

崇城大学学位論文

ウマにおける *S. fayeri* の簡易検査法の開発を  
基盤とした寄生部位の解析

平成28年度

古川 真斗

ウマにおける *S. fayeri* の簡易検査法の開発を  
基盤とした寄生部位の解析

March, 2016

古川 真斗

Parasitism distribution analysis of *S. fayeri* in the horse  
based on development of a rapid and simple method  
for the detection.

Masato Furukawa

Parasitism distribution analysis of *S. fayeri* in the horse based on development of a rapid and simple method for the detection.

Masato Furukawa

*Sarcocystis fayeri* (*S. fayeri*) is a recently discovered agent that causes foodborne diseases and is associated with the consumption of raw horse meat. The incidence of *S. fayeri* food poisoning has been steadily increasing in Japan since 2003. The incubation period of *S. fayeri* in food is short, and the main symptom of an infection is diarrhea. When outbreaks of food poisoning occur, it is necessary to investigate the causative agent. To accomplish this, notification methods are prescribed by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (MHLW) for the detection of *S. fayeri*. These methods involve a combination of microscopic observations and a PCR assay. However, a conventional PCR analysis is time-consuming, costly and complicated, and in a typical investigation, DNA must be sampled from more than three locations in a meat sample. Although the pathogenicity of *S. fayeri* has been examined, the distribution of the organism in the horse has not been elucidated. In addition, the location where the level of parasitism is high and the location where it is low remains unknown. One group developed a method based on whether raw horse meat of the same horse body resulted in the development of symptoms of the disease. However, this has not been confirmed in other groups. It is possible that parasitism is uneven, evenly distributed in the same horse. Given this possibility, clarifying the extent of the distribution of parasitism in a horse body, would greatly improve verifying the existence of an outbreak and managing the hygiene associated with the processing of horseflesh. We report herein on the development of a novel, validated, rapid and simple method using a lysosome-associated membrane protein (LAMP) and an analysis of the distribution of *S. fayeri* in horse meat. The results obtained in this study can be summarized as follows.

- 1) The development of a novel, validated, rapid and simple method for the detection of *S. fayeri*.

We developed a new, rapid and simple testing method using LAMP, which takes only 1 hour to perform and which does not involve the use of any expensive equipment or complicated techniques. For the validation of this method, an inter-laboratory study was performed among 5 institutes using 10 samples that had been infected with various concentrations of *S. fayeri*. The results of the inter-laboratory study demonstrated that our LAMP method could detect *S. fayeri* at concentrations greater than  $10^4$  copies/g. Thus, this new method could be useful in screening for *S. fayeri* as a routine sanitary

control procedure.

2) The distribution of parasitism of *S. fayeri* in the horse.

We examined body parts from 30 horses in an attempt to determine the distribution of parasitism. The parasitism of *S. fayeri* was not confirmed for six purely domestic horses, and *S. fayeri* parasitism was confirmed 24 of the horses that had been imported from foreign countries. The presence of *S. fayeri* was not confirmed in the mane, heart, liver and aorta from a purely domestic horse or from a foreign horse, but *S. fayeri* parasitism was confirmed although the distribution was uneven, in other parts. After performing a principal component analysis, and selecting a highly-concentrated parasitism part, the findings indicated that a Fin, Futaego, Bottom Round, Outside Skirt and Hanging Tender contained high concentrations of *S. fayeri*.

3) Possible utility of a simple testing protocol, using the LAMP method

Using the simple testing method, *S. fayeri* was not detected in a purely domestic horse at all, but in the horse of foreign origin, *S. fayeri* was detected in some parts and not in others. After comparing it with results provided by real-time PCR method, a difference was seen in the results for some specimens although, in more than half the cases, the results were in agreement with each other. However, it was possible to identify the horse that was infected with *S. fayeri* by examining only one part that had been selected. In addition it was possible to distinguish the horse that was not infected with *S. fayeri* when it was not detected in all of the three parts. From these findings, it was strongly suggested that the simple testing developed in this study could be very useful.

In conclusion, we report on the development of a new, rapid and simple method for testing that uses LAMP, and a part of the horse that contained highly-concentrated parasitism. The presence of *S. fayeri* in an individual horse could be confirmed when samples from three different locations in the horse meat that included a highly-concentrated parasitism part were examined. It is thought that the methodology would be useful for obtaining and managing basic hygiene data that could contribute, not only to the improvement of, but also the development of laboratory procedures for improving the sanitization of horse meat in the future.

本論文は学術誌に掲載された次の論文を基礎とするものである.

- (1) The Development of a Novel, Validated, Rapid and Simple Method for the Detection of *Sarcocystis fayeri* in Horse Meat in the Sanitary Control Setting. *Biocontrol Science* 21(2):131-134 (2016)  
Furukawa M, Minegishi Y, Izumiyama S, Yagita K, Mori H, Uemura T, Etoh Y, Maeda E, Sasaki M, Ichinose K, Harada S, Kamata Y, Otagiri M, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T.
  
- (2) Parasitism distribution analysis of *Sarcocystis fayeri* in the horse. *The Japanese Journal of Infectious Diseases*, submitted for publication.  
Furukawa M, Minegishi Y, Yahata Y, Harada S, Kamata Y, Otagiri M, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T.

## 目次

第1章	緒言	1
第2章	LAMP法を活用した <i>S. fayeri</i> の簡易検査法の開発	7
第1節	序	7
第2節	LAMP法に用いるプライマーの設計	9
第3節	検査手順の設計	11
第4節	簡易検査法の妥当性評価	12
4-1	コラボスタディーの実施	12
4-2	コラボスタディー用の検体調整	13
4-3	コラボスタディーの結果	13
4-4	厚生労働省の通知への収載	15
第5節	考察	15
第6節	小括	16
第3章	ウマ体内における <i>S. fayeri</i> の寄生分布解析	
第1節	序	18
第2節	検査に供した馬体について	18
第3節	各ウマに関する <i>S. fayeri</i> の検出状況	20
3-1	各ウマの <i>S. fayeri</i> の検出状況	20
3-2	各喫食部位における <i>S. fayeri</i> の検出状況	22
第4節	主成分分析を用いた <i>S. fayeri</i> 高濃度寄生部位	24
4-1	主成分分析結果	24
4-2	高濃度寄生部位の選定	25

第5節	考察	27
第6節	小括	28
第4章	簡易検査法の有効性評価	30
第1節	序	30
第2節	簡易検査法及びリアルタイム PCR 法における検出状況の比較	30
2-1	検査部位の選定	30
2-2	簡易検査法による <i>S. fayeri</i> の検出状況	31
2-3	リアルタイム PCR 法による <i>S. fayeri</i> の検出状況について	32
2-4	簡易検査法の有効性について	34
第3節	考察	36
第4節	小括	37
第5章	総括	39
実験の部		42
謝辞		47
参考文献		48

## 第1章 緒言

平成15年から生鮮食品を共通食とする既知の細菌、ウイルス、自然毒及び化学物質等が検出されない原因不明有症事例（食中毒事例を含む）が全国的に増加しており、原因が特定できないため、多くの事例が有症苦情として処理されていた。厚生労働省への報告によると、平成21年から平成23年3月までに、原因不明有症事例が198件発生しており、このうち、提供されたメニューに生食用馬肉（馬刺し）が含まれていた事例は33件あった。いずれも、症状は嘔吐や下痢といった食中毒様症状であり、喫食後数時間で発症している。発症までの時間は平均して6時間程度であり、回復は早く、予後は良好であるが、事例が増え続けていることから、喫緊に予防対策を講じる必要があった。

熊本県においても、平成23年頃までは、食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢といった食中毒様症状を伴う事例が年間20件以上発生しており、その共通食に生食用馬肉が含まれていた。発症までの期間が細菌性の食中毒に比べると早いことから、毒素型の食中毒や消化器症状を呈するアレルギー等が疑われたが、既知の食中毒菌や下痢症ウイルスは検出されず、原因不明有症事例として処理されており、行政指導等の対応に苦慮していた。

そのような中で、原因物質の一つの候補として寄生虫の可能性を検討するため<sup>1)</sup>、有症事例関連の保存馬肉を実体顕微鏡で観察し、住肉胞子虫 (*Sarcocystis*) の寄生を調べたところ、多数のシスト (嚢胞) が確認された。住肉胞子虫はアピコンプレックス門、胞子虫綱、コクシジウム目、住肉胞子虫科の寄生原虫で<sup>2)</sup>、中間宿主及び終宿主の間に生活環を持っている。また、筋肉内にはシストと呼ばれる嚢胞が形成され、嚢胞の中には、腸管上皮細胞に侵入し、次世代を形成することができるブラディゾイトと呼ばれる虫体が多数存在している。ウマを



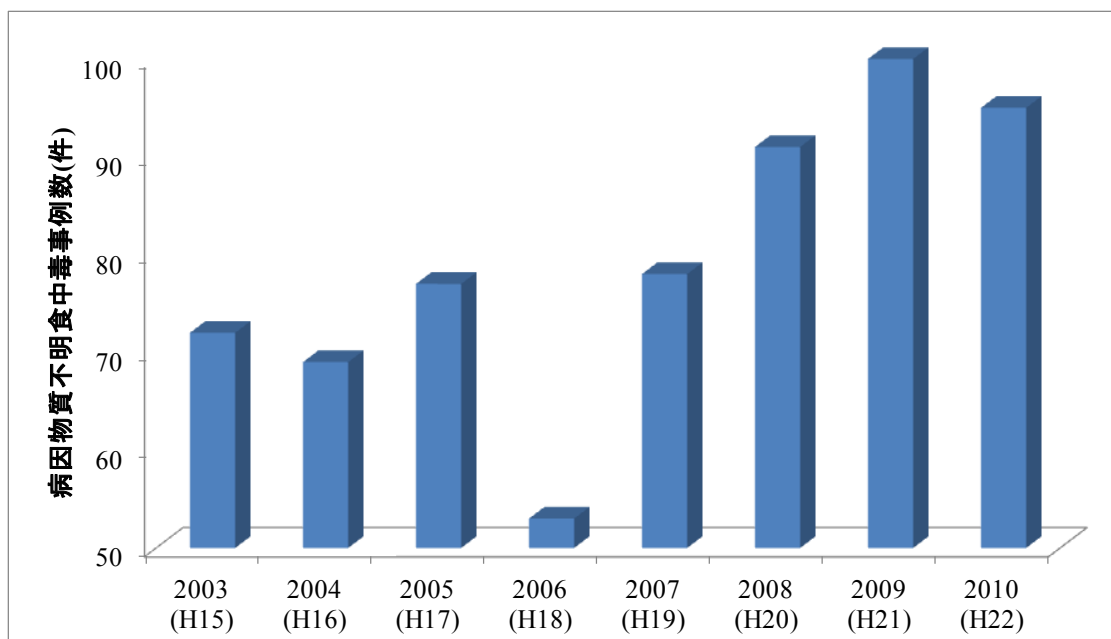


Fig. 1 厚生労働省に報告があった病因物質不明食中毒事例の発生件数（年別の状況，有症苦情は含まない）

中間宿主とする住肉胞子虫には, *Sarcocystis bertrami* (*S. bertrami*)<sup>3,4</sup>, *S. fayeri*<sup>5,6</sup>, *S. equicanis*<sup>7,8</sup>などが知られており, いずれも終宿主はイヌである. しかし, これらの住肉胞子虫は, ヒトに感染して嘔吐や下痢といった食中毒様症状を引き起こすような報告はなく<sup>9-12</sup>, 当時は原因物質として特定するまでには至らなかった.

