

Sarcocystis 属が寄生していた鹿肉を生で喫食したこと による食中毒事例

山本 薫^{1)†} 前島 圭¹⁾ 中田純子¹⁾ 奥田祐亮¹⁾ 和田安彦¹⁾
寺杣文男²⁾ 工藤由起子³⁾ 大西貴弘³⁾

- 1) 和歌山県田辺保健所 (〒646-8580 田辺市朝日ヶ丘23-1)
2) 和歌山県環境衛生研究センター (〒640-8272 和歌山市砂山南3-3-45)
3) 国立医薬品食品衛生研究所 (〒210-9501 川崎市川崎区殿町3-25-26)

(2019年5月22日受付・2019年9月23日受理)

要 約

平成30年6月2日に、和歌山県で鹿刺し(筋肉及び肝臓)の喫食による患者3人の食中毒事例が発生した。鹿刺しからは *Sarcocystis truncata* が検出され、*S. fayeri* と同様の下痢誘発性15kDaタンパク質の発現を確認した。厚生労働省は *Sarcocystis* 属のうち *S. fayeri* を食中毒病因物質と規定している。本事例は *S. truncata* が病因物質の可能性が非常に高いと考えられたが、公的には病因物質不明の食中毒として報告した。過去には *S. sybillensis* や *S. wapiti* に汚染された鹿肉の喫食が原因と推察される下痢症事例の報告がある。非加熱獣肉の喫食による食中毒で下痢誘発性タンパク質を有する *Sarcocystis* 属が検出された事例は、その種を問わず病因物質とすることが妥当だと考える。

—キーワード：鹿肉，食中毒，*Sarcocystis*。

-----日獣会誌 73, 111~115 (2020)

平成23年6月より、馬の *Sarcocystis fayeri* が寄生虫性食中毒として扱われることとなったが、それ以外の *Sarcocystis* 属については、食中毒病因物質に指定されていない。馬肉ではないが、国内の鹿の可食部における *Sarcocystis* 属の保有率はきわめて高く、85%以上寄生しているとの報告がある [1, 2]。また、平成23年12月と平成27年12月に滋賀県で、鹿肉の *Sarcocystis* 属が原因と疑われる有症事例が発生している [3, 4]。

同事例では、鹿肉から *S. sybillensis* と *S. wapiti* が検出されていた。同 *Sarcocystis* 属は、厚生労働省が食中毒寄生虫と指定している *S. fayeri* が持つ15kDa毒性タンパク質と抗原性が類似するタンパク質を保有していた [3]。

平成30年6月2日に和歌山県において、鹿の筋肉と肝臓を刺身として生で喫食したことによる食中毒事件が発生した。本事例では、鹿に寄生していた *Sarcocystis* 属が食中毒を引き起こした可能性が強く疑われた。本報告では、本事例の疫学情報と原因物質の特定の経緯につ

いて記述する。

材料及び方法

検査材料と一般的な食中毒検査：喫食状況及び症状について、患者への聞き取り調査を行うとともに、残品の鹿刺し(冷蔵状態で保存されていた筋肉、肝臓)と患者便1検体について、サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌O157の検査を行った。

***Sarcocystis* 属の検査：**検体の鹿刺しについて、「*Sarcocystis fayeri* の検査法について」(厚生労働省、平成28年4月27日付け生食監発0427第4号)に準じた方法により、顕微鏡検査による虫体の確認及び定性PCR法による虫体DNAの確認を行った。

筋肉の顕微鏡検査は、上記通知の「4 顕微鏡検査 2) 実体顕微鏡によって直接シストを分離する方法①」に準じて行った。具体的には、検体がすでに細切された状態であったため、カットすることなく、そのまま実体顕微鏡で観察した。次に確認されたシストを先端が極細のピ

† 連絡責任者：山本 薫 (和歌山県田辺保健所)

〒646-8580 田辺市朝日ヶ丘23-1

☎ 0739-26-7934 FAX 0739-26-7935

E-mail : yamamoto_k0086@pref.wakayama.lg.jp

ンセットで引き抜き、スライドガラス上に置いた PBS に浮遊させ、ピンセットでシストの膜を破って遊出するブラディゾイトを確認した。肝臓の顕微鏡検査は、上記通知の「4 顕微鏡検査 3) 実体顕微鏡によって直接シストを分離する方法②」に準じて、肝臓を PBS 中であらかじめ揉むようにして砕いてから観察する方法により検査を行った。さらに、上記と同様の方法でシストから遊出するブラディゾイトを確認した。

