

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500998

研究課題名(和文) 獣肉中の寄生虫による健康被害：新規寄生虫毒素性食中毒の解析

研究課題名(英文) Hazard of animal meat containing parasites: analysis of a new parasite-toxic food poisoning

研究代表者

鎌田 洋一 (KAMATA, Yoichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20152837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 330,000円

研究成果の概要(和文)：獣肉は加熱や燻製など、加工して食することが通常であるが、馬肉は馬刺しとして生での喫食が定着している。本研究で、馬肉中に含まれるフェイヤー住肉胞子虫シストの抽出物中に、下痢毒性を持つタンパク質を同定した。精製した毒性タンパク質の、内部アミノ酸配列を決定した。同配列に基づき、degenerate primerを用いて、毒性タンパク質の遺伝子をクローニングした。毒性タンパク質はトキソプラズマなどのアクチン脱重合因子と相同性を示した。シカ肉にも同様の住肉胞子虫の危害があり、シカ肉を喫食しての食中毒も発生していた。本研究によって、寄生虫毒素性食中毒の概念が確立された。

研究成果の概要(英文)：Animal meat is generally served as a cooked and processed food, but some countries including Japan have a food habit to eat raw animal meat. "Basashi" is slices of raw horse meat, like sashimi and has been recognized as one of causes for food poisoning. A parasite, *Sarcocystis fayeri*, was found in the horse meat that was eaten by patients. A protein was purified and determined its enterotoxigenic activity. An internal sequence of amino acid of the toxic protein was determined and toxin gene was cloned by the PCR method using degenerate primers designed from the amino acid sequence. The protein has a homology to an actin depolymerizing factor of *Toxoplasma* and others. Consumption of raw deer meat containing *Sarcocystis* parasite also caused food poisoning. Based on these facts, a parasite-toxin food poisoning has been proposed as a new category of foodborne diseases.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食中毒 寄生虫 住肉胞子虫 毒素 馬肉 シカ肉 アクチン脱重合因子

1. 研究開始当初の背景

ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジといった家畜だけでなく、シカやイノシシ等の野生動物を中間宿主とする寄生虫に、住肉胞子虫がある。住肉胞子虫は、1980年代に、ブタの筋肉中に検出されたのが、最初の学術記載となっている。我が国の食習慣の一つに、住肉の生食がある。馬肉の生食、すなわち馬刺しの喫食によって食中毒が発生していた。

馬刺しは一部地域の特産で、その地域では年間30例程度の、馬肉食中毒が起こっていた。地方衛生研究所による綿密な検査にもかかわらず、原因として推定される食中毒危害性細菌およびウイルスが検出されなかった。一方、家畜には住肉胞子虫が寄生しているが、加熱・燻製・冷凍などの処理で、同寄生虫の危害は制御されていると推定されていた。この推定から、馬刺しは、生で喫食するため、住肉胞子虫の危害を受ける危険性を排除できない状況だった。

一方、シカ肉も、鹿刺しと称して、生で提供されてきた過去がある。最近では野生シカの駆除とその処理体の有効利用で、野生シカ肉を食肉へと利用することを推奨する自治体もでてきた。シカが野生であるため、病原体の保有状況がわからず、加熱が推奨されてはいた。しかしながら、施設のシカ肉提供状態は様々で、シカステーキとして、顧客に自由にシカ肉を焼く行程を任せてしまうこともある。その際には、生食として、喫食すると同様の危害性を考えねばならない。2012年に、シカ肉を喫食しての食中毒で、原因微生物が同定できない事例が発生した。

2. 研究の目的

馬肉食中毒の原因を究明し、その病原体を同定する。同病原体の各種の性状を分析把握するとともに、食中毒症状発現機構を解析する。また、生肉として喫食される可能性のある動物肉としてのシカ肉による食中毒事例

を解析する。

3. 研究の方法

馬肉食中毒事例における、喫食状況を整理し、馬肉が原因食であることを、疫学的に調査した。

患者喫食馬肉について、住肉胞子虫の危害を疑い、顕微鏡検査を行った。シストを発見した場合、ピンセット等で回収した。

馬肉中から住肉胞子虫シストを回収し、そのタンパク質を抽出した。過去の報告から、同タンパク質中に、実験動物への致死毒性のある、分子量が15 kDaのタンパク質が示唆されていた。シスト抽出タンパク質について Superdex カラムによるゲル濾過を行い、分子量同タンパク質を分離し、15 kDa タンパク質を回収した。濃縮した15 kDa タンパク質を、ウサギの腸管ループ内に接種し、液体貯留を誘発するか検証した。

15kDa タンパク質について SDSPAGE を行い、15 kDa タンパク質をゲルとともに切り出した。トリプシンを、同タンパク質を含んだゲルに加え、ゲル内タンパク質消化を行った。ゲルから遊離してきたペプチドの、アミノ酸配列を、N末端から順次決定した。

