

## 原 著

## 岐阜県内でと畜された牛の住肉胞子虫調査

松尾加代子<sup>1)†</sup> 佐藤 宏<sup>2)</sup>

1) 岐阜県食肉衛生検査所 (〒503-0015 大垣市林町3-167-1)

2) 山口大学共同獣医学部 (〒753-8515 山口市大字吉田1677-1)

(2012年4月10日受付・2012年7月17日受理)

## 要 約

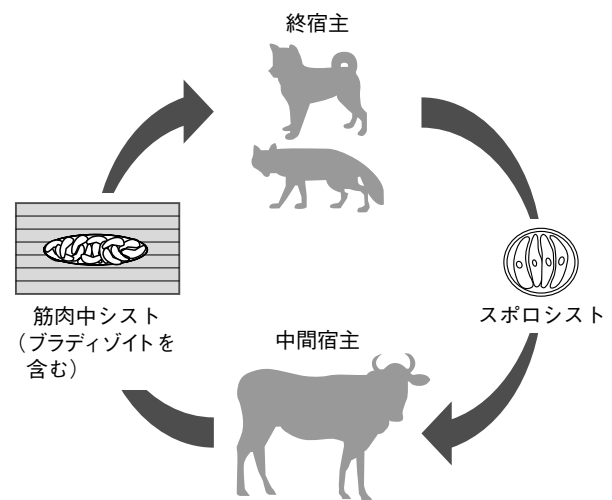
岐阜県内でと畜された牛の心筋について住肉胞子虫シスト保有率を調べた。得られた住肉胞子虫はシストの形態学的観察とPCR-ダイレクトシーケンスにより *Sarcocystis cruzi* と同定された。シストは平滑で壁は薄く、長径273.9～936.8 $\mu\text{m}$  (n = 33, 平均482.9 $\mu\text{m}$ )、短径78.9～242.1 $\mu\text{m}$  (143.4 $\mu\text{m}$ ) であった。シスト陽性牛は、乳廃用牛ホルスタイン種94.3% (50/53頭)、肥育牛の黒毛和種53.6% (30/56頭) 及び交雑種32.3% (20/62頭) であった。組織切片あたりのシスト検出数はホルスタイン種で平均11.1 (範囲1～141)、黒毛和種4.1 (1～23)、交雑種6.0 (1～41) で個体によっては多数のシストが寄生していることが示された。また、馬肉による寄生虫性食中毒の原因である *Sarcocystis fayeri* の毒性タンパク質に対する抗血清を用いた免疫染色では *S. cruzi* シスト中のブラディゾイト周囲に陽性反応がみられた。——キーワード：牛、心筋、保有率、*Sarcocystis cruzi*。

----- 日獣会誌 65, 791～794 (2012)

平成23年6月の厚生労働省通知により馬の住肉胞子虫 *Sarcocystis fayeri* が寄生虫性食中毒として扱われることになり、症例も報告されてきている。この食中毒は、筋肉に寄生する住肉胞子虫シスト中のブラディゾイトに含まれる分子量15kDaの毒性タンパク質によって摂食後数時間で嘔吐や下痢が引き起こされるものである [1]。このタンパク質は住肉胞子虫にとってはドラステイックな形態変化に必須のアクチン脱重合タンパク質である。住肉胞子虫はさまざまな動物の筋肉に寄生しており、人での感染筋肉の生食による嘔吐や下痢についても報告されているが [2, 3]、これまで食肉衛生上あまり問題視されてはこなかった。本邦の牛に多く寄生がみられる *Sarcocystis cruzi* のシストについても同様の毒素の存在が報告されている [4]。

*S. cruzi* の生活環 (図1) において牛は中間宿主であり、終宿主はイヌ科動物である [2, 3]。牛はイヌ科動物の糞便内に排出されるスポロシストに汚染された飼料や水を摂食することで感染し、早ければ9週間程度で筋肉中に感染能を持つシストが出現する [3]。シスト内には多数のブラディゾイトが含まれており、感染筋肉をイヌ科動物が摂食すると腸管内で有性生殖を行いオーシスト

が形成される。住肉胞子虫ではオーシストのまま糞便とともに排出されることはまれでほとんどがスポロシストとして外界に出る。本研究では岐阜県内でと畜された牛における心筋内住肉胞子虫シスト保有率を調べた。

図1 *Sarcocystis cruzi* の生活環

† 連絡責任者：松尾加代子 (岐阜県食肉衛生検査所)

