

犬を終宿主とする *Sarcocystis* シスト抽出物の腸管毒性齊藤守弘^{1)†} 新井陽子¹⁾ 鎌田洋一²⁾ 小西良子²⁾ 橋本勝弘¹⁾

1) 埼玉県食肉衛生検査センター (〒338-0001 さいたま市中央区上落合5-18-24)

2) 国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-0098 世田谷区上用賀1-18-1)

(2013年4月1日受付・2013年7月9日受理)

要 約

Sarcocystis fayeri, *S. cruzi*, *S. miescheriana*, *S. arieticanis*, *S. sybillensis* 及び *S. sp* シスト抽出物をウサギに皮下接種して、毒性を調べた。主な臨床症状は、沈鬱と間欠性の下痢であった。病理組織学的変化は、腸管と肺にみられた。腸管上皮細胞は剝離・脱落し、残存した細胞にアポトーシスが観察された。肺では小血管に血栓が観察された。ウサギ腸管結紮ループ試験では、すべての *Sarcocystis* シスト抽出物が陽性であった。以上のことから、*Sarcocystis* シスト抽出物はウサギに対して腸管毒性を有することが明らかになった。

——キーワード：粗毒，腸管毒性，ループ試験，*Sarcocystis* cyst.

----- 日獣会誌 66, 725～727 (2013)

Sarcocystis (住) 肉胞子虫症のシストの毒素に関する研究は19世紀後半から20世紀初期に行われていた [1-6]。当初、住肉胞子虫症のシストの毒素は *Sarcocystin* と呼ばれていた [3-5] がその後、シストの毒素については著者ら [7] によって牛寄生 *Sarcocystis cruzi* のものがわずかに報告されているだけである。

近年、馬肉の喫食による原因不明の有症苦情事例が増加していることから、病因物質を解明する目的で調査を開始した。有症苦情事例の患者の臨床症状は喫食後、数時間で下痢等の症状が現れる。有症苦情食品である馬肉中に住肉胞子虫 *S. fayeri* 寄生がみられることから、シストに下痢を誘発する物質 (毒素) が存在する可能性が疑われた。こうした状況をふまえて、今回、*S. fayeri* を始め犬を終宿主とするわが国の家畜及び野生動物に寄生する数種の *Sarcocystis* について人に対して、下痢を誘発する可能性がある物質 (毒素) が存在するか否か、住肉胞子虫感染食肉の生食により食中毒の可能性はあるか否かについて解明する目的から、ウサギを用いた毒性試験を実施したので報告する。

材 料 及 び 方 法

と畜場でと殺された馬、牛、豚、羊及び捕獲されたニホンジカの筋肉に寄生した各種の住肉胞子虫について、シストの形態学的検査と犬への感染実験を実施し

[8-12]、同定した馬寄生種 *S. fayeri*、牛寄生種 *S. cruzi*、豚寄生種 *S. miescheriana*、羊寄生種 *S. arieticanis*、シカ寄生種 *S. sybillensis* 及び *S. sp.* [13] を材料とした。

筋肉内に寄生した生鮮シストを直接法 [9] により取り出し、あらかじめ1,000 μ l の生理食塩水を入れたマイクロチューブ内に浮遊させた。その後、3,000rpm で10分間遠心した後、上清を捨て、沈査を -22℃ で凍結した。凍結後、37℃ の湯槽に入れ融解した。凍結と融解を10回繰り返した後、1,000 μ l の生理食塩水を加え十分攪拌したものをシスト抽出液とした。

各種 *Sarcocystis* シストから作製した抽出液が下痢原性の毒素を有するか否かを判定するため、ウサギを用いて判定した [7]。

実験に使用したウサギは日本白色種、10週齢、体重1.9～2.0kg、雄で、実験施設搬入時から実験終了まで自由飲食とし、実験動物の管理と使用に関する指針等 (National research council of the national academies (2010). Guide for the care and use of laboratory animals.) に従って実施した。

皮下接種試験では各種 *Sarcocystis* シスト抽出液1,000 μ l (総タンパク量300 μ g) をそれぞれの種当たり2羽ずつ、計12羽に皮下接種した。接種後、臨床症状を観察し、死亡後はただちに剖検した。剖検に際しては各臓器を肉眼観察した後に、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、大・

† 連絡責任者：齊藤守弘 (埼玉県食肉衛生検査センター)

〒338-0001 さいたま市中央区上落合5-18-24

☎048-853-7871 FAX 048-853-7872

E-mail : saito.morihito@pref.saitama.lg.jp

小腸, 膀胱, 睪丸, 胸腺, 肺, 舌, 骨格筋の12カ所を採取し, 10%中性緩衝ホルマリン液に固定した. 固定後, パラフィン包埋, 薄切し, 常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を施し, 顕微鏡下で病変の有無を観察した.