得られたアミノ酸配列について、BLAST による相同性検索を行った。

加熱不十分なシカ肉で発生した食中毒事例を分析した。患者喫食シカ肉を顕微鏡および遺伝子検査し、住肉胞子虫の汚染の有無を検定した。

住肉胞子虫を含んだシカ肉の組織標本作製した。上述の15 kDa タンパク質に対して作製した、免疫抗体を標本に作用させ、通常の免疫組織化学手技を適応した。

4. 研究成果

患者喫食馬肉より白色のシストが分離された。顕微鏡検査の結果、同シストはフェイヤー住肉胞子虫と同定された。馬肉からは食

中毒危害性の細菌は分離されなかった。

同孢子虫のシストからタンパク質群を抽出し、分子量が 15 kDa 毒性のタンパク質を分離した。このたんぱく質を、原因物質の候補タンパク質とした。同タンパク質を実験動物の腸管ループ内に注入したところ、ループは腫脹し、内部に液体を貯留させた。この結果は、15 kDa タンパク質に下痢誘発性があることを証明している。

15KDa タンパク質を電気泳動で分離した。ゲル中に同タンパク質が含まれる状態でトリプシンを加え、タンパク質を消化させ、遊離するペプチドを捕捉した。逆相の HPLC を行い、ペプチドを分離した。2 種類のペプチドについて、N 末端からのアミノ酸配列を求めたところ、以下の配列となった。

ペプチド 1 : IQETEIVVEK

ペプチド 2 : RLDGVAALALEAHDLSDFET

上記のアミノ酸配列について、BLAST による相同性検索を行ったところ、*Toxoplasma gondi* および *Eimeria tenella* の、アクチン脱重合因子と高い一緻性を示した。

同タンパク質をコードする遺伝子をクローニングした。上記のペプチドについて、アミノ酸配列に対応させて塩基を合成し、それをプライマーとして用いて、住肉孢子虫の RNA から調製した cDNA から、PCR 法によって遺伝子を増幅した。増幅産物をクローニングベクターに挿入し、塩基配列を決定した。

15KDa タンパク質は約 350 bp のタンパク質としてクローニングされた。求めた塩基配列の全長について、BLAST による相同性検索を行ったところ、トキソプラズマおよびコクシジウムの脱重合因子と、80%以上の相同性で配列の一致が見られた。

以上の知見から、馬肉食中毒の原因は、フェイヤー住肉孢子虫であり、同孢子虫には、下痢を誘発するタンパク質が含まれ、同タン

パク質は、アクチン脱重合因子の可能性があると結論した。

加熱不十分のシカ肉中に、住肉孢子虫の寄生を認めた。シカ肉中の住肉孢子虫は、ウマに寄生するフェイヤー住肉孢子虫と、その形態が異なっていた。

免疫化学実験により、上記脱重合因子の抗体が、シカ肉中に存在する住肉孢子虫の虫体に反応した。この結果は、シカ肉中の住肉孢子虫には、フェイヤー住肉孢子虫と共通する、下痢誘発物質が存在することを示唆した。従って、シカ肉による食中毒は、住肉孢子虫が保有する毒性タンパク質によって誘発したことが示唆された。

以上の調査実験から得た知見から、寄生虫による食中毒の中に、虫体の物理的傷害で発症するのではなく、寄生虫がもつ毒素による食中毒、寄生虫毒素性食中毒が、新たな概念として提起された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Kamata, Y., Saito, M., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, M., Inui, T., Watanabe M., Sigita-Konishi, Y. 2014, A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. J. Food Prot. 77, 814-819. [査読あり]

斉藤守弘, 新井陽子, 鎌田洋一, 小西良子, 橋本勝弘. 2013. 犬を終宿主とする *Sarcocystis* シスト抽出物の腸管毒性, 日獣会誌, 66, 725-727. [査読あり]

青木佳代, 石川和彦, 林 賢一, 斉藤守弘, 小西良子, 渡辺麻衣子, 鎌田洋一. 2013. シ

カ肉中の *Sarcocystis* が原因として疑われた有症苦情，日本食品微生物学雑誌，30, 28-32. [査読あり]

研究者番号：20152837

原田誠也，古川真斗，徳岡英亮，松本一俊，八尋俊輔，宮坂次郎，斉藤守弘，鎌田洋一，渡辺麻衣子，入倉大祐，松本 博，小西良子，2013, 馬肉中に含まれる住肉胞子虫の危害性消失条件の検討による生食用馬肉を共通食とする食中毒事例の発生防止対策に関する研究，食衛誌，54, 198-203. [査読あり]

斉藤守弘，鎌田洋一，小西良子，2012，*Sarcocystis fayeri* シストの酵素消化抵抗性におよぼす温度処理の効果，動物の原虫病 27, 32-34. [査読あり]

斉藤守弘，鎌田洋一，小西良子，2012，馬の *Sarcocystis fayeri* 感染状況，動物の原虫病 27, 28-31. [査読あり]

[学会発表] (計 2 件)

鎌田洋一，入倉大祐，斉藤守弘，大西貴弘，小西良子，2012 年 9 月 14 日，馬肉食中毒の原因寄生虫であるフェイヤー住肉胞子虫の病原性タンパク質の性状，第 154 回日本獣医学会 (岩手大学，盛岡市)

斉藤守弘，鎌田洋一，小西良子，2012 年 9 月 14 日，*Sarcocystis fayeri* による食中毒・下痢のメカニズムと 15kDa タンパク質との関係，第 154 回日本獣医学会 (岩手大学，盛岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 洋一 (KAMATA, Yoichi)
岩手大学・農学部・教授