その後, 厚生労働省の特別研究調査により, 馬肉に寄生している住肉胞子虫は *S. fayeri* であることが確認された. *S. cruzi* のブラディゾイトには, ウサギに対し下痢原性を有している物質を含んでいるが<sup>13</sup>, *S. fayeri* も同様にウサギに対し下痢原性を有しており, その下痢原性は, ブラディゾイトの構成タンパク質の1つである 15 kDa のタンパク質に起因するものであることが報告されている<sup>14,15</sup>).

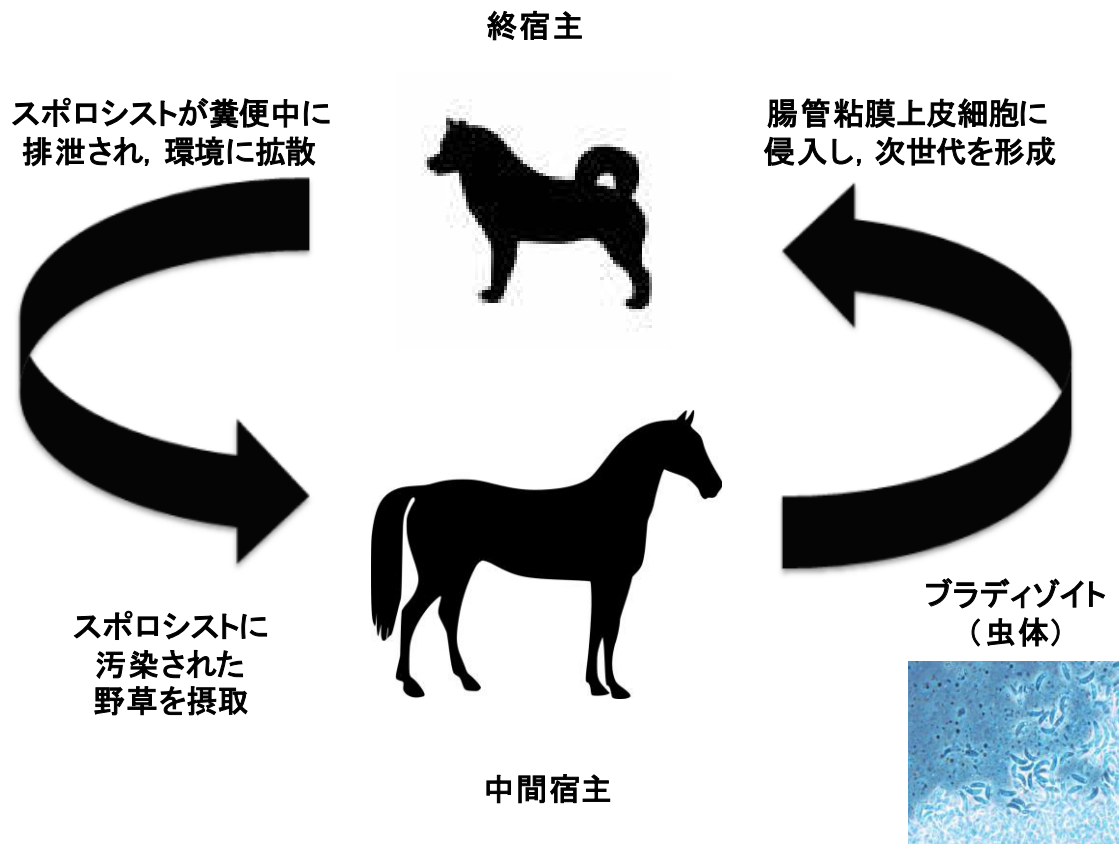


Fig. 2 *S. fayeri* の生活環

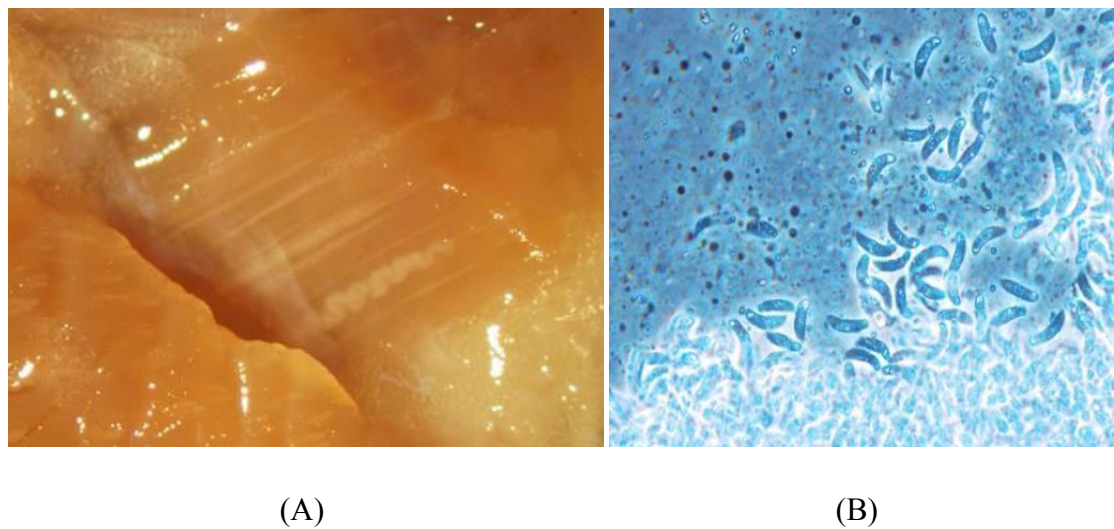


Fig. 3 馬肉中の *S. fayeri* のシスト(A) 及びブラディゾイト(B)

Table 1 *S. fayeri* が死滅する冷凍処理条件

処理時間(h) \ 冷凍温度	1	1.5	2	3	6	12	18	24	36	48
-20 °C					0/9	0/9		3/9		9/9
-30 °C					0/9	2/9	6/9	8/9	9/9	
-30 °C(急速冷凍)					0/9	5/9	9/9	9/9		
-35 °C					0/9	5/9	8/9	9/9		
-40 °C	0/9		0/9	7/9			9/9	9/9		
-60 °C	2/9		8/9		8/9	9/9				
-196 °C(液体窒素)	9/9	9/9								

各冷凍温度で、一定の処理を行い、その時の *S. fayeri* の死滅状態を確認した。なお、分数表示は死滅数/検査数を示す。

このような状況下の中、生食用馬肉に起因する有症事例の原因は究明されたものの、その予防対策を講じる必要があったため、*S. fayeri* 有症事例の制御法として、馬肉の冷凍処理が検討された。検討の結果、一定の冷凍処理 (Table 1) を行うことで、*S. fayeri* を死滅させることができ、その毒性がペプシン消化により失活することが証明された<sup>15)</sup>。

このことに併せて、厚生労働省は馬肉中の *S. fayeri* の検査法について、通知を发出しており、各都道府県においては、この通知に基づき検査を実施しているところである<sup>16,17)</sup>。具体的な *S. fayeri* の検査法は、コンベンショナル PCR により馬肉中の *S. fayeri* の 18S rRNA の遺伝子を検査し、陽性である検体については、馬肉を直接実体顕微鏡で観察し、*S. fayeri* を検出する方法である。

しかしながら、この検査法については、PCR に時間を要し、煩雑な操作も必要であり、実体顕微鏡での観察については、筋肉中のシストと脂肪との区別がつきにくいことから、汎用性に乏しいと考えられる。通常、と畜から食肉処理を経て、馬肉は市場に流通するが、馬肉の衛生管理を徹底するためには、市場に流通する前の段階での試験検査の実施が非常に有意義だと考えられるが、現

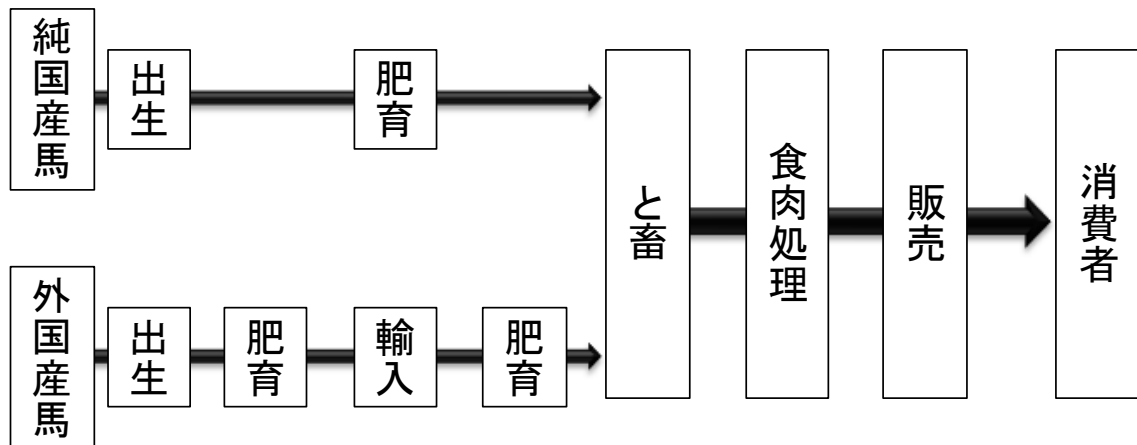


Fig. 4 純国産馬と外国産馬の流通経路の比較

日本国内に流通している馬肉の中で、外国からウマを生体で仕入れている場合の流通経路を示している。なお、その他には、国内の一部には、馬肉ブロックを冷凍して輸入している経路もある。

状の方法では、検査に時間を要し、検査員の資質の向上が必要となってくるため、食肉処理段階等での試験検査を実施することは非常に難しいと考えられる。よって、馬肉の衛生管理の向上を図ることを考えれば、比較的短時間で、汎用性の高い試験法を開発することが必要であり、有症事例を引き起こす可能性のある馬肉を流通させず、一般消費者を守るといった食品衛生の確保の観点からも、簡易検査法の開発は非常に有意義であると考えられる。

一方で、*S. fayeri* の病原性に関する研究については、報告があるものの<sup>15, 18)</sup>、ウマにおける寄生分布の解明は実施されておらず、寄生の多い部位や寄生の見られない部位等は解明されていない。生食用馬肉に関連する有症事例では、同じ馬体の馬肉を喫食しているにも関わらず、一つのグループでは発症し、他のグループでは発症しない事例が確認されており、同じ馬体でも寄生の偏在があるのではないかと推察される。よって、馬肉の衛生管理の向上や有症事例発生時の検査部位の選定等のために、寄生部位の偏在等を明らかにすることが非常