PCR 検査は、上記通知の「3 スクリーニング検査 1) 定性 PCR 法」に準じた。検体には、患者便、鹿の肝臓（異なる 2 か所から採取）と筋肉、及び同筋肉から抽出したシストから遊出したブラディゾイトを用いた。DNA 抽出は、市販のキット（患者便では QIAamp DNA Stool Mini Kit, その他の検体では QIAamp DNA Mini Kit, いずれも QIAGEN, Germany）を用いた。PCR の酵素は（TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version, タカラバイオ(株), 滋賀）を用い、Prittら [5] の方法に従い、*Sarcocystis* 属の 18S rRNA 遺伝子をターゲットとするプライマーを使用した。陽性コントロールには、国立感染症研究所寄生動物部の八木田健司先生より分与されたプラスミド溶液を用いた。

18S rRNA の塩基配列解析及び 15kDa タンパク質の検査：塩基配列の分析は、まず前述のプライマーを用いて PCR を行い、増副産物をアガロースゲル電気泳動で分離し、DNA ゲル抽出キット（QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Germany）を用いてゲルから DNA を抽出した。抽出した DNA の配列は DNA シークエンサー（BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.）とシークエンサー（3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems, U.S.A.）を用いて決定した。この塩基配列について BLAST 検索を行い、塩基配列の相同性から判断される 18S rRNA 遺伝子の種を求めた。

15kDa タンパク質の検査（ウエスタンブロット）は、検体の鹿肉及びコントロールの馬肉それぞれ 100mg に、プロテアーゼ阻害剤カクテル（ナカライテスク(株), 京都）を含む RIPA（Radio Immunoprecipitation Assay）バッファー（Thermo Fisher Scientific, U.S.A.）100 μ l を加え、1.5ml チューブ内でホモジナイザーペッセルを用いて、約 3 分間氷上でホモジナイズした。ときどき、ボルテクスミキサーで攪拌しながら、氷上で 30 分静置した。10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心処理後、上清を取り、取った上清に上清と等量の 2 \times Laemmli サンプルバッファーを加え、5 分間煮沸した。このサンプルから SDS-PAGE 電気泳動でタンパク質を分離した。ゲル上のタンパク質を電気泳動装置（ミニプロティアン Tetra セルシステム, Bio-Rad, U.S.A.）を用いて、PolyVinylidene DiFluoride (Immun-Blot PVDF フィルターペー

パーサンドイッチ, Bio-Rad, U.S.A.) 膜に転写した。PVDF 膜はブロッキングバッファー（タカラバイオ(株), 滋賀）を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、ブロッキングバッファーで 1,000 倍に希釈したウサギ抗 15kDa タンパク質抗体（岩手大学農学部 山崎朗子博士より分与）と室温で 30 分間反応させた。Tris-Buffered Saline with Tween 20 (10mM Tris, 100mM NaCl, 0.2% Tween20 [pH 7.5]) で 10 分間、3 回洗浄後、ブロッキングバッファーで 5,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H&L) 抗体 (Abcam plc, U.K.) と室温で 30 分間反応させた。TBST で 10 分間、3 回洗浄後、BCIP-NBT 溶液セット（ナカライテスク(株), 京都）を用いて、PVDF 膜上の抗体が結合するタンパク質を可視化した。

成 績

事例情報：喫食された鹿は、平成 30 年 6 月 2 日昼ごろに和歌山県田辺市にて捕獲され、同日 16 時に喫食者の 1 人が鹿丸ごと 1 頭をもらい受けて、喫食者の 2 人で解体し、その後自宅横にて鹿の筋肉（背身）と肝臓を細切りし、平成 30 年 6 月 2 日 17 時に鹿刺しとして、生のまま合計 3 人で喫食していた。喫食したのは男性 3 人（60 歳代 2 人、70 歳代 1 人）で、全員が喫食後 4 時間から 4 時間 30 分で発症し、1~2 日で回復していた。患者の症状は、吐き気（3 人）、嘔吐（3 人、5~20 回、平均 10 回）、下痢（3 人、2 回~数えられないほど頻回）、倦怠感（3 人）、脱力感（3 人）、発熱（2 人）、頭痛（2 人）、臥床（2 人）、悪寒（1 人）であった。

共通食は鹿刺し以外になく、全員が背身と肝臓の両方を喫食していた。鹿刺しは、解体後すぐに喫食しており、冷凍や加熱はしていなかった。残品の鹿刺しと患者便 1 検体のサルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、腸管出血性大腸菌 O157 検査は陰性であった。有症者間に感染症を疑わせるエピソードはなかった。

