とする新たな食中毒の病原体としてウマの住肉胞子虫が同定され、その寄生実態が明らかになるとともに予防法や検査法は全国に周知されることになった。近年、シカやイノシシ等の狩猟の対象となる野生動物を食用として利用するジビエ振興が国内で拡大する中、シカ肉の不適切な調理による食中毒事例が発生している。その原因もウマ住肉胞子虫と同様の毒素を有するとされる住肉胞子虫であるが、わが国のシカには形態学的鑑別が困難な複数種が寄生しその分類も混沌とした状況であったことから、原因寄生種の同定のみならず、その寄生実態と検査法も確立されていなかった。

2. 研究の目的

前述の研究背景をもとに本研究では、わが国のシカに寄生する住肉胞子虫の分類を明確にすること、その寄生実態の一端を明らかにすること、寄生種を特異的に同定する検査法を開発すること、市場流通シカ肉での寄生実態の一端を明らかにすることにより、住肉胞子虫の分類等に関して寄生虫学に新たな知見をもたらす、ジビエ特にシカ肉喫食に起因した食中毒事例での効果的な原因究明、予防施策に貢献することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 野生のシカに寄生する住肉胞子虫の分類学的検討

シカ寄生住肉胞子虫の分類におけるミトコンドリアチトクロームオキシダーゼサブユニット1遺伝子(*cox1*)解析の有効性の検討

私たちの先行研究(松尾ら、ホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* およびニホンイノシシ *Sus scrofa leucomystax* における住肉胞子虫の高寄生率とそれらの筋肉より分離された *Sarcocystis* spp. と *Hepatozoon* sp. の遺伝子解析、日本野生動物医学会誌、21、35-40、2016)で解析した岐阜県産ホンシュウジカ由来住肉胞子虫のDNAサンプルを用いて、18SリボソームRNA遺伝子(18S rDNA)の解析では分類困難な株間の鑑別に *cox1* の解析が有用であるかを検討した。

cox1 解析の有効性の確認と新種の発見、寄生種の分布状況の調査

シカ寄生種の鑑別に *cox1* 領域をターゲットにした遺伝子解析が有効であることを確認し、岐阜県産ホンシュウジカに新種の存在が推測されたので、詳細な形態情報等の追加データを得るために、再度、岐阜県産ホンシュウジカの筋肉の一部を検体として採取した。個体ごとにチャック付きユニパックに入れ検査まで冷凍保存した。解凍後にサルコシスト陽性の53検体を選別し、各検体より実体顕微鏡下で形態が異なる複数のサルコシスト(220サルコシスト/53個体)を分離し、詳細な形態観察と遺伝子解析に供した。

(2) シカ寄生種の分子同定法の検討

マルチプレックスPCRによる鑑別

サルコシストの微細形態と *cox1* 解析により、岐阜県産ホンシュウジカには形態学的、遺伝学的に異なる7種の存在が確認された。そこでこれら7種の *cox1* シーケンスデータを基に、各々に特異的なPCRプライマーを設計し、マルチプレックスPCRによる種鑑別法を検討した。

リアルタイムPCRによる鑑別

マルチプレックスPCR同様に、シカ寄生住肉胞子虫の *cox1* データを基に7種各々に特異的なプライマー・プローブを設計し、その有効性を検討した。

(3) 市場流通シカ肉における住肉胞子虫の寄生状況の調査

日本各地のシカに寄生する住肉胞子虫の寄生実態の一端を明らかにするために、市場流通のシカ肉商品を購入し住肉胞子虫の検出を試みた。購入したシカ肉の産地は、北海道(2検体)、兵庫県(2検体)、山口県(2検体)、愛媛県(1検体)、京都府(1検体)であった。シカ肉は全て真空冷凍パック包装であった。なお、和歌山県内で捕獲された個体の1検体(冷凍保存)についても検査に供した。