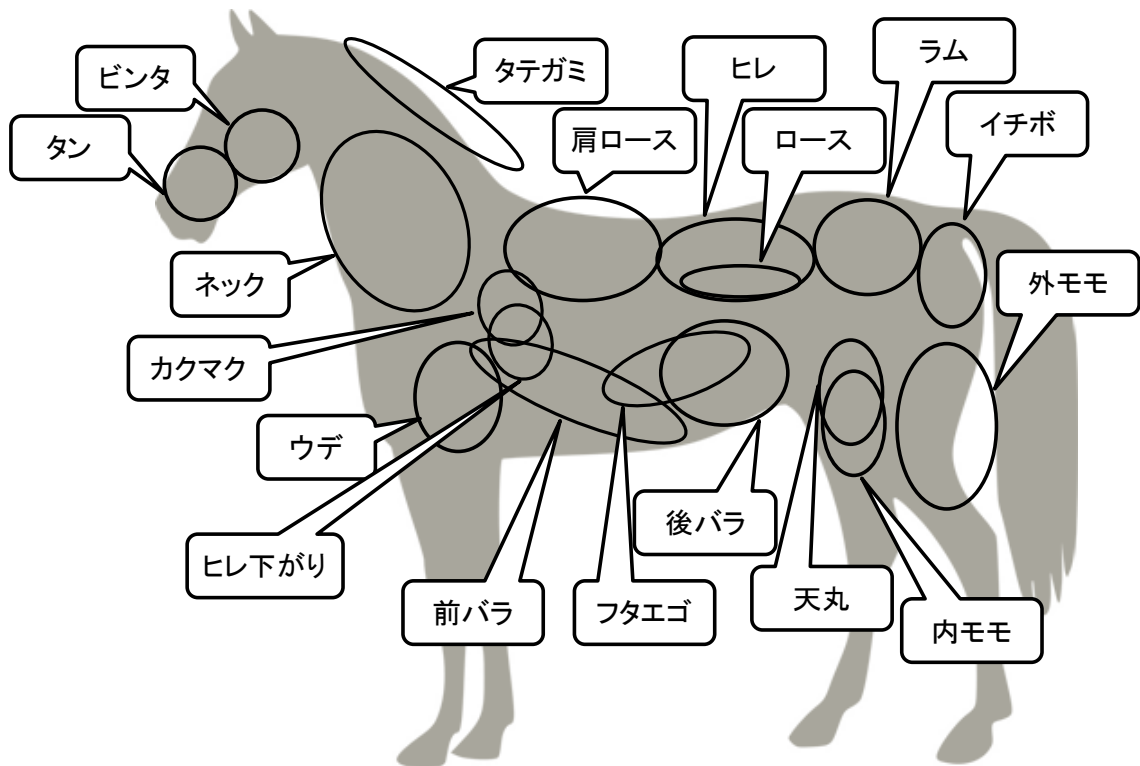


Fig. 5 喫食されている馬肉の部位名

に有意義であると考えられる。

このような背景の下、*S. fayeri* の簡易検査法の開発や寄生分布の解析するために、第 2 章において、簡易検査法として有用であると考えられる loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を活用した *S. fayeri* 簡易検査法について検討した。次いで、第 3 章では、馬肉中の *S. fayeri* の寄生分布について解析を行った。また、第 4 章では、簡易検査法として検討した LAMP 法について、有用性評価を行った。第 5 章では、第 1 章から第 4 章までを総括した。以下に、得られた知見を詳述する。

## 第2章 LAMP法を活用した *S. fayeri* の簡易検査法の開発

### 第1節 序

微生物学的な細菌やウイルスの検出方法は、生化学性状の検査<sup>19, 20)</sup>や遺伝子検査法が主流である。遺伝子検査法は、PCR法<sup>21, 22)</sup>、LAMP法<sup>23, 24)</sup>、Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)<sup>25, 26)</sup>、Self-sustained sequence replication (SSR)<sup>27, 28)</sup>及び Strand displacement amplification (SDA)<sup>29, 30)</sup>等があり、これらの中でも、LAMP法は、様々な細菌やウイルスの検出に活用されている<sup>31-33)</sup>。

LAMP法は、コンベンショナルPCRと違い、複数種類のプライマーやループプライマーを用いることで、標的遺伝子の増幅効率を高めている方法である (Fig. 6)。基本的には、コンベンショナルPCRと同様に反応が進むが、途中鋳型DNAがループを形成し、長鎖DNAを形成していくことで、より標的遺伝子の増幅効率を高めている。また、短時間の恒温反応により標的遺伝子量を多量に増幅させることができる方法であり、操作も簡便である。よって、LAMP法を活用することで、短時間で簡便に標的遺伝子を増幅し検出することができる試験検査法を開発することが可能となる。

*S. fayeri*の遺伝子検査法は、厚生労働省の通知で示されているコンベンショナルPCR法であり、DNA抽出作業やPCR反応等、時間がかかり、煩雑な操作が必要である。そこで、本章では、LAMP法を活用した *S. fayeri* の簡易検査法の開発のための検討を行った。

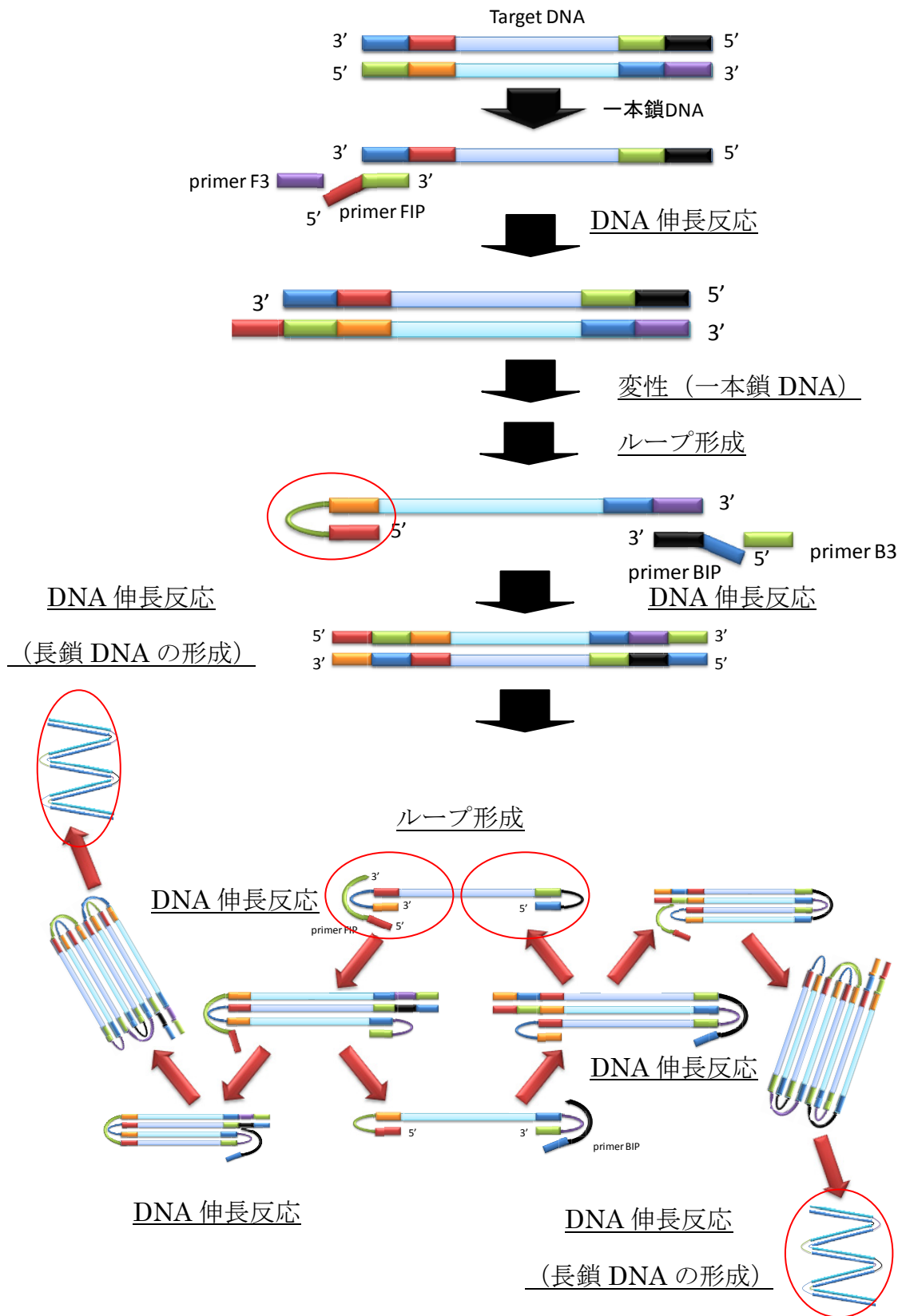


Fig. 6 LAMP 法の原理

## 第2節 LAMP法に用いるプライマーの設計

まず、LAMP法に用いるプライマーの設計を行った。*S. fayeri*の検査法に用いている18S rRNAの増幅領域(1,100 bp)は、他の住肉胞子虫と相同性が高いことがわかっており、種の中で比較的保存されている領域である。

この18S rRNAの配列を用いると、他の種と交差反応が起こり、目的とする遺伝子以外の遺伝子が増幅される可能性がある。そこで、*S. fayeri*の病原性を示す15 kDaタンパク質に着目した。15 kDaタンパク質のイントロン部分も含めたDNA塩基配列を用いて、OptiGene社のLAMP DesignerによりLAMPプライマーの設計を行った(Table 2, Fig.7)。なお、15 kDaタンパク質のDNA塩基配列は、国立感染症研究所寄生動物部の八木田博士から提供いただいた。

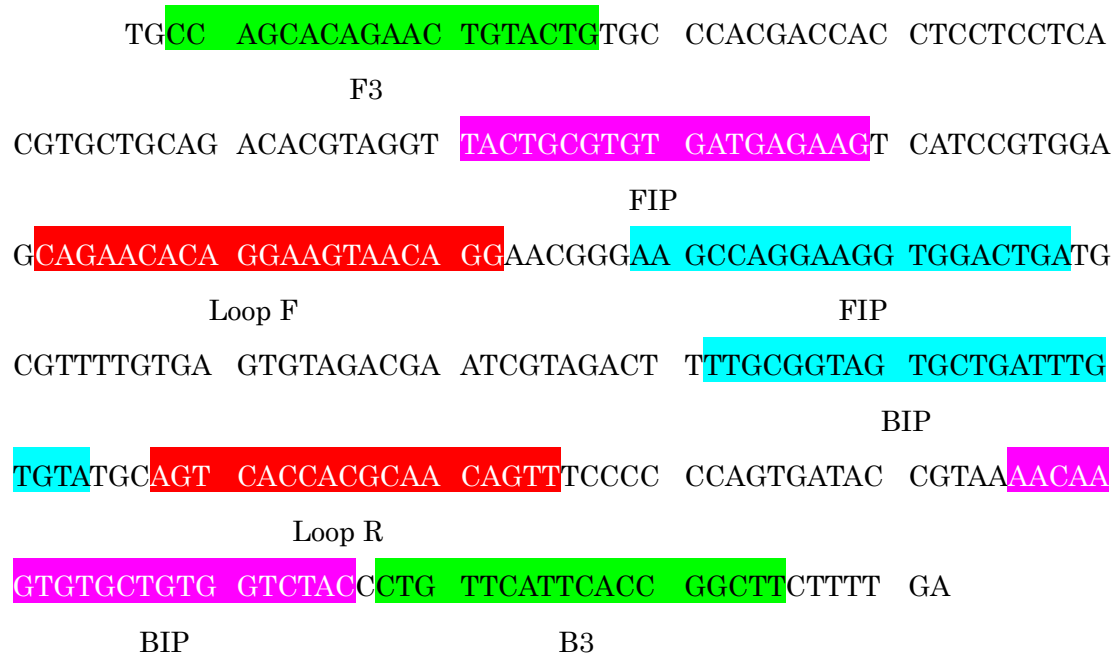


Fig. 7 *S. fayeri*のLAMPプライマー設定用の塩基配列



Table 2 LAMP 法に使用したプライマー配列

プライマー名	塩基配列
C-gADF-F3	5'-CCAGCACAGAACTGTACTG-3'
C-gADF-B3	5'-AAGCCGGTGAATGAACAG-3'
C-gADF-FIP	5'-TCAGTCCACCTTCCTGGCTTTACTGCGTGTGATGAGAAG-3'
C-gADF-BIP	5'-TTGCGGTAGTGCTGATTTGTGTAGACCACAGCACACTTGTT-3'
C-gADF-LoopF	5'-TCCTGTTACTTCCTGTGTTCTG-3'
C-gADF-LoopB	5'-AGTCACCACGCAACAGTT-3'