〒503-0015 大垣市林町3-167-1

☎0584-82-2700 FAX 0584-82-2702

E-mail : matsuo-kayoko@pref.gifu.lg.jp

材料及び方法

シストの検出：わが国の牛で一般的な *S. cruzi* のシストは心筋にもっとも多く分布するという報告に基づき [5], 心筋を材料として用いた. 平成23年6~11月にかけて管内と畜場でと殺処理された乳廃用牛：ホルスタイン種53頭, 肥育牛：黒毛和種56頭及び交雑種62頭, 計171頭の心筋(中隔, 約5×5×1cm)を採材し, 斉藤ら [6] の方法に従い, 実体顕微鏡落射照明下でシストを検出した. 同サンプルの一部をホルマリン固定し, 定法に従いパラフィン包埋した後, 2cm×2.5cm×4μmの組織切片を作製した. HE染色後, 切片あたりのすべてのシストを数えた. 実体鏡下で直接, あるいは切片上でシストを確認したものを陽性と判定した. 品種による陽性率の比較にはオッズ比を, 平均値の比較にはT検定を用いた.

免疫組織化学的検査：免疫染色キット (ChemMate ENVISION キット/HRP (DAB), ダコ・ジャパン(株), 東京) を用いて行った. 1次抗体には埼玉県食肉衛生検査センター斉藤守弘氏より分与を受けた *S. fayeri* の15kDaの毒性タンパク質に対するウサギ免疫血清を使用した. なお, シスト内部にブラディゾイトが多数存在し核染色を施すと内部の観察が困難となるため免疫染色後のヘマトキシリン染色は行わなかった.

シストの形態学的観察：心筋より先尖ピンセットで分離したシストは顕微鏡下で大きさや壁の厚さなどの形態学的観察を行った.

シストのDNA解析：分離したシストを70%エタノールで固定し, 常温で保存した. この中からホルスタイン種2個体, 黒毛和種, 交雑種各1個体より得られた材料を選び, 18SリボソームDNA遺伝子(rDNA)解析に用いた [6]. 寄生虫DNAの抽出は抽出キット (Illustra™ tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit, GEヘルスケア・ジャパン(株), 東京) を用いて行った. PCR反応は20μl容量で実施し, ポリメラーゼ (Blend Taq-Plus-, 東洋紡(株), 大阪) と, 18S rDNAのほぼ全長を増幅する真核生物ユニバーサルプライマーとして Eurib1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') 及び Eurib2 (5'-CTTCCGCTGGTTCACCTACGG-3') を用いた. PCR条件は95℃2分間の後, 95℃1分間, 48℃1分間, 72℃1.5分間を35サイクル, 最後に72℃7分間で行った. PCR産物は1.3%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドを用いてトランスイルミネーター上でUVを当てて可視化し, その増幅産物のサイズを確認した. 目的とするサイズが得られたPCR産物は精製キット (High Pure PCR Cleanup Micro Kit, ロシュ・ダイアグノスティクス(株), 東京) を用い精製し, ダイレクトシーケンスに供した. シークエンス

表 各品種の陽性率と検出シスト数

品 種	陽性率 (%)	平均シスト数 (範囲)	平均月齢
ホルスタイン種	94.3	11.1 (1-141)	77.3
黒毛和種	53.6	4.1 (1-23)	28.8
交 雑 種	32.3	6 (1-41)	26.4

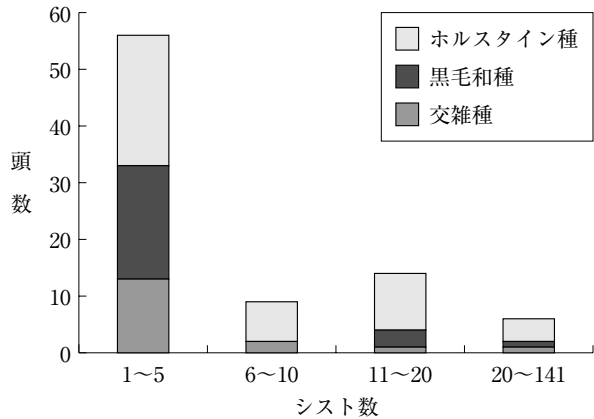


図2 各品種のシスト数分布

プライマーとしては, 上述の2つのプライマーに加え, NSF1179/18 (5'-AATTTGACTCAACACGGG-3'), NSF1624/20 (5'-TTTGTACACACCGCCCGTCG-3') 及び NSR581/18 (5'-TCTCAGGCTCCCTCTCCGG-3') を使用した. 得られた塩基配列は, 用いた材料ごとに18S rDNA塩基配列として整理し, 材料間での塩基配列の同一性を確認するために CLUSTAL W multiple alignment program [7] を用いてアライメントを行った. また, 今回得られた塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースを用いて BLAST 検索を行い, 登録塩基配列の中で同一性の高い近縁種を探った. なお, 今回得られた4分離株の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録済みである (登録番号, 黒毛和種由来: AB682779, ホルスタイン種由来1: AB682780, ホルスタイン種由来2: AB682781, 交雑種由来: AB682782).