4. 研究成果

(1) 野生のシカに寄生する住肉胞子虫の分類学的検討

シカ寄生住肉胞子虫の分類におけるミトコンドリアチトクロームオキシダーゼサブユニット1遺伝子(*cox1*)解析の有効性の検討

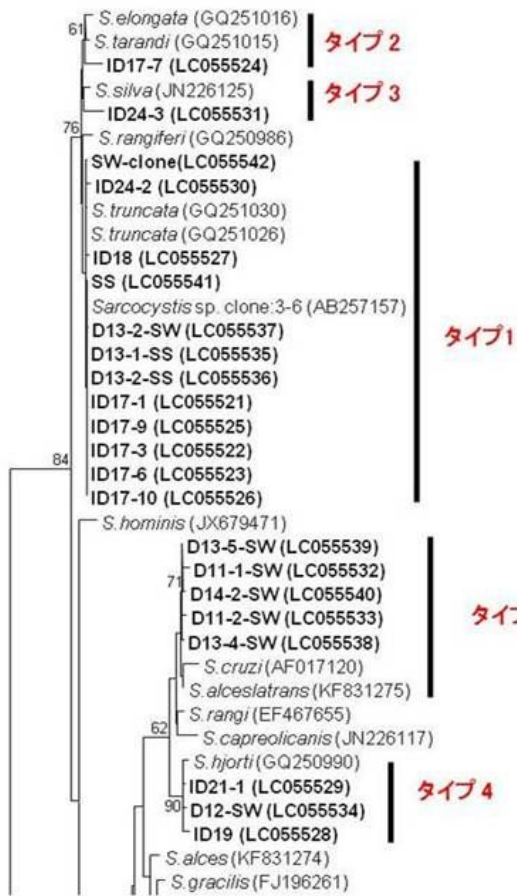


図1 18S rDNA解析による22株の分子系統樹

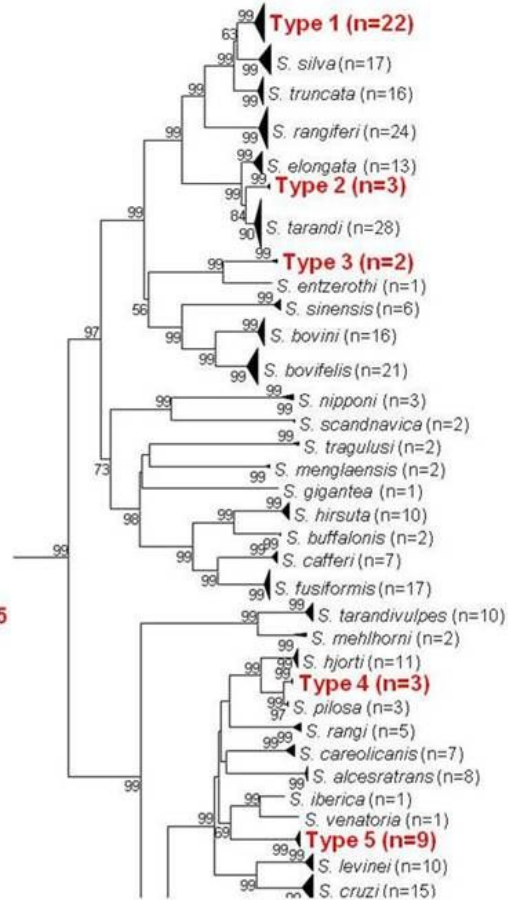


図2 cox1解析による22株の分子系統樹

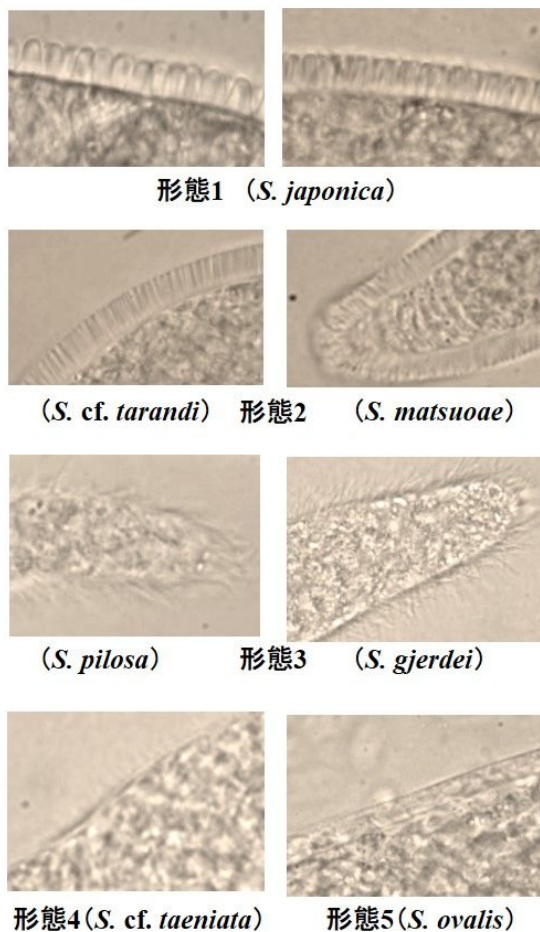
18S rDNAの解析では既知種との鑑別が困難であった9個体からの22株は(図1、タイプ1~5)、cox1解析により5つのタイプ(Type 1~5: 22株からの複数のクローンのデータによるため解析数nは多い)に明確に分類され、Type 1、3、5は新種と考えられた。一方、Type 2と*Sarcocystis tarandi*との異同は更なる検討が必要であった。Type 4はリトアニアのニホンジカより新種として報告された*S. pilosa*であった(図2)。

cox1解析の有効性の確認と新種の発見、寄生種の分布状況の調査

220個のサルコシストについて形態学的観察を行ったところ、それらは顕微鏡下での外観、壁の絨毛構造等の違いから5つの形態タイプ(形態1~5)に分類され、比較的大きなサルコシスト(約1200×220 μm)で壁の絨毛が親指状のもの(形態1)、大きさが形態1より小さく壁の絨毛が細長い指状の形態2(約670~1100×80~110 μm)、細長い外観(約1000×80 μm)で壁の絨毛が毛状の形態3、大きさが小さく(約450×70 μm)壁が平滑または絨毛が不明瞭な形態4、外観が卵形(825×363 μm)で壁の絨毛が不明瞭な形態5であった(図3)。

図4に示したように、cox1解析により、Type 1、3、5を新種と同定し、各々に新種名*S. japonica*、*S. matsuoae*、*S. gjerdei*を提唱した。Type 4と7は、各々既知種である*S. pilosa*、*S. ovalis*と同定された。

図3 住肉胞子虫7種のサルコシスト壁の形態



形態1 (*S. japonica*)

(*S. cf. tarandi*) 形態2 (*S. matsuoae*)

(*S. pilosa*) 形態3 (*S. gjerdei*)

形態4(*S. cf. taeniata*)

形態5(*S. ovalis*)