LAMP 法に用いたプライマーは、ADF の遺伝子配列（イントロンを含む）を基に、LAMP Designer (OptiGene Inc.)で設計した。

今回設計したプライマーについて、他の *Sarcocystis* 属、細菌や他の寄生虫に対する交差反応は確認していないが、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて、標的遺伝子の塩基配列との相同性について確認したところ<sup>34)</sup>、相同性の高い塩基配列は確認されなかった。

### 第3節 検査手順の設計

検査フローにある馬肉からの DNA 抽出は、食肉処理場等でも実施が可能となるように、簡便に抽出できるようにするために、高額な DNA 抽出キットや機器を必要としないニッポンジーン株式会社の作製している DNA 抽出液を用いることにした。また、DNA ポリメラーゼについても、ニッポンジーン株式会社の販売しているものを使用し、アニーリング温度については、使用する DNA ポリメラーゼの標準的なアニーリング温度に設定した<sup>35)</sup>。

設計した検査法と従来法であるコンベンショナル PCR と操作性及び所要時間を比較した (Table 3)。

Table 3 各検査における簡易検査法及び従来法の費やす時間の比較

	簡易検査法	従来法	(差)
DNA抽出	20分	60分	-40分
遺伝子増幅時間	30分	120分	-90分
電気泳動		30分	-30分
結果判明までの時間	50分	210分	-160分

## 第4節 簡易検査法の妥当性評価

### 4-1 コラボスタディーの実施

今回設計した検査法について、試験室間の再現性を実施するために、5つの機関 (Table 4) が参加したコラボスタディーを実施した。

Table 4 コラボスタディー参加機関

No.	実施機関名
1	熊本県保健環境科学研究所
2	福岡県保健環境研究所
3	大分県衛生環境研究センター
4	神戸市環境保健研究所
5	神戸検疫所

#### 4-2 コラボスタディー用の検体調整

コラボスタディー用の検体には、熊本県保健環境科学研究所が保存している有症事例関連馬肉 (*S. fayeri* 陽性馬肉) 及び *S. fayeri* 不検出の馬肉を用いた。検体調製は、各馬肉を細断してミンチ肉を作製し、目的とする *S. fayeri* の寄生濃度となるように *S. fayeri* 陽性馬肉と陰性馬肉を混ぜ合わせて濃度調整を行った (Table 5)。なお、検体濃度は、リアルタイム PCR 法 (SYBR Green 法) で遺伝子数を定量し、確認している<sup>36)</sup>。また、ミンチ肉の採取位置の違いによる検体濃度の差がないことも併せて確認した。

Table 5 コラボスタディーに用いた検体濃度

No.	Concentration (The number of copy)
1	0
2	$1.7 \times 10^3$
3	$1.0 \times 10^4$
4	$3.0 \times 10^5$
5	$1.2 \times 10^6$

#### 4-3 コラボスタディーの結果

コラボスタディー参加機関の結果は、Fig. 8 及び Table 6 に示すとおりである。

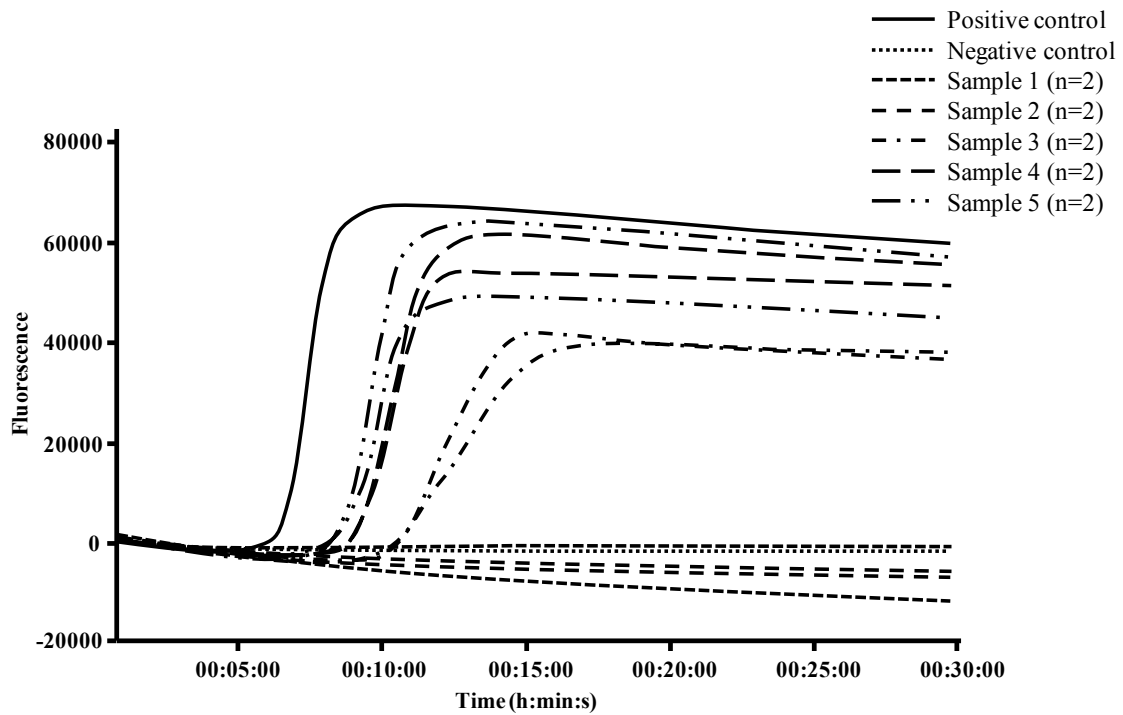


Fig. 8 コラボスタディー参加機関の結果

Table 6 コラボスタディーの結果

検体濃度 (コピー数)	参加機関									
	A	B		C		D		E		
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$1.7 \times 10^3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$1.0 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$3.0 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$1.2 \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-:陰性であり, *S. fayeri* の標的遺伝子は検出されなかった.+:陽性であり, *S. fayeri* の標的遺伝子は検出された.

全ての参加機関の結果は、Fig.8 の参加機関の結果とほぼ同様の遺伝子増幅波形を示しており、各参加機関の結果のとおり、 $10^4$  コピー以上の *S. fayeri* の標的遺伝子を検出できることが確認された。

#### 4-4 厚生労働省の検査法への収載

今回開発した LAMP 法については、試験室間の再現性を確認した結果、各参加機関で  $10^4$  コピー以上の *S. fayeri* の標的遺伝子を検出できることが確認されたことから、「*Sarcocystis fayeri*」の検査法に収載されることが決定した。平成 28 年 4 月 27 日付け生食監発 0427 第 4 号で厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長から通知が発出され、これまで暫定版であった検査法が改訂されることとなった<sup>37)</sup>。

### 第 5 節 考察

コンベンショナル PCR を用いた *S. fayeri* の従来検査法は、時間がかかること及び DNA 抽出の操作が煩雑であるなど、汎用性が低いため、簡易検査法を開発することは、馬肉の衛生管理の向上等の観点から意義深いと考えられる。そこで、本章では、遺伝子検査法の中でも簡易的に行うことのできる LAMP 法を活用し、*S. fayeri* の簡易検査法の開発のための検討を実施した。

今回開発した簡易検査法では、DNA の抽出は、反応試薬を 1 つ加え、加温、攪拌や簡単な遠心分離を行うのみであり、簡便に実施することができる (Table 3)。一方、従来法は、DNA mini kit 等の DNA 抽出キットを用いて、複数のステップが必要となるため、操作が煩雑である<sup>16, 17)</sup>。有症苦情が発生した際や食肉処理場等で *S. fayeri* の検査を導入した場合を考えると、非常に多い検体を処理す

る可能性が高く、出来るだけ簡便な操作で試験検査を実施できることが、有用であると考えられる。このような観点からも、今回開発した簡易検査法は従来法より有用であると考えられる。

また、遺伝子増幅反応においても、従来法は約 2 時間かかり、その後アガロースゲル電気泳動により、標的遺伝子の増幅の有無を確認しなければならない。一方、今回の簡易検査法の場合、遺伝子増幅時間は 30 分であり、リアルタイムで遺伝子増幅を確認することができることから、陽性であれば、最短で 10 分程度で遺伝子の増幅が確認できる。このような点においても、従来法と比べて、簡易検査法は、迅速性が高いと考えられる。

今回の知見により、従来法における検査時間が長いことや操作の煩雑性などを考え合わせると、今回開発した簡易検査法は、*S. fayeri* の検査において従来法に代わる有効な検査法である可能性が示された。

## 第 6 節 小括

本章では、*S. fayeri* の簡易検査法の開発のために詳細に検討した。以下に得られた結果を要約する。

- 1) *S. fayeri* の簡易検査法の開発のため、病因物質である *S. fayeri* の膜タンパク質である 15 kDa タンパク質の DNA (イントロンを含む) を用いて、LAMP プライマーを設計した。
- 2) 設計した LAMP プライマーを用いて、簡易検査法を設計し、従来の定性 PCR 法と比較したところ、迅速かつ汎用性の高い方法であることが確認された。

3) 試験室間の再現性の確認を行うために、5つの機関が参加したコラボスタディーを実施した。その結果、5つの機関全てで、 $10^4$ コピー以上の *S. fayeri* の標的遺伝子を検出できることが確認された。

4) 簡易検査法の試験室間の再現性が確認されたことから、厚生労働省が発出した「*Sarcocystis fayeri*」の検査法に、本簡易検査法が収載された。

以上の結果から、今回開発した簡易検査法は、従来の PCR 法より迅速で汎用性の高い検査法であることが示された。



### 第3章 ウマ体内における *S. fayeri* の寄生分布解析

#### 第1節 序

*S. fayeri* の病原性に関する研究については、報告があるものの、ウマにおける寄生分布の解析は実施されておらず、寄生の多い部位や寄生の見られない部位等は明らかにされていない。生食用馬肉に関連する有症事例では、同じ馬体の馬肉を喫食しているにも関わらず、一つのグループでは発症し、他のグループでは発症しない事例が確認されており、同じ馬体でも寄生の偏在があるのではないかと推察される。有症事例発生時の検査部位の選定等のために、寄生部位の偏在等を明らかにすることが非常に有意義であると考えられる。

また、寄生の有無については、各部位を検査することにより確認することが可能であるが、ウマの生食で喫食することが可能な部位は21部位あり、馬肉の衛生管理の向上を目的に、各部位を個体毎に検査することは、膨大な検体数となり検査費用もかかる。21部位の中で、複数の部位を検査することで、そのウマの個体毎の評価を行うことができれば、時間的にも費用的にも、効率的に検査を行うことができると考えられる。