Sarcocystis 属の検査：筋肉と肝臓の両方から、実体顕微鏡による観察でシストが確認され（図 1, 2）、光学顕微鏡によりシスト内のブラディゾイトが確認された（図 3）。筋肉内に多数のシストが確認できたが、肝臓は同様の方法ではシストは確認できず、肝臓を PBS 中で揉むようにして砕いてから観察する方法で少数のシストを確認することができた。

定性 PCR では、陽性コントロール、肝臓 1 及び 2、筋肉、及び筋肉由来のブラディゾイトのいずれでも標的 DNA の増幅がみられた。陰性コントロール及び患者便では、遺伝子の増幅はなかった（図 4）。

18S rRNA の塩基配列解析及び 15kDa タンパク質の検査：18S rRNA の塩基配列解析により、相同性は 99.62% で、調査塩基配列数 1040 のうち、1036 塩基が

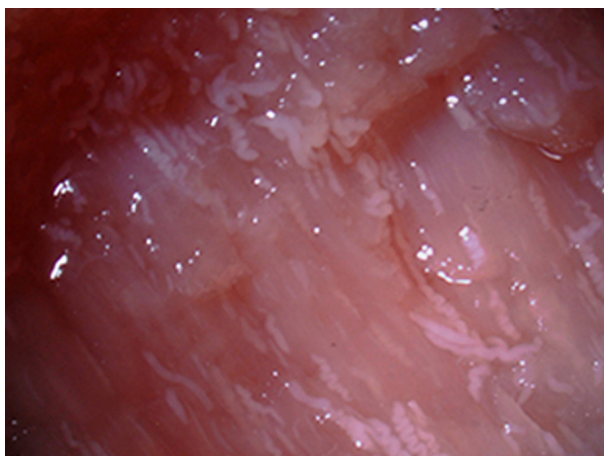


図1 鹿肉の *Sarcocystis* 属のシスト (実体顕微鏡像)

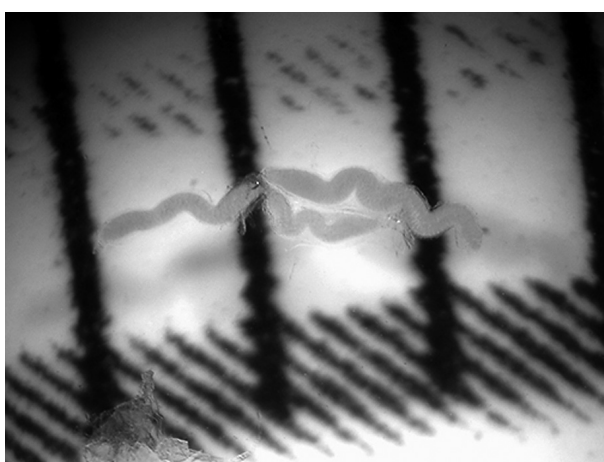


図2 鹿肉から取り出した *Sarcocystis* 属のシスト (縦の目盛線の幅は1mm)

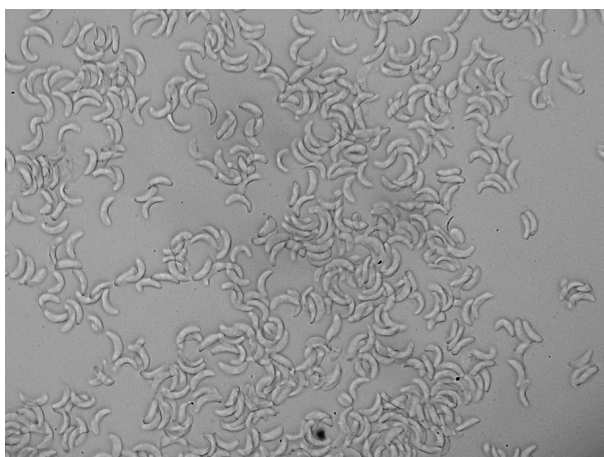
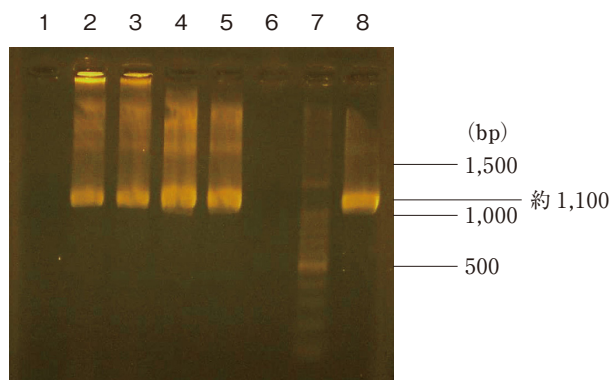