さらに, 食中毒症状である下痢を証明する目的でウサギ腸管結紮ループ試験を実施した [15]. 6種類 (*S. fayeri*, *S. cruzi*, *S. miescheriana*, *S. arieticanis*, *S. sybillensis* 及び *S. sp.*) のシスト抽出液 1,000 μ l (総タンパク量 300 μ g) を各2羽ずつの計12羽のウサギを用いて腸管結紮ループ内に注射器を用いて接種した. 閉腹後, 接種18時間後に再度開腹し, ループ内貯留液の有無を観察した. 下痢の判定は成書 [15] に従い, ループに貯留した液体量と腸管結紮の長さの比が1.0以上の場合を陽性とした.

成 績

種を問わずシスト抽出液を皮下接種されたウサギは接種30分後には食欲及び飲水は消失した. 1時間後には, 沈鬱の症状がみられ, 2時間後には一回目の軽度の下痢が観察された. その後, 食欲及び飲水の廃絶, 沈鬱が継続し, 3~4時間後に二回目の下痢が観察された. 接種8~9時間後に三回目の下痢 (水溶性) がみられ, 10~11時間後には意識が混濁し, 音に対しても反応があまりみられず, やがて横臥し, 12~13時間後には全例死亡した.

死亡したウサギの肉眼所見は各種共通で, 腸管は全体に膨化し, 内腔には水溶性の内容物が貯留し, 壁は菲薄であった. その他の臓器等には肉眼的には著変はみられなかった. 病理組織所見も種による違いはなく, 腸管の上皮細胞にはアポトーシスに特徴的な形態変化とされる核クロマチンの濃縮, 断片化がみられ, その多くは絨毛から剝離脱落していた. 絨毛も総じて丈が短縮し, 時に平坦化していた. また, 粘膜下組織には水腫がみられた. 肺では毛細血管や小血管内腔にフィブリン血栓が共通して観察された.

腸管結紮ループ試験の結果は, *S. fayeri* で, ループに貯留した液体量と結紮腸管の長さの比が2.5であった. *S. cruzi* で2.5, *S. miescheriana* で2.6, *S. arieticanis*, *S. sybillensis* 及び *S. sp.* で2.3とですべての *Sarcocystis* で陽性であった.

考 察

馬肉を原因食品とする有症苦情事例が増加傾向にあることから, 著者らは, その病因物の解明を開始した. 有症苦情の馬肉中に *S. fayeri* の寄生があること, 臨床症状が喫食後数時間で現れること, その症状が下痢を主体とすることから, 本寄生虫に下痢原性毒素が存在する可

能性が疑われた. さらに, 牛, 豚, 羊及びニホンジカ, いわゆる食肉動物に最もポピュラーに寄生している *Sarcocystis* 種についてもあわせて調査した.

Sarcocystis シストの持つ毒素については19世紀後半頃にすでに, Sarcocystin という名称でその存在が報告されていたが, 成分の詳細等は不明であった [3-5]. これまでに著者ら [7] は, 牛寄生種である *S. cruzi* シスト抽出液のウサギへの皮下接種により間欠性の水溶性下痢が惹起され, 重症化すると死に至ること, 死亡例の剖検所見では, 腸管壁の水腫と菲薄化, 水溶性内容物の貯留が特徴的で, 病理組織学的に腸管上皮細胞の剝離脱落がみられることなどを観察した. この毒性本体が *S. cruzi* シスト内に存在する推定分子量15-16kDa タンパク質である可能性を報告している [7]. 今回の成績は, この *S. cruzi* の成績と臨床症状, 肉眼及び病理組織学的所見とも一致した. このことは, *S. cruzi* と同様の腸管毒性を有するタンパク質分子が *Sarcocystis* 種を超えて広く存在することを示唆している.

Nakamura ら [16] は, *S. cruzi* シスト抽出物をウサギに接種すると血中に腫瘍壊死因子 TNF α が増加することを報告しているが, 主たる病変である腸管上皮細胞のアポトーシスとの関連性が疑われている.