そこで、本章では、馬体内における *S. fayeri* の寄生分布を明らかにし、高濃度寄生部位の選定のための検討を行った。

#### 第2節 検査に供した馬体について

本調査は、ウマ30頭分の検査を実施している。各ウマの年齢、体重及び原産国等については、Table 7に示すとおりである。

Table 7 調査に供したウマの基本的情報

個体No.	と畜日	産地	仕入れ先	年齢(歳)	体重(kg)	性別
1	2012/6/11	国産	カナダ	3	877	メス
2	2012/6/11	国産	北海道	3	1087	メス
3	2012/6/11	カナダ	カナダ	6	955	メス
4	2012/6/25	国産	熊本県	2	878	メス
5	2012/6/25	カナダ	カナダ	3	990	去勢
6	2012/6/25	カナダ	カナダ	3	933	去勢
7	2012/7/10	国産	カナダ	3	997	去勢
8	2012/7/10	カナダ	カナダ	3	970	去勢
9	2012/7/10	カナダ	カナダ	2	914	去勢
10	2012/7/10	カナダ	カナダ	3	906	メス
11	2013/6/5	国産	熊本県	2	897	メス
12	2013/6/5	カナダ	カナダ	3	814	メス
13	2013/6/5	カナダ	カナダ	3	769	去勢
14	2013/6/19	国産	北海道	3	851	メス
15	2013/6/19	カナダ	カナダ	2	885	メス
16	2013/6/19	カナダ	カナダ	2	963	メス
17	2013/6/19	カナダ	カナダ	2	966	メス
18	2013/7/10	カナダ	カナダ	3	917	メス
19	2013/7/10	カナダ	カナダ	3	1025	去勢
20	2013/7/10	カナダ	カナダ	3	911	メス
21	2014/1/15	カナダ	カナダ	3	833	去勢
22	2014/1/15	カナダ	カナダ	3	895	去勢
23	2014/1/15	カナダ	カナダ	3	907	去勢
24	2014/1/15	カナダ	カナダ	3	888	去勢
25	2014/1/16	カナダ	カナダ	3	998	去勢
26	2014/1/16	カナダ	カナダ	3	974	メス
27	2014/1/16	カナダ	カナダ	3	922	メス
28	2014/1/16	カナダ	カナダ	3	820	去勢
29	2014/1/17	国産	北海道	3	928	去勢
30	2014/1/17	国産	北海道	5	1081	オス

※品種は全てノルマンである。

### 第3節 各ウマに関する *S. fayeri* の検出状況

#### 3-1 各ウマの *S. fayeri* の検出状況

ウマに関する *S. fayeri* の寄生数について、定量 PCR で *S. fayeri* の 18S rRNA を検査したところ、検出状況は Table 8 及び Fig. 9 に示すとおりであり、外国産馬については全て陽性となっており、純国産馬については全て陰性であった。外国産馬における寄生量を比較したところ、最大で  $6.0 \times 10^7$  copies/g (No.5)、最小で  $2.2 \times 10^4$  copies/g (No.7)であった。厚生労働省の薬事・食品衛生審議会で公表されたデータによると<sup>36)</sup>、食中毒事例の喫食残品における *S. fayeri* の寄生量は、 $1.2 \times 10^6$  copies/g となっており、No.1, 3, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 17 のものについては、その寄生量より高い寄生量を示していることから、一部のウマにおいては、一定の冷凍処理を行わなければ食中毒を引き起こす可能性があることが示唆された。また、食中毒事例の喫食残品における *S. fayeri* の寄生量に近い値を示したウマもあり、食中毒を引き起こさないためにも、一定の冷凍処理を行う必要があることが示唆された。

Table 8 各ウマの種類における *S. fayeri* の寄生率

種類	試験数(頭)	陽性数(頭)	寄生率(%)
純国産馬	6	0	0
外国産馬	24	24	100
全体	30	24	80

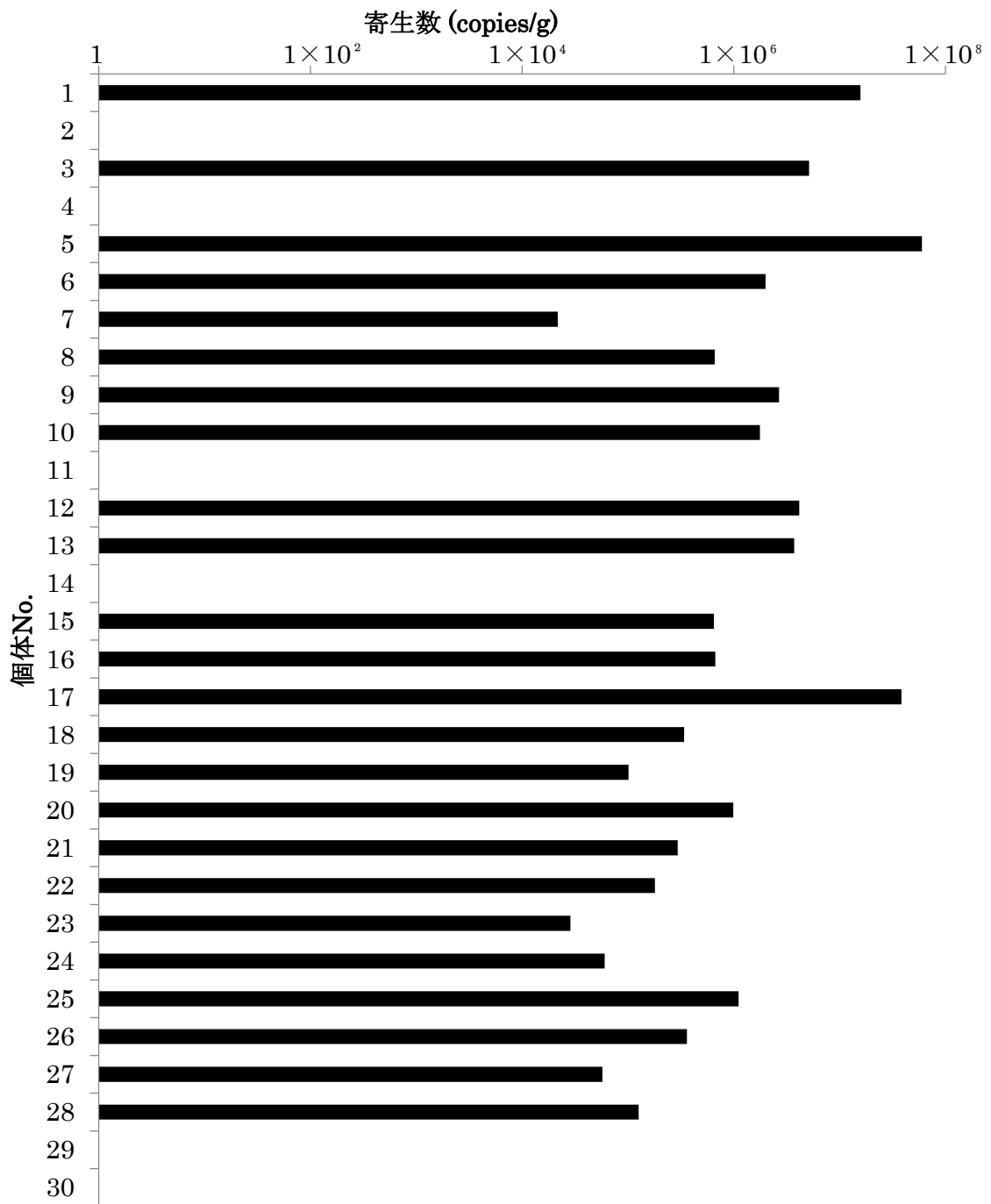


Fig. 9 各ウマにおける *S. fayeri* の寄生量

### 3-2 各可食部位における *S. fayeri* の検出状況

次に、可食部位における *S. fayeri* の検出状況は、Table 9 及び Fig. 10 に示すとおりである。

最も寄生率の高い部位はヒレであり、タテガミ、心臓、肝臓及び心根からは検出されなかった。また、寄生量は、タンが最も高く、*S. fayeri* が検出されている中ではビンタが最も低かった。



Fig. 10 各可食部位における *S. fayeri* の検出結果

Table 9 各可食部位における *S. fayeri* の寄生数

No.	部位名	試験数 (頭)	陽性数 (頭)	寄生率 (%)
1	ビンタ	30	13	43.33
2	タテガミ	30	0	0.00
3	ネック	30	22	73.33
4	肩ロース	30	22	73.33
5	ウデ	30	22	73.33
6	前バラ	30	21	70.00
7	ロース	30	21	70.00
8	後バラ	30	23	76.67
9	ヒレ	30	24	80.00
10	ラム	30	20	66.67
11	天丸	30	23	76.67
12	内モモ	30	23	76.67
13	イチボ	30	21	70.00
14	外モモ	30	23	76.67
15	フタエゴ	30	23	76.67
16	カクマク	30	23	76.67
17	ヒレ下り	30	23	76.67
18	心臓	30	0	0.00
19	肝臓	30	0	0.00
20	心根	30	0	0.00
21	タン	30	20	66.67

## 第4節 主成分分析を用いた *S. fayeri* 高濃度寄生部位

### 4-1 主成分分析結果

ウマ1頭分の *S. fayeri* 寄生の有無を判別することが可能となる部位を選定するために、ウマにおける *S. fayeri* 高濃度寄生部位を選定した。高濃度寄生部位の選定のために、国立感染症研究所保有の統計解析ソフト SPSS を用いて、主成分分析を行った<sup>38-41)</sup>。

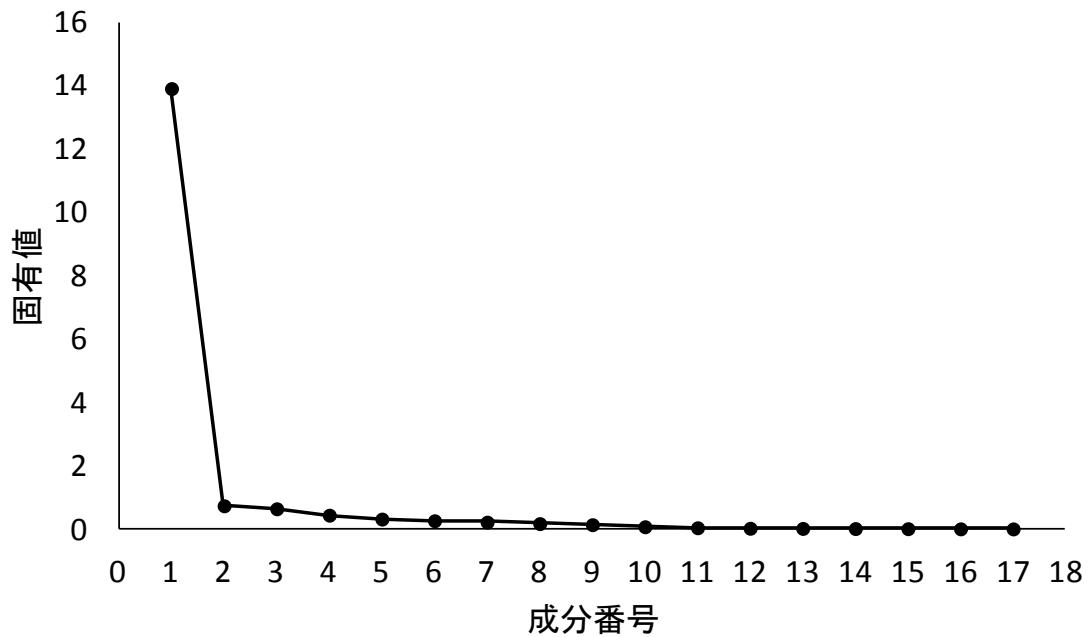


Fig. 11 因子のスクリーンプロット

成分1のみで、分散値が80%を超えるため、高濃度寄生部位の選定には、成分1のみを用いる。

Table 10 各部位の成分行列

	成分1
ビンタ	0.617
ネック	0.894
肩ロース	0.966
ウデ	0.911
前バラ	0.926
ロース	0.945
後バラ	0.886
ヒレ	0.940
ラム	0.846
天丸	0.921
内モモ	0.929
イチボ	0.869
外モモ	0.960
フタエゴ	0.963
カクマク	0.957
ヒレ下り	0.956
タン	0.823