図3 シストから遊出したブラディゾイト (光学顕微鏡像)

報告されていた配列と一致し、*Sarcocystis truncata* と同定された。

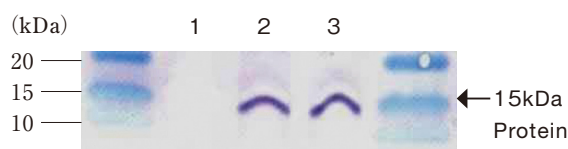
ウエスタンブロットでは、約 15kDa 付近に抗 15kDa タンパク質抗体が結合するバンドが確認でき、今回寄生していた *S. truncata* について、15kDa タンパク質が発



1 陰性コントロール	5 ブラディゾイト
2 肝臓 1	6 患者便
3 肝臓 2	7 サイズマーカー
4 筋肉	8 陽性コントロール

図4 *Sarcocystis* 属検出のための定性 PCR 産物の電気泳動結果

サイズマーカーは、100bp DNA Ladder (タカラバイオ(株), 滋賀) を使用



1 コントロール馬肉
2 サルコシスティス寄生馬肉
3 シカ肉 (和歌山県事例)

図5 15kDa タンパク質の発現を確認するウエスタンブロット結果

現していることが明らかになった (図5)。

考 察

本事例の共通食は背身と肝臓の鹿刺しのみであり、*S. fayeri* の食中毒と類似した症状を呈し、鹿刺しから *S. fayeri* と同様の 15kDa タンパク質を持った *S. truncata* が検出されている。15kDa タンパク質は、ブラディゾイトの膜の構成成分であり、*S. fayeri* 食中毒を説明する中心的病原物質で、その下痢誘発性が証明されている [6-8]。 *S. truncata* が、抗原性の類似する 15kDa タンパク質を保有することから、本事例は鹿に寄生していた *S. truncata* が、食中毒を引き起こした可能性が非常に高い。

現在、わが国で食中毒病因物質に指定されているのは、*Sarcocystis* 属のうち *S. fayeri* のみである。よって、今回の食中毒については、鹿刺しが原因食品と断定できるが、*S. truncata* を病因物質としては断定できず、厚生労働省への報告では食中毒病因物質は不明とした。

なお、本事例の厚生労働省への報告は食中毒事例とし

て行われたものであり、他の事例では、鹿肉の *Sarcocystis* 属が原因と疑われながらも食事が原因の食中毒とは断定できなかった部分が異なっており、この意味では、本邦初の報告となった。

今回の食中毒は平成 23 年と平成 27 年の滋賀県の有症事例と潜伏時間や症状が酷似しているが、平成 23 年の滋賀県の有症事例では鹿肉から *S. sybillensis* や *S. wapiti* が検出されており、今回の食中毒で検出されたものとは異なる種であった [3, 4]。本事例を含めると、検出された *Sarcocystis* 属 3 種はいずれも異なる。しかしながら、3 種すべて *S. fayeri* の持つ下痢誘発性 15kDa タンパク質と抗原が類似するタンパク質を保有している。

鹿に寄生する他の種や鹿以外の動物に寄生する *Sarcocystis* 種についても、病原性を有する可能性がある。食中毒病因物質の指定範囲を拡大し、毒性物質を持つ *Sarcocystis* 属を食中毒病因物質とすることを検討する必要があると考える。特に、鹿では複数種類の *Sarcocystis* 属が寄生するため、特定の種を限定して食中毒を起こす *Sarcocystis* 属とすると、指定した種以外の鹿肉喫食事例を食中毒から排除することになり、学術的にも行政的にも不適切な状況となる。

以上から、下痢誘発性タンパク質を持つ *Sarcocystis* 属を含む動物肉の喫食による事例を食中毒と認定する必然があるのではないかと考える。さらなる事例解析の蓄積や、分離した *Sarcocystis* の種の同定と、その病原性の直接的証明が重要になると考える。

和歌山県は狩猟が盛んな地域であり、野生鹿の肉を生で食する文化がある。近年は、野生鹿による農林業被害防止の観点からジビエを産業として育成していく動きも盛んになってきている。このことから、保健所としても今回の食中毒を契機に、鹿を食べる際には十分に加熱するよう啓発していく必要がある。