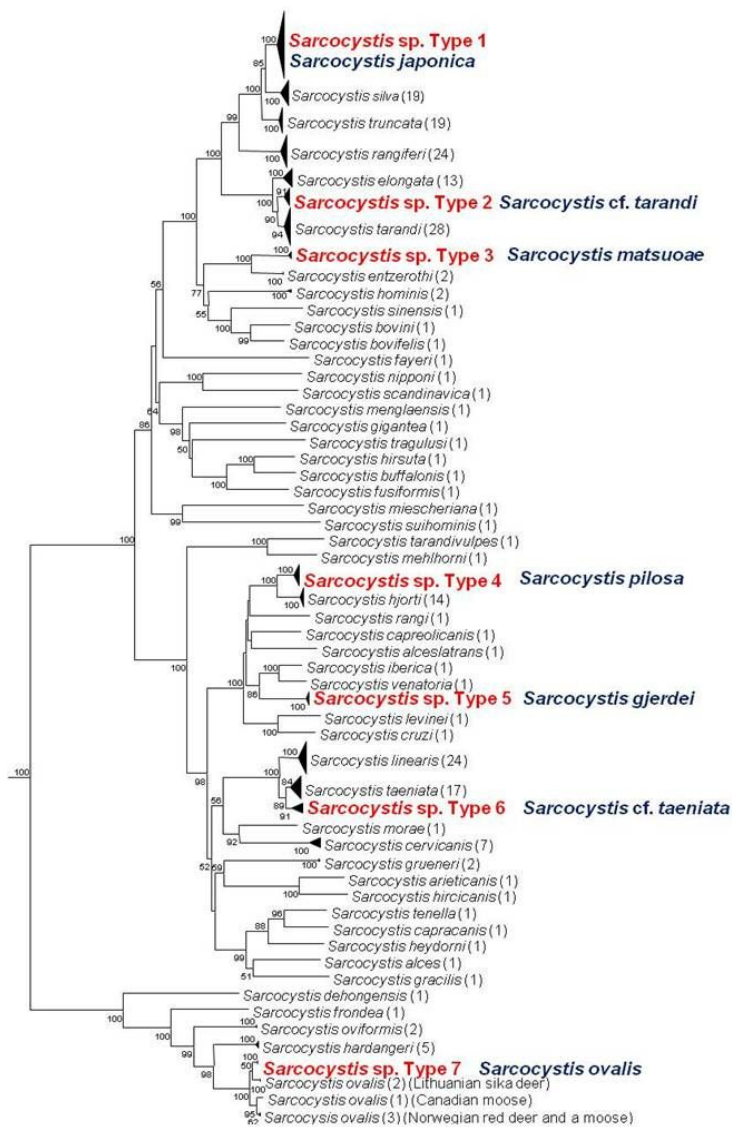


図4 検出された7種と既知住肉胞子虫との分子系統樹

Type 2 と 6 は形態学的、遺伝学的に各々 *S. tarandi* または *S. taeniata* と考えられたが、海外の分離株とはクラスターが異なることから両種の亜種（サブタイプ）である可能性もあり、今回の研究では *S. cf. tarandi*、*S. cf. taeniata* という同定に留めた。両種の新種の是非については今後解析株数を更に増やす等、再検討が必要である。また、*cox1* 解析で明らかとなった寄生種のサルコシストの形態は、*S. japonica* が形態 1、*S. cf. tarandi* と *S. matsuoae* が形態 2、*S. pilosa* と *S. gjerdei* が形態 3、*S. cf. taeniata* が形態 4 および *S. ovalis* が形態 5 であった（図 3）。

これら 7 種類の住肉胞子虫は、調査した 53 個体中、*S. japonica* は 50 個体（94.3%）、*S. pilosa* は 29 個体（54.7%）、*S. cf. tarandi* は 10 個体（18.9%）、*S. gjerdei* は 8 個体（15.1%）、*S. matsuoae* は 6 個体（11.3%）、*S. cf. taeniata* は 6 個体（11.3%）、*S. ovalis* は 1 個体（1.9%）より検出され、新種 *S. japonica* は岐阜県産ホンシュウジカにおいては主要な寄生種であることが判明した。過去に日本各地のシカより検出されていた住肉胞子虫もその形態、18S rDNA の分子系統比較から今回の 7 種のいず

れかであると考えられた。一方、兵庫県下のシカより 18S rDNA の解析で *S. cervicanis* に近縁な種類が検出されていることから、わが国の野生シカには少なくとも 8 種類存在していると考えられた。