#### 4-2 高濃度寄生部位の選定

得られた成分行列及びウマの各部位の寄生率を用いることで、高濃度寄生部位の選定を行った。成分1と寄生率をかけることで得られた数値は、1に近い部位が高濃度寄生部位であることを示す。得られた結果は、Table 11 に示すとおりとなり、ヒレ、フタエゴ、外モモ、カクマク、ヒレ下りが高濃度寄生部位であることが示された。



Table 11 高濃度寄生部位の選定

No.	部位名	成分1	陽性頭数	検査頭数	寄生率	成分1×寄生率	順位
1	ビンタ	0.617	13	24	0.54	0.3342	17
3	ネック	0.894	22	24	0.92	0.8195	12
4	肩ロース	0.966	22	24	0.92	0.8855	7
5	ウデ	0.911	22	24	0.92	0.8351	10
6	前バラ	0.926	21	24	0.88	0.8103	13
7	ロース	0.945	21	24	0.88	0.8269	11
8	後バラ	0.886	23	24	0.96	0.8491	9
9	ヒレ	0.94	24	24	1.00	0.9400	1
10	ラム	0.846	20	24	0.83	0.7050	15
11	天丸	0.921	23	24	0.96	0.8826	8
12	内モモ	0.929	23	24	0.96	0.8903	6
13	イチボ	0.869	21	24	0.88	0.7604	14
14	外モモ	0.96	23	24	0.96	0.9200	3
15	フタエゴ	0.963	23	24	0.96	0.9229	2
16	カクマク	0.957	23	24	0.96	0.9171	4
17	ヒレ下り	0.956	23	24	0.96	0.9162	5
21	タン	0.823	20	24	0.83	0.6858	16

## 第5節 考察

ウマにおける *S. fayeri* の寄生分布については、筋肉中に寄生する報告はあるものの<sup>42)</sup>、どの筋肉にどの程度寄生するかは現在までに報告はなく、生食用馬肉を共通食とする有症事例では、同じウマの馬肉を喫食しているにも関わらず、一つのグループでは発症し、他のグループでは発症しない事例が確認されている。これらのことから、有症事例発生時の検査部位の選定等のために、寄生部位の偏在等を明らかにすることが非常に有意義であると考えた。

本研究では、外国産馬 24 頭及び純国産馬 6 頭の調査を実施した。外国産馬については全頭寄生が確認され、純国産馬については全頭寄生が確認されなかった。出生が海外であり、海外で一定期間飼育後に生体のまま日本に輸入され一定期間飼育されたものを、本研究では外国産馬と定義付けているが、外国産馬全頭で *S. fayeri* が検出されたことから、*S. fayeri* の生活環が国外の一定の地域では確立されていることが示唆された。一方で、出生が日本国内であり、飼育期間中も国内で行われたウマを、本研究では純国産馬と定義付けているが、純国産馬で寄生が確認されなかったことから、日本国内で *S. fayeri* の生活環が確立されていない可能性が示唆された。

本研究で対象とした外国産馬の中では、最大で  $6.0 \times 10^7$  copies/g の *S. fayeri* の寄生が確認された。その他の外国産馬でも、有症苦情残品から検出された  $1.2 \times 10^6$  copies/g 以上の寄生量が確認されたウマが 9 頭あり、これらが一定の冷凍処理を行わずに市場に流通してしまうと、食中毒を引き起こす可能性が高い。併せて、外国産馬は全頭 *S. fayeri* の寄生が確認されていることから、*S. fayeri* の寄生の有無を確認することなく市場へ流通させる場合は、一定の冷凍処理が必須であると考えられる。

ウマにおける各喫食部位の寄生率を確認したところ、21 部位中 17 部位で寄生

が確認された。本研究で対象としたウマのタテガミ，心臓，肝臓，心根から *S. fayeri* は検出されなかった。他の *Sarcocystis* 属の中には心臓に寄生するものもある<sup>43-45)</sup>。本研究では寄生メカニズムを研究対象としていないため，詳細については不明であるが，今回はウマの心臓から検出されていないことから，種の違いにより，何らかの寄生部位に特徴があると考えられる。また，高濃度寄生部位については，Table 11 のとおりであるが，寄生の確認された 17 部位の中でも，ヒレが最も高濃度寄生部位であることが示された。

## 第 6 節 小括

本章では，*S. fayeri* の寄生分布を明らかにするために詳細に検討した。以下に得られた結果を要約する。

- 1) *S. fayeri* の寄生について，ウマ毎に評価すると，純国産馬からは全く検出されず，外国産馬からは全頭検出された。寄生量にばらつきはあるものの，高濃度寄生のみられるウマもあり，一定の冷凍処理を行わなければ，食中毒を引き起こす可能性があることが強く示唆された。
- 2) *S. fayeri* の寄生について，部位毎に評価すると，ヒレが最も寄生率が高く，タテガミ，心臓，肝臓及び心根からは全く *S. fayeri* の寄生がみられなかった。寄生量にばらつきはあるものの，高濃度寄生のみられる部位もあり，一定の冷凍処理を行わなければ，食中毒を引き起こす可能性があることが強く示唆された。
- 3) 高濃度寄生部位を選定するために，主成分分析を行ったところ，ヒレが最も

高い値を示した。続いて、フタエゴ、外モモ、カクマク、ヒレ下がりが高い値を示しており、これらの部位が高濃度寄生部位であることが示唆された。

以上の結果から、今回 *S. fayeri* の寄生分布を明らかにしたことによって、これらの部位等を選定して検査することで、馬体の寄生状況を把握することができる可能性が強く示唆された。

## 第4章 簡易検査法の有効性評価

### 第1節 序

第2章では簡易検査法の開発について検討を行った。従来法であるコンベンショナルPCRに比べ、短時間で汎用性のある検査法であることが、コラボスタディー等の結果により、強く示唆された。また、第3章では*S. fayeri*の規制分布について解析を行った。各ウマにおいて喫食可能部位の*S. fayeri*の寄生量等を比較したところ、ヒレ、フタエゴや外モモ等が高濃度寄生部位であることがわかり、これらの部位を含め、複数部位を選定することで、馬体の*S. fayeri*の寄生状況がわかることが示唆された。

そこで、本章では、第3章で高濃度寄生部位であるヒレ等を含め、複数部位を検査する際に、第2章で開発した簡易検査法が従来法と比べ、実用的であるかどうかについて、有効性評価を行うための検討を行った。

### 第2節 簡易検査法及びリアルタイムPCR法における検出状況の比較

#### 2-1 検査部位の選定

第3章で高濃度寄生部位としたヒレ、フタエゴ、外モモ、カクマク、ヒレ下がりの中で、ヒレ、外モモを選択し、その他の部位として、天丸を選択した。

これらの部位について、リアルタイムPCR法及び簡易検査法を実施し、その結果について比較検討を行うこととした。

## 2-2 簡易検査法による *S. fayeri* の検出状況

ヒレ，外モモ及び天丸について，簡易検査法を実施した結果は，Table 12 に示すとおりである。

Table 12 簡易検査法による *S. fayeri* の検出結果

個体No.	ヒレ	外モモ	天丸
1	-	+	-
2	-	-	-
3	+	-	-
4	-	-	-
5	+	+	+
6	+	-	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	-	-	+
10	+	+	-
11	-	-	-
12	+	+	+
13	+	+	+
14	-	-	-
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	-
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	-	+
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	-	+	+
28	+	+	-
29	-	-	-
30	-	-	-

+ : *S. fayeri* を検出， - : *S. fayeri* を不検出

結果より，純国産馬 (No.2, 4, 11, 14, 29, 30) について，*S. fayeri* は検出されなかった．また，外国産馬について，それぞれの部位によって，*S. fayeri* が検出された部位や検出されなかった部位があった．

### 2-3 リアルタイム PCR 法による *S. fayeri* の検出状況について

ヒレ，外モモ及び天丸について，リアルタイム PCR 法を実施した結果は，Table 13 に示すとおりである．なお，1 g を 5 ヶ所採取した結果に加えて，10 g を採取してホモジナイズした検体を用いてリアルタイム PCR 法を実施した．

結果より，純国産馬 (No.2, 4, 11, 14, 29, 30) について，*S. fayeri* は検出されなかった．また，外国産馬について，それぞれの部位によって，*S. fayeri* が検出された部位や検出されなかった部位があった．

また，1 g 採取による結果と 10 g 採取による結果について比較すると，No.7 の天丸及び No.27 の外モモについては，1 g 採取による方法では，*S. fayeri* が検出されなかったものの，10 g 採取による方法で *S. fayeri* が検出されている．このことについて，直接的な原因については不明であるが，*S. fayeri* は筋肉中でシストを形成して寄生しており，1 g 採取した検体にはそのシストがなく，10 g 採取した検体には，シストが含まれていたため検出された可能性が高い．

Table 13 リアルタイム PCR 法結果

No.	ヒレ		外モモ		天丸	
	1g 採取	10g 採取	1g 採取	10g 採取	1g 採取	10g 採取
1	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+
27	+	+	-	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-

+ : *S. fayeri* を検出, - : *S. fayeri* を不検出



## 2-4 簡易検査法の有効性について

簡易検査法及びリアルタイム PCR 法の結果については, Table 12 及び Table 13 のとおりであり, 各検査法の結果が一致したものは 87 %であった. 純国産馬について, 全ての検査法において *S. fayeri* は検出されなかった. 外国産馬については, 各検査法の結果が一部一致しなかった. しかしながら, *S. fayeri* の寄生が判明しているウマについて, 各部位別にみると *S. fayeri* が検出されていなくても, 3 部位の結果を合わせて確認すると, *S. fayeri* が検出されている部位が 1 つ以上ある. そのため, *S. fayeri* の有無を判別するためには 3 つの部位を検査し, 1 つでも *S. fayeri* が検出されれば, *S. fayeri* が寄生していると推定することが可能であることが示唆された.

なお, 簡易検査法及びリアルタイム PCR 法の結果で, 相違のあったものについて取りまとめた結果は, Table 14~16 のとおりである.