Sarcocystis 属の関与が疑われる旨についてご助言をいただいた紀南病院の太田敬之医師、*Sarcocystis* の陽性コントロー

ルを分与いただいた国立感染症研究所寄生動物部の八木田健司先生及びウサギ抗 15kDa タンパク質抗体を分与いただいた岩手大学農学部山崎朗子博士に深く感謝する。

引用文献

- [1] 齊藤守弘, 柴田 穰, 久保正法, 板垣 博: 野生ホンシュウジカおよびエゾシカにみられた往肉胞子虫, 日獣会誌, 51, 683-686 (1998)
- [2] 松尾加代子, 上津ひろな, 高島康弘, 阿部仁一郎: ホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* およびニホンイノシシ *Sus scrofa leucomystax* における往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, 日本野生動物医学学会誌, 21, 35-40 (2016)
- [3] 青木佳代, 石川和彦, 林 賢一, 齊藤守弘, 小西良子, 渡辺麻衣子, 鎌田洋一: シカ肉中の *Sarcocystis* が原因として疑われた有症苦情, 日本食品微生物学会雑誌, 30, 28-32 (2013)
- [4] 青木佳代, 林 正宗, 河野智美, 梅原成子, 坂口初美, 鷲田 淳, 石川和彦: シカ肉のあぶりが原因と推定された有症事例, 日本食品微生物学会雑誌, 34, 166-169 (2017)
- [5] Pritt B, Trainer T, Simmons-Arnold L, Evans M, Dunams D, Rosenthal BM: Detection of *Sarcocystis* parasites in retail beef: a regional survey combining histological and genetic detection methods, J Food Protect, 71, 2144-2147 (2008)
- [6] 齊藤守弘: *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒, モダンメディア, 58, 351-358 (2012)
- [7] Irikura D, Saito M, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T, Sugiyama KI, Watanabe M, Yamazaki A, Izumiyama S, Sato H, Kimura Y, Doi R, Kamata Y: Characterization of *Sarcocystis fayeri*'s actin-depolymerizing factor as a toxin that causes diarrhea, Genes Cells, 22, 825-835 (2017)
- [8] Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Bessho T, Inui T, Watanabe M, Sugita-Konishi Y: A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horse-meat may be responsible for food poisoning, J Food Protect, 77, 814-819 (2014)

Food Poisoning Incident Caused by the Consumption of Raw Deer Meat
Contaminated with Genus *Sarcocystis*

Kaori YAMAMOTO^{1)†}, Kei MAEJIMA¹⁾, Junko NAKATA¹⁾, Yusuke OKUDA¹⁾,
Yasuhiko WADA¹⁾, Fumio TERASOMA²⁾, Yukiko HARA-KUDO³⁾
and Takahiro OHNISHI³⁾

- 1) *Wakayama Prefecture Tanabe Health Center, 23-1 Asahigaoka, Tanabe, 646-8580, Japan*
- 2) *Wakayama Prefectural Research Center of Environment and Public Health, 3-3-45 Sunayama-Minami, Wakayama, 640-8272, Japan*
- 3) *National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, 210-9501, Japan*

SUMMARY

Three cases of food poisoning after the consumption of raw deer meat occurred in Wakayama Prefecture on June 2, 2018. *Sarcocystis truncata* was detected in the raw deer meat, and we found that the agent expressed diarrhea-inducing 15 kDa protein similar to that of *Sarcocystis fayeri*. Among genus *Sarcocystis*, only *S. fayeri* is officially recognized as a causative agent of food poisoning by the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. The detected *S. truncata* has been shown to be strongly linked to the food poisoning, yet its causative agent was officially reported as unknown. There have been some reported diarrhea cases that seem to be related to raw deer meat contaminated with other *Sarcocystis*, such as *Sarcocystis sybillensis* and *Sarcocystis wapiti*. Our findings indicate that we should recognize any *Sarcocystis* species expressing the diarrhea-inducing protein as the causative agent of food poisoning after consumption of raw meat.

— Key words : deer meat, food poisoning, *Sarcocystis*.

† Correspondence to : Kaori YAMAMOTO (*Wakayama Prefecture Tanabe Health Center*)

23-1 Asahigaoka, Tanabe, 646-8580, Japan

TEL 0739-26-7934 FAX 0739-26-7935 E-mail : yamamoto_k0086@pref.wakayama.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 111 ~ 115 (2020)