（2）シカ寄生種の分子同定法の検討

マルチプレックス PCR による鑑別

7 種住肉胞子虫の *cox1* データに基づき作製された種特異プライマーの組み合わせと PCR 反応条件を検討し、*S. japonica*、*S. matsuoae*、*S. pilosa*、*S. gjerdei* の種間を特異的に鑑別できるプライマーセットと、*S. cf. tarandi*、*S. cf. taeniata*、*S. ovalis* の種間鑑別が可能なプライマーセットを用いてマルチプレックス PCR を行ったところ、220 個のサルコシストの種鑑別に有効であった。

リアルタイム PCR による鑑別

シカ寄生住肉胞子虫の *cox1* データに基づき、種特異遺伝子の検出と定量を目的としたリアルタイム PCR の構築を試みた。作製された 7 種住肉胞子虫に特異的なプライマーとプローブセットは各々の寄生種のみ反応し、マルチプレックス PCR よりも高感度であった。今後はマルチプレックス PCR 同様に一つまたは二つの反応チューブで複数の種類を鑑別できるマルチプレックスリアルタイム PCR の構築と定量法の検討が必要である。

（3）市場流通シカ肉における住肉胞子虫の寄生状況の調査

表 1 に示したように、住肉胞子虫は調査した 5 産地全ての検体より検出され、マルチプレックス PCR により複数種の寄生が確認された。これにより、岐阜県産ホンシュウジカより検出された新種を含む複数の種類は日本各地の野生シカに広く寄生していると考えられる。また、各産地のサルコシストより分離したブラディゾイトは、トリパンブルー染色で染色されたことから、全て死滅していると考えられた。

表1 市場流通シカ肉における住肉胞子虫の寄生状況

	<i>S. japonica</i>	<i>S. cf. tarandi</i>	<i>S. pilosa</i>	<i>S. gjerdei</i>	<i>S. cf. taeniata</i>	<i>S. ovalis</i>
北海道産	-	+	+	-	+	-
京都府産	-	-	+	-	-	-
兵庫県産	+	-	+	+	+	-
山口県産	-	+	-	+	+	-
愛媛県産	+	-	+	+	+	-
和歌山県産	+	+	+	-	-	+

+ : 検出 - : 検出せず

表2 シカ肉の喫食に起因して食中毒様症状を呈した有症事例

事例	発生年月	発生場所	原因シカ肉	調理方法	患者数／喫食者数
1	2011年12月	滋賀県	エゾシカ	ロースト(加熱不十分)	4/18
2	2015年12月	滋賀県	エゾシカ	ロースト(加熱不十分)	10/17
3	2017年1月	茨城県	ホンシュウジカ	生食(ユッケ)、焼肉	1/4*
4	2018年6月	和歌山県	ホンシュウジカ	生食(鹿刺し)	3/3
5	2019年8月	新潟県	エゾシカ	ロースト(加熱不十分)	30/52

*ユッケを喫食したのは発症した1名のみ

近年、シカ肉の生食または加熱不十分な調理品の喫食に起因した食中毒事例が5例発生しており(表2)、その原因微生物としてシカ肉に寄生した住肉胞子虫が強く疑われている。和歌山県の事例を除いてその原因寄生種は明らかにされていないが、それらの18S rDNA解析のデータから判断すると、本研究で明らかとなった種類のいずれかである可能性が高いと考えられる。和歌山県の事例では、18S rDNAの解析により*S. japonica*に近縁な*S. truncata*によると報告されているが(Ota T. et al. First case report of possible *Sarcocystis truncata*-induced food poisoning in venison, Intern. Med. 58, 2727-2730, 2019; 山本ら, *Sarcocystis*属が寄生していたシカ肉を生で喫食したことによる食中毒事例, 日獣会誌, 73, 111-115, 2020), *cox1*解析のデータが示されていないので、原因種が*S. truncata*であるかどうかは今後の再解析が必要と考えられる。表1に示したように、私たちが和歌山県産のシカより検出した住肉胞子虫には、1個体のデータではあるが*S. japonica*が含まれていた。食中毒としての届出には、ウマ住肉胞子虫(*S. fayeri*)やナナホシドア(*Kudoa septempunctata*)の様に、その原因微生物の同定が必要である。ウマ住肉胞子虫に含まれ食中毒の原因となる蛋白毒素は、シカ、イノシン等に寄生する住肉胞子虫にも含まれていることから、サルコシストが濃厚に寄生した肉を加熱不十分な状態で喫食することで食中毒が引き起こされる可能性がある。今後、同様の食中毒事例が発生した場合、正確な同定のため*cox1*解析を併用することが望まれる。また、私たちが確立したマルチプレックスPCRまたはリアルタイムPCRは7種を容易に鑑別できるスクリーニング法なので、残品や患者便での応用が期待される。