Table 14 簡易検査法及びリアルタイム PCR 結果の比較 (ヒレ)

No.	ヒレ		
	簡易検査法	1g 採取	10g 採取
1	-	+	+
9	-	+	+
27	-	+	+

+ : *S. fayeri* を検出, - : *S. fayeri* を不検出

Table 15 簡易検査法及びリアルタイム PCR 結果の比較 (外モモ)

No.	外モモ		
	簡易検査法	1g 採取	10g 採取
3	-	+	+
9	-	+	+
23	-	+	+
27	+	-	+

+ : *S. fayeri* を検出, - : *S. fayeri* を不検出

Table 16 簡易検査法及びリアルタイム PCR 結果の比較 (天丸)

No.	天丸		
	簡易検査法	1g 採取	10g 採取
1	-	+	+
7	+	-	+
10	-	+	+
20	-	+	+
28	-	+	+

+ : *S. fayeri* を検出, - : *S. fayeri* を不検出

また、簡易検査法及び 10 g 採取による方法で *S. fayeri* が検出され、1 g 採取による方法では検出されなかったものについては、直接的な原因については不明であるが、*S. fayeri* は筋肉中でシストを形成して寄生しており、1 g 採取した検体にはそのシストがなく、簡易検査法や 10 g 採取した検体には、シストが含まれていたため検出された可能性が高い。

### 第3節 考察

第2章では簡易検査法の開発, 第3章では *S. fayeri* の寄生分布を解析しており, それぞれ得られた結果については, ウマの衛生管理の向上等に非常に意義のある結果であることが強く示唆されている.

本章では, それらの結果を踏まえ, 第3章で選定した高濃度寄生部位を用いて第2章で開発した簡易検査法を用いることで, ウマにおける *S. fayeri* の寄生の有無を判別でき, 検査時間の短縮等を図れないか検討を行った. その結果, 約87%の検体では, 簡易検査法及びリアルタイム PCR 法で得られた結果に相違はみられなかったが, 一部の検体において, 結果に相違が確認された.

個別の事象について確認すると, 1 g 採取による方法で *S. fayeri* が検出され, 簡易検査法で検出されなかったものについては, 簡易検査法で採取した検体にはシストが少なかつたため, 検出できなかったのではないかと考えられる. 簡易検査法で不検出であり, 10 g 採取による方法で検出されている検体については, 何らかの物質により LAMP 反応を阻害されて検出されなかったことが考えられるが, 直接的な原因については究明することができなかった.

一方, 簡易検査法で *S. fayeri* が検出され, 1 g 採取による方法では検出されなかったもの場合は, 1 g 採取した5か所にシストがなかつたため, 検出できなかった可能性が考えられる. 10 g 採取による方法では検出されているため, 筋肉中のシストの分布に偏在がある可能性が考えられた.

なお, 簡易検査法の有用性について総合的に考えると, *S. fayeri* の寄生が確認されているウマについて, 各部位の個別結果が陰性であったとしても, 今回選定した3部位の結果から1部位でも *S. fayeri* が検出されれば, そのウマにおいて *S. fayeri* の寄生が確認できたと判断することが可能であることが示唆された. また, 純国産馬のように *S. fayeri* の寄生が見られないウマについては, 3部位とも

陰性であれば、*S. fayeri* は寄生していないと判断することが可能であることが示唆された。

#### 第4節 小括

本章では、簡易検査法の有用性を評価するために詳細に検討した。以下に得られた結果を要約する。

1) 本章で選定した3部位（ヒレ、外モモ、天丸）について、簡易検査法を実施したところ、純国産馬について、*S. fayeri* は検出されなかった。また、外国産馬について、それぞれの部位によって、*S. fayeri* が検出された部位や検出されなかった部位があった。

2) リアルタイム PCR 法を選定した3部位について実施したところ、純国産馬について、*S. fayeri* は検出されなかった。また、外国産馬について、それぞれの部位によって、*S. fayeri* が検出された部位や検出されなかった部位があった。

3) 簡易検査法及びリアルタイム PCR 法の結果を比較したところ、約 87%の検体については、一致する結果となったが、一部の検体で相違のある結果が得られた。個別のウマにおける *S. fayeri* の寄生の有無を判別する際は、3部位の検査を実施し、1部位でも陽性となれば、そのウマには *S. fayeri* が寄生していると判断することが可能であることが示唆された。また、3部位とも陰性であれば、*S. fayeri* は寄生していないと判断することが可能であることが示唆された。

以上の結果から、今回開発した簡易検査法は、リアルタイム PCR 法とほぼ同

等の結果が得られているため、高濃度寄生部位を含む3部位を検査することで、そのウマにおける *S. fayeri* の寄生の有無を判別することが可能であることが示唆され、今回開発した簡易検査法は有効であることが強く示唆された。

## 第5章 総括

原因不明有症事例の共通食に馬刺しが含まれることが多くあり，その原因については，*S. fayeri* であることが示されている．*S. fayeri* 検査法の検討や *S. fayeri* の寄生分布等の基礎的研究が積極的になされていなかった．そこで本研究では，*S. fayeri* の簡易検査法の開発やウマにおける *S. fayeri* の寄生分布の解析について，各種の検討を実施した．

まず第2章では，LAMP法を用いた簡易検査法の開発について検討した．次いで第3章では，*S. fayeri* のウマにおける寄生分布の解析を行い，どの部位が高濃度寄生部位に該当するか検討した．さらに第4章では，今回開発した簡易検査法が他の方法に比べ有用であるか検討した．以下に本研究で得られた知見を総括する．

### 1) LAMP法を活用した *S. fayeri* の簡易検査法の開発 (第2章)

従来法がコンベンショナルPCR法を採用し，結果が得られるまでに時間がかかり，汎用性の低い方法であった．コンベンショナルPCR法と比べ，非常に短時間で検査結果を得ることができ，汎用性の高い検査法であるLAMP法を採用することによる簡易検査法の開発について検討した結果，検出感度が $10^4$ コピーの検査法を開発した．また，5つの機関が参加したコラボスタディーを実施することで実験室間の室間再現性について確認し，全ての機関で一致する結果が得られた．以上の結果より，今回開発した簡易検査法は，従来法と比べて迅速で汎用性の高い検査法であることが示された．

## 2) 馬体内における *S. fayeri* の寄生分布解析 (第3章)

*S. fayeri* はウマの筋肉内にシストを形成し寄生していることから、*S. fayeri* の偏在が考えられた。そこで、ウマの可食部位を調べることにより高濃度寄生部位を選定するために検討した結果、調べた6頭の純国産馬は*S. fayeri* の寄生が確認されなかった。24頭の外国産馬については全て*S. fayeri* の寄生が確認された。部位別にみると、タテガミ、心臓、肝臓及び心根については、純国産馬及び外国産馬ともに*S. fayeri* の寄生が確認されなかったが、その他の部位については、寄生量にばらつきがみられるものの、*S. fayeri* の寄生が確認された。主成分分析を行い、高濃度寄生部位を選定したところ、ヒレ、フタエゴ、外モモ、カクマク及びヒレ下がりが高濃度寄生部位であることが示唆された。以上の結果から、今回*S. fayeri* の寄生分布を明らかにしたことによって、これらの部位等を選定して検査することで、馬体の寄生状況を把握することができる可能性が強く示唆された。

## 3) 簡易検査法の有用性評価 (第4章)

*S. fayeri* の寄生分布の解析により選定した高濃度寄生部位を含めた複数の部位を簡易検査法で検査し、そのウマにおける*S. fayeri* の寄生の有無を判別することが可能か、リアルタイムPCR法との結果と比較検討した。簡易検査法では、純国産馬については*S. fayeri* が全く検出されず、外国産馬については、検出された部位と検出されなかった部位があった。リアルタイムPCR法で得られた結果と比較したところ、半数以上の検体で結果の一致が確認されたものの、一部の検体では結果に相違が見られた。しかしながら、今回選定した3部位の中で、1部位でも*S. fayeri* が検出されたウマについては、*S. fayeri* が寄生していることを

判別することが可能であり，3 部位全てで *S. fayeri* が検出されなかったウマについては，リアルタイム PCR 法とほぼ同様の結果が得られることから，*S. fayeri* が寄生していないと判別することが可能であり，今回開発した簡易検査法は有効であることが強く示唆された．

以上述べてきたように，*S. fayeri* の寄生分布解析により選定された高濃度寄生部位を含む 3 部位を，今回開発した汎用性の高い簡易検査法で検査することにより，迅速にウマの個体別に *S. fayeri* の寄生の有無を判別することが可能となることが示された．今回得られた知見は，馬肉に関する衛生管理の向上に寄与するだけでなく，食品衛生の向上のために検査法を開発する上での有益な基礎データになるものと考えられる．



## 実験の部

### 実験試料

馬肉は熊本県内の食肉処理業者より購入したものをを使用した。リアルタイム PCR 法に用いた SYB Green 及び LAMP 法に用いた試薬類はニッポンジーン株式会社から恵与されたものをを使用した。DNA 抽出を行うために使用した QIAamp DNA Mini Kit は、キアゲン社より購入した。その他、試薬、溶媒類は全て市販特級品を使用し、溶媒としての水はイオン交換水またはミリ Q 水を使用した。

### 統計解析 (主成分分析)

高濃度寄生部位を選定するために行った主成分分析は、国立感染症研究所の統計解析ソフト SPSS Statistics を用いて行った。

## 第 2 章に関する実験

### 1. LAMP 用プライマーの設計

プライマーの設計には、国立感染症研究所の八木田博士から提供のあった *S.fayeri* の 15 kDa タンパク質の DNA 配列をもとに、OptiGene 社の LAMP Designer により行った。

### 2. LAMP 法

*Sarcocystis*-LAMP Kit を用いて行った。2.0 mL チューブに馬肉 300 mg を採取して、EasyPrep Reagent for LAMP (簡易 DNA 抽出液)を 300  $\mu$ L 添加してよく攪

拌する。ヒートブロックにて 95 °C, 10 分間保温し, その後 1 分間氷冷した。15,000 ×g で 5 分間遠心分離し, その上清 100 μL を回収し, DW400 μL を加え, Template DNA とした。LAMP プライマー等を加えている Pre Mix 及び Template DNA を混合して反応液を作製し, OptiGene 社の Genie II<sup>46,47)</sup>を用いて LAMP 反応を行った。なお, 反応液の組成及び LAMP 反応の条件は次の通りである。

<反応液の組成>

1.5× Isothermal Master Mix	15 μL
5× LAMP Primer Mix	5 μL
Template DNA	5 μL
Total	25 μL

<LAMP 反応条件>

反応温度 66 °C

反応時間 30 分

なお, Isothermal Raito のピーク時間が 5-30 分の記載があり, 会合曲線解析のピーク温度が陽性コントロールの温度 86.5 ± 2 °C の範囲の場合を陽性として判定した。また, Isothermal Ratio のピーク時間の記載がない場合でも, Amplification で増幅が確認出来て, 会合曲線解析のピーク温度が所定の範囲であれば, 陽性と判定した。

第 3 章に関する実験

## 1. 馬肉の採取

熊本県内の食肉処理業者より，各喫食部位を 100 g 購入しており，任意の 5 か所から 1×1×0.5 cm (約 1 g) 切り出し，ミンチ状に細断したものを検体として用いた．

## 2. 馬肉からの DNA 抽出

ミンチ状に細断したものから，1.5 mL チューブに 300 mg 採取し，TE で 1 g にメスアップし，よく混和した．混和後は，1000×g でフラッシングを行い，上清 200 μL を DNA 抽出用に用いた．DNA 抽出作業は，QIAamp DNA Mini Kit の使用方法に準じて行った<sup>48)</sup>．なお，最終溶出液である AE Buffer は 100 μL 添加し，Template DNA を作製した．

## 3. リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR は，Yagita らの方法<sup>36)</sup>に準じて行った．なお，コピー数の定量は，ニッポンジーン株式会社から恵与された陽性コントロールを用いて，定量を行った．