成 績

シストの検出率：各群の陽性率は表に示すように乳廃用牛ホルスタイン種で94.3%と最も高く, オッズ比はホルスタイン種では黒毛和種に対し14.4 (95%信頼区間: 2.69~77.46), 交雑種に対し35 (4.02~51.84) であり, 黒毛和種は交雑種に対し2.4 (1.15~5.12) であった. 平均月齢については, ホルスタイン種は他の2品種に比べ, 黒毛和種は交雑種に対し有意に高かった (いずれも  $P < 0.01$ ). 検出シスト数は品種間で有意な差は見られず, いずれの品種においても個体によって高いシスト数を示すものがあつた (表, 図2). シス

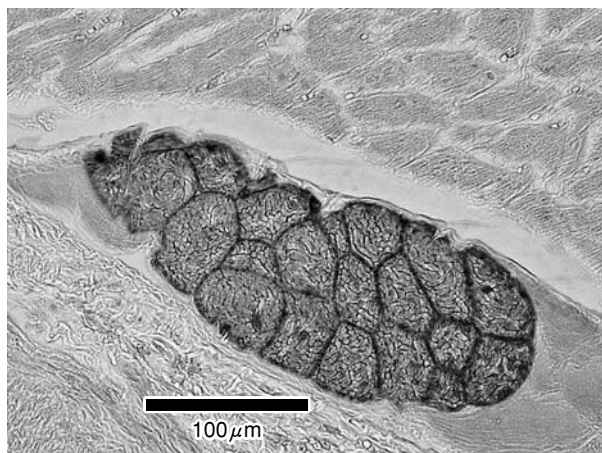


図3 *Sarcocystis fayeri* の毒性タンパクに対する抗血清を用いた *S. cruzi* シストの免疫染色像

ト数と月齢には相関は認められなかった。

**免疫組織化学検査：***S. fayeri* において特定された毒性タンパク質に特異的な抗体を用いて解析した結果、シスト中のブラディゾイト周辺部が陽性反応を呈し、*S. fayeri* と同じ毒性タンパク質の存在が示された (図3)。

**シストの形態学的観察：**シストは平滑で壁は薄く *S. cruzi* の形態的特徴に一致しており、長径 273.9～936.8 μm ( $n = 33$ , 平均 482.9 μm), 短径 78.9～242.1 μm (143.4 μm) であった。同一個体から採取したシストでも隔壁が未形成のものや明瞭な隔壁が形成されたものが混在していた。

**シストのDNA解析：**また、シストのDNAシーケンスの結果から4分離株間の塩基配列同一性が100%であり、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている *S. cruzi* (e. g. AF176933, AF017120) と一致したことから分離されたシストはいずれも *S. cruzi* であることが確認された。

## 考 察

住肉胞子虫の感染率は年齢とともに上昇するといわれており [6]、本調査でも他2品種に比べ月齢の高い乳廃用牛ホルスタイン種は94.3%と高いシスト陽性率を示した。この高い陽性率は感染源であるスポロシストに汚染された環境で繰り返し暴露されながら長期間飼育された可能性を示唆している。住肉胞子虫のシストは感染後経時的に内部に隔壁が形成されていくことが報告されている [9]。今回、同一個体から隔壁が未形成のシストと隔壁の形成されたシストが検出されたことから感染が繰り返し起こっていると考えられる。しかしながら、現在のわが国において農家で飼育されている犬や野生のイヌ科動物が頻繁に牛肉を口にできるとは考えにくい。配合飼料の多くを輸入に頼る現状で輸入飼料のスポロシ

ト汚染があるのかも知れない。

今回は農家への聞き取りなどは行っていないため、飼育形態と陽性率の関係について検討するに至らなかった。今後、地域や農家ごとの飼育方法などとの相関も検討する必要があるが、実際にと畜された牛を個体識別情報で検索してみると、個体によっては出生からと畜されるまでに北海道から沖縄にいたるまで実にさまざまな移動をしていることが分かる。このため、本研究においてもどこで住肉胞子虫の寄生を受けたかを特定することはできなかった。