ジビエブームの中、私たち消費者はインターネットを利用してジビエを手軽に産地から取り寄せることができるようになった。東京都の調査(神門ら、都内に流通するイノシン肉における住肉胞子虫の寄生実態と遺伝学的系統解析, Clin. Parasitol. 30, 98-100, 2019)によると、市場流通のイノシン肉28検体中、冷蔵6検体、冷凍12検体から住肉胞子虫が検出され、冷蔵6検体中3検体からの住肉胞子虫は生存していた。また、検体によっては食中毒を引き起す可能性があるほど濃厚寄生していた。シカやイノシンには住肉胞子虫以外に、肺吸虫やトキソプラズマ等ヒトに健康被害をもたらす他の寄生虫も感染している。さらにE型肝炎ウイルスや腸管出血性大腸菌等の病原体に汚染されていることもある。したがって、その喫食による健康被害を予防するためには中心部まで火が通るようにしっかり加熱してから食べることが重要である。

住肉胞子虫の固有宿主は極一部の種類で明らかとなっているが、寄生種の多くが固有宿主不明であることから生活環も明らかではない。ヘビを固有宿主とする寄生種がヒトに感染した場合、ヒトは中間宿主として重篤な健康被害を受けることがある。他の野生動物を固有宿主とする寄生種がヒトに感染した場合も、ヒトは偶発的な中間宿主となり何らかの病害を被る可能性がある。このため、自然界での住肉胞子虫の固有宿主を特定しておくことは、ヒトを含めた中間宿主における住肉胞子虫症を予防する上で重要と考えられる。今後、固有宿主の可能性のある野生動物での調査が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niichiro Abe, Kayoko Matsuo, Junji Moribe, Yasuhiro Takashima, Takashi Baba, Bjorn Gjerde	4. 巻 118
2. 論文標題 Molecular differentiation of five Sarcocystis species in sika deer (<i>Cervus nippon centralis</i>) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (<i>cox1</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 1975-1979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00436-019-06319-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Niichiro Abe, Kayoko Matsuo, Junji Moribe, Yasuhiro Takashima, Takao Irie, Takashi Baba, Bjorn Gjerde	4. 巻 10
2. 論文標題 Morphological and molecular characteristics of seven Sarcocystis species from sika deer (<i>Cervus nippon centralis</i>) in Japan, including three new species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife	6. 最初と最後の頁 252-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijppaw.2019.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部仁一郎, 森部絢嗣, 高島康弘, 松尾加代子, 馬場孝
2. 発表標題 岐阜県産ホンシュウジカに寄生する住肉胞子虫の形態と遺伝子解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部仁一郎、松尾加代子、森部絢嗣、高島康弘
2. 発表標題 岐阜県産ホンシュウジカとイノシシから検出された住肉胞子虫の遺伝子解析
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 阿部仁一郎、松尾加代子、森部絢嗣、高島康弘
2. 発表標題 岐阜県産ホンシュウジカとイノシシから検出された住肉胞子虫の遺伝子解析
3. 学会等名 第73回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高島 康弘 (Takashima Yasuhiro) (20333552)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	
研究分担者	森部 絢嗣 (Moribe Junji) (50456620)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	