## 4. 主成分分析

主成分分析は，国立感染症研究所の統計解析ソフト SPSS Statistics を用いて行った<sup>49, 50)</sup>．なお，各馬肉から検出された寄生量はばらつきが大きいことから，対数変換を行い，統計解析を行った．

## 5. *S. fayeri* の高濃度寄生部位の選定

主成分分析で得られた結果は，Table 17 に示すとおりである．結果より，成分 1 のみで分散値が 80% を超えたため，成分 1 で得られる成分行列のみを用いた．

Table 17 主成分分析結果

成分	初期の固有値			抽出後の負荷量平方和		
	合計	分散の %	累積 %	合計	分散の %	累積 %
1	13.902	81.777	81.777	13.902	81.777	81.777
2	.733	4.309	86.086			
3	.639	3.760	89.845			
4	.437	2.573	92.418			
5	.314	1.850	94.268			
6	.261	1.534	95.801			
7	.217	1.277	97.079			
8	.171	1.007	98.085			
9	.137	.803	98.889			
10	.072	.426	99.315			
11	.040	.236	99.551			
12	.024	.139	99.690			
13	.019	.111	99.801			
14	.014	.080	99.882			
15	.011	.063	99.944			
16	.006	.033	99.977			
17	.004	.023	100.000			

高濃度寄生部位の選定には、主成分分析で得られた成分行列と寄生率を用いて、評価することとした。成分行列と寄生率をかけて得られた数値が、1に近いものほど高濃度に寄生している部位であることが示唆されるため、数値が1に近い部位を高濃度寄生部位として選定した。

#### 第4章に関する実験

##### 1. ヒレ，外モモ，天丸からの検体採取

購入している馬肉 100 g から、任意の 5 か所から 1×1×0.5 cm の採取，300 mg 採取及び 10g 採取を行った。10 g 採取したものについては、TE Buffer で 10 倍希

积液を作製し，ホモジナイザーを用いてホモジナイズしたものから，1 mL 採取し，1000 ×g でフラッシングを行い，その上清を検体として用いた．

## 2. 各検査法の実施

簡易検査法及びリアルタイム PCR 法については，各章で実施した方法通りに行った．

## 謝辞

本研究を行うに際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 薬物動態学研究室 小田切 優樹 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました麻布大学生命・環境科学部 食品安全科学研究室 小西 良子 教授、岩手大学農学部 獣医公衆衛生学教室 鎌田 洋一 教授、国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 大西 貴弘 室長ならびに熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部 原田 誠也 研究参事に心から感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました崇城大学薬学部 薬学科 原武 衛 教授、同 大栗 誉敏 准教授に心から感謝いたします。

本研究に際し、遺伝子検査用試薬を提供いただきましたニッポンジーン株式会社于心よりお礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御協力いただきました崇城大学薬学部 薬物動態学研究室の諸氏に心から感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御協力と御理解をいただきました熊本県保健環境科学研究所ならびに熊本県健康福祉部健康局薬務衛生課の皆様深い感謝の意を表します。

最後に、私を支えてくれた家族に心より感謝いたします。

平成29年3月

古川 真斗

## 参考文献

1. Pena HF, Ogassawara S, Sinhorini IL, Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of Sao Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. *J. Parasitol.* 2001;87:1459–1465.
2. Olsen OW, Animal Parasites. Their Life Cycles and Ecology. 3rd ed., University Park Press, Baltimore, USA, 1974:173.
3. Hinaidy HK, Loupal G, *Sarcocystis bertrami* Doflein, 1901, a sarcosporidia of the horse. *Equus caballus. Zentralbl Veterinarmed B.* 1982;29(9):681-701
4. Edwards GT, Prevalence of equine *sarcocystis* in British horses and a comparison of two detection methods. *The Veterinary Record.* 1984;115(11):265-267.
5. Dubey JP, Steitel RH, Stromberg RC, Toussant MJ, *Sarcocystis fayeri* sp.n. from horse. *J Parasitol.* 1977;63:443-447.
6. Tinling SP, Cardinet GH 3rd, Blythe LL, Cohen M, Vonderfecht SL, A light and electron microscopic study of *sarcocysts* in horse. *J Parasitol.* 1980;66:458-465.
7. Gobel E, Rommel M, Light and electron microscopic study on cysts of *Sarcocystis equicanis* in the oesophageal musculature of horses. *Berl Munch Tierarztl Wschr.* 1980;93:41-47.
8. Rommel M, Geisel O, Studies on the incidence and life cycle of a sarcosporidian species of the horse (*Sarcocystis equicanis* n. spec). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1975;88(24):468-471.
9. Fayer R, *Sarcocystis spp.* in human infections. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:894-902.
10. Saito M, 住肉孢子虫および住肉孢子虫症. *J Jpn Vet Med Assoc.* 1989;42:383-388.

11. Saito M, Shibata Y, Taguchi K, Itagaki H, Slaughtered equine cases *sarcocystis* infection. *J Jpn Vet Med Assoc.* 1995;48:905-907.
12. Saito M, *Sarcocystis* and sarcocystosis in livestock. *Journal of Animal Protozoosis.* 1996;8: 8-18.
13. 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.* 1995;57:1049-1051.
14. Kamata Y, *Sarcocystis fayeri* を含んだ馬肉による食中毒. *Shokuhin Eisei Kenkyu.* 2011;61:21-27.
15. Harada S, Furukawa M, Tokuoka E, Matsumoto K, Yahiro S, Miyasaka J, Saito M, Kamata Y, Watanabe M, Irikura D, Matsumoto H, Sugita-Konishi Y, Control of *Sarcocystis fayeri* in horsemeat by freezing treatment and prevention of food poisoning caused by raw consumption of horsemeat. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2013;54:198-203.
16. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長, *Sarcocystis fayeri* の検査法について (暫定版). 平成 23 年 8 月 23 日, 食安監発 0823 第 1 号
17. Pritt B, Trainer T, Simmons-Amold 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 Prot.* 2008;71:2144-2147.
18. Kamata Y, Saito M, Irikura D, Yahata Y, Ohnishi T, Inui T, Watanabe M, Sugita-Konishi Y, A toxin isolated from *Sarcocystis fayeri* in raw horsemeat may be responsible for food poisoning. *J Food Prot.* 2014;77:814-819.
19. Hoffee P, Englesberg E, 55. Effect of metabolic activity on the glucose permease of bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48:1759-65.
20. Ratnam S, March SB, Ahmed R, Bezanson GS, Kasatiya S, Characterization of



- Escherichia coli serotype O157:H7. *J Clin Microbiol.* 1988;26(10):2006–2012.
21. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG, Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4744-4747.
  22. Mayr AM, Lick S, Bauer J, Tharigen D, Busch U, Huber I, Rapid Detection and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in Food, Using Multiplex Real-time PCR. *J Food Prot.* 2010;73:241-250.
  23. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 2000;28(12):E63.
  24. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T, Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem.* 2001;47(9):1742-1743.
  25. Compton J, Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature.* 1991;350:91-92.
  26. Vliet GM, Schukink RA, Gemen B, Schepers P, Klatser PR, Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. *J Gen Microbiol.* 1993;139(10):2423-2429.
  27. Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD, Gingeras TR, Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multi-enzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87: 1874-1878.
  28. Fahy E, Kwoh DY, Gingeras TR, Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Appl.* 1991;1(1):25-33.
  29. Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP, Strand

- displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acides Res.* 1992;20:1691-1696.
30. Walter NG, Strunk G, Strand displacement amplification as an in vitro model for rolling-circle replication: deletion formation and evolution during serial transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(17):7937-7941.
  31. Maruyama F, Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M, Detection of bacteria carrying the stx2 gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):5023-5028.
  32. Soliman H, Midtlyng PJ, El-Matbouli M, Sensitive and rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2009;158(1-2):77-83.
  33. Lu X, Mo ZY, Zhao HB, Yan H, Shi L, LAMP-based method for a rapid identification of Legionella spp. and Legionella pneumophila. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92(1):179-187.
  34. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-410.
  35. Sugita-Konishi Y, Fukuda Y, Mori K, Mekata T, Namba T, Kuroda M, Yamazaki A, Ohnishi T, New Validated rapid screening methods for identifying Kudoa septempunctata in olive flounder (Paralichthys olivaceus). *Jpn J Infect Dis.* 2015;68(2):145-147.
  36. 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品合同部会（平成23年4月25日開催）配付資料
  37. 厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課長, *Sarcocystis fayeri* の検査法について. 平成28年4月27日, 生食監発0427第4号
  38. Yao Z, Wang H, Wu L, Wu J, Brookes PC, Xu J, Interaction between the microbial

- community and invading *Escherichia coli* O157:H7 in soils from vegetable fields. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(1):70-76.
39. Naganandhini S, Kennedy ZJ, Uyttendaele M, Balachandar D, Persistence of Pathogenic and Non-Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Various Tropical Agricultural Soils of India. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130038.
  40. Mates EA, Tarter RR, Ha JC, Clark AB, McGowan KJ, Acoustic profiling in a complexly social species, the American crow: caws encode information on caller sex, identity, and behavioural context. *Bioacoustics.* 2015;24(1):63-80.
  41. Grunda JM, Steg AD, He Q, Steciuk MR, Byan-Parker S, Johnson MR, Grizzle WE, Differential expression of breast cancer-associated genes between stage- and age-matched tumor specimens from African- and Caucasian-American Women diagnosed with breast cancer. *BMC Res Notes.* 2012;5:248.
  42. Markus MB, *Sarcocystis* and sarcocystosis in domestic animals and man. *Adv Vet Sci Comp Med.* 1978;22:159–193.
  43. Teglas MB, Little SE, Latimer KS, Dubey JP, *Sarcocystis*-associated encephalitis and myocarditis in a wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *J Parasitol.* 1998;84(3):661-663.
  44. Saito M, Shibata Y, Ohno A, Kubo M, Shimura K, Itagaki H, *Sarcocystis* *suihominis* detected for the first time from pigs in Japan. *J Vet Med Sci.* 1998;60(3):307-309.
  45. 齊藤守弘, 柴田 穰, 東 久, 板垣 博, シストの牛筋肉における寄生分布. *日獣会誌*, 1998;51:453-455.
  46. Tomlinson JA, Dickinson MJ, Boonham N, Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Lett Appl Microbiol.* 2010;51(6):650-657
  47. Mahony J, Chong S, Bulir D, Ruyter A, Mwawasi K, Waltho D, Development of a

sensitive loop-mediated isothermal amplification assay that provides specimen-to-result diagnosis of respiratory syncytial virus infection in 30 minutes.

*J Clin Microbiol.* 2013;51(8):2696-2701.

48. Luan C, Levin RE, Use of activated carbon coated with bentonite for increasing the sensitivity of pcr detection of Escherichia coli O157:H7 in Canadian oyster (*Crassostrea gigas*) tissue. *J Microbiol Methods.* 2008;72(1):67-72.
49. Rajavel AR1, Kumar NP, Natarajan R, Vanamail P, Rathinakumar A, Jambulingam P, Morphological and molecular characterization of the ecological, biological and behavioural variants of the JE vector *Culex tritaeniorhynchus*: an assessment of its taxonomic status. *J Vector Borne Dis.* 2015;52(1):40-51.
50. Park SE, Kwon YS, Paik JK, Kwak TK, Hong WS, Perception and practice regarding allergen labeling: focus on food-related employees. *Nutr Res Pract.* 2016;10(4):424-32.