S. fayeri を初めすべての *Sarcocystis* シスト抽出物はウサギ腸管結紮ループ試験で陽性を示し, 下痢原性があることが証明された. 今後はどのようなメカニズムで下痢が引き起こされるかを解明したいと考えている.

引 用 文 献

- [1] Dubey JP, Speer CA, Fayer R : Sarcocystosis of animals and man, CRC Press, Boca Raton 78-79, Florida (1989)
- [2] Dubey JP, Speer CA, Fayer R : Sarcocystosis of animals and man, CRC Press, Boca Raton 109-148, Florida (1989)
- [3] 中西俊蔵 : 朝鮮牛の住肉胞子虫に関する研究, 中央獣医学雑誌, 5, 363-421 (1920)
- [4] 佐藤新一 : 住肉胞子虫毒素の研究概報, 台湾農事報, 170, 37-40 (1921)
- [5] 佐藤新一 : 住肉胞子虫毒素の毒作用およびその免疫学的研究, 慶應医学, 6, 65-110 (1926)
- [6] Scott JW : Life history of Sarcosporidia, with particular reference to *Sarcocystis tenella*, Univ Wyo Agric Exp Stn Bull, 259, 5-63 (1943)
- [7] Saito M, Taguchi K, Shibata Y, Kobayashi T, Shimura K, Itagaki H : Toxicity and properties of the extract from *Sarcocystis cruzi*, J Vet Sci, 57, 1049-1051 (1995)
- [8] 新井陽子, 田中成幸, 斉藤守弘 : 野生のホンシュウジカにみられた *Sarcocystis sybillensis* と *S. wapiti*, 動物の原虫病, 25, 13-16 (2010)
- [9] 斉藤守弘, 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法

- の検討と応用, 日獣会誌, 37, 158-162 (1984)
- [10] Saito M, Nakajima T, Watanabe A, Itagaki H : *Sarcocystis miescheriana* infection and its frequency in pigs in Japan, *Jpn J Vet Sci*, 48, 1083-1090 (1986)
- [11] Saito M, Shibata Y, Itagaki H : *Sarcocystis arieticanis* of sheep in Japan, *Jpn J Parasitol*, 45, 290-294 (1998)
- [12] 齊藤守弘, 柴田 穰, 田口清明, 板垣 博 : 馬の住肉胞子虫感染例, 日獣会誌, 48, 905-907 (1995)
- [13] 齊藤守弘 : 野生のホンシュウジカにみられた *Sarcocystis* sp., 動物の原虫病 (印刷中)
- [14] 山崎省二 : 食品衛生検査指針 微生物編, 厚生労働省, 99-103, 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- [15] 熊谷 進 : 食品衛生検査指針 微生物編, 厚生労働省, 95-99, 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- [16] Nakamura Y, Saito M, Shibata Y, Itagaki H : Induction of tumor necrosis factor α and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*, *Vet Parasitology*, 85, 235-243 (1999)

Enterotoxicity of Extract from *Sarcocystis* Cysts with Canine Final Host in Japan

Morihiro SAITO¹⁾, Yoko ARAI¹⁾, Yoichi KAMATA²⁾, Yoshiko KONISHI²⁾
and Katsuhiko HASHIMOTO¹⁾

1) *Saitama Meat Inspection Center, 5-18-24 Kamiochiai, Chuo-ku, 338-0001, Japan*

2) *National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, 158-0098, Japan*

SUMMARY

Extracts from *Sarcocystis* cysts (*S. fayeri*, *S. cruzi*, *S. miescheriana*, *S. arieticanis*, *S. sybillensis* and *S. sp.*) were subcutaneously injected into rabbits to detect the toxicity. The main clinical signs of the rabbits were depression and intermittent diarrhea. Histopathological changes were exclusively found in the intestines and lungs. Regarding the intestines, most of the epithelial cells showed morphological changes characteristic of apoptosis and were detached from atrophic and flattened villi. Some thrombi were observed in the small vessels of the lungs. The extracts from *Sarcocystis* cysts were all positive in the rabbits' intestinal loop test. These results suggest that extracts from *Sarcocystis* cysts with canine final host possessed enterotoxicity.

—Key words : crude toxin, enterotoxicity, loop test, *Sarcocystis* cyst.

† Correspondence to : Morihiro SAITO (*Saitama Meat Inspection Center*)

5-18-24 Kamiochiai, Chuo-ku, 338-0001, Japan

TEL 048-853-7871 FAX 048-853-7872 E-mail : saito.morihiro@pref.saitama.lg.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 66, 725 ~ 727 (2013)