心筋のみの調査という限定的な結果ではあるが、乳廃用牛では94.3%、肥育牛でも32.3～53.6%の割合でシストが検出され、個体によっては1切片あたり多数のシストを有することと、免疫染色により *S. fayeri* と同じ毒性タンパク質が認められたことから、牛肉の生食でも住肉胞子虫による寄生虫性食中毒が起こる可能性が考えられるのではないだろうか。

最後に本研究において、毒性タンパク質に対する抗血清をご提供いただいた埼玉県食肉衛生検査センター齊藤守弘氏、遺伝子解析についてご助言いただいた大阪市環境科学研究所 阿部仁一郎氏、英文校閲にご協力いただいた金子志乃生氏、検体採材に協力してくれた後藤判友氏を始めとする岐阜県食肉衛生検査所諸氏に深謝する。

## 引用文献

- [1] 鎌田洋一：*Sarcocystis fayeri* を含んだ馬肉による食中毒，食品衛生研究，11，21-27 (2011)
- [2] Fayer R：*Sarcocystis* spp. in human infections, Clin Microbiol Rev, 17, 894-902 (2004)
- [3] 齊藤守弘：住肉胞子虫及び住肉胞子虫症，日獣会誌，42，383-388 (1989)
- [4] Saito M, Taguchi K, Shibata Y, Kobayashi T, Shimura K, Itagaki H：Toxicity and properties of the extract from *Sarcocystis cruzi* cysts, J Vet Med Sci, 57, 1049-1051 (1995)
- [5] 齊藤守弘，柴田 稔，東 久，板垣 博：*Sarcocystis cruzi* シストの牛筋肉における寄生分布，日獣会誌，51，453-455 (1998)
- [6] 齊藤守弘，鉢須桂一，岩崎一弥，中島 董，渡辺昭宣，守屋英樹，板垣 博：住肉胞子虫シストの新簡易直接検査法の検討と応用，日獣会誌，37，158-162 (1984)
- [7] Kopečná J, Jirků M, Oborník M, Tokarev YS, Lukeš J, Modrý D：Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates：search for missing links. Protist, 157, 173-183 (2006)
- [8] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ：CLUSTAL W：improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res, 22, 4673-4680 (1994)
- [9] 齊藤守弘，橋本夏美，中島 董，渡辺昭宣，板垣 博：豚体内における *Sarcocystis miescheriana* の発育，日獣会誌，41，183-187 (1987)

Prevalence of *Sarcocystis* in Cattle Slaughtered in Gifu Prefecture

Kayoko MATSUO\*<sup>†</sup> and Hiroshi SATO

\* *Gifu Prefectural Meat Inspection Office, 3-167-1 Hayashimachi, Oogaki, 503-0015, Japan*

SUMMARY

The prevalence of *Sarcocystis* cysts in the myocardium of cattle slaughtered in Gifu Prefecture was evaluated. The specimens were identified as *Sarcocystis cruzi* by PCR-direct sequencing and a morphological examination of the cyst. The cyst wall was smooth and thin. The cysts measured 273.9 ~ 936.8  $\mu\text{m}$  (n = 33, with an average of 482.9  $\mu\text{m}$ )  $\times$  78.9 ~ 242.1  $\mu\text{m}$  (143.4  $\mu\text{m}$ ) in size. *Sarcocystis* cysts were detected in 94.3% (50/53 head) of old dairy cows (Holstein), 53.6% (30/56) of Japanese black beef cattle, and 32.3% (20/62) of crossbred beef cattle. The average numbers of cysts detected per tissue section were 11.1 (range 1-141) for Holsteins, 4.1 (1-23) for Japanese black cattle, and 6.0 (1-41) for crossbred cattle, suggesting that some individual cattle in all breeds possess high numbers of cysts. Immunostaining with antiserum against the toxicity protein of *S. fayeri*, a cause of food poisoning due to raw horsemeat, showed a positive reaction around *S. cruzi* bradyzoites in the cysts. — Key words : cattle, myocardium, prevalence, *Sarcocystis cruzi*.

<sup>†</sup> Correspondence to : Kayoko MATSUO (*Gifu Prefectural Meat Inspection Office*)

3-167-1 Hayashimachi, Oogaki, 503-0015, Japan

TEL 0584-82-2700 FAX 0584-82-2702 E-mail : matsuo-kayoko@pref.gifu.lg.jp

————— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 65, 791 ~ 794 (2012)

---