

Kudoa septempunctata 及び *Sarcocystis fayeri* 食中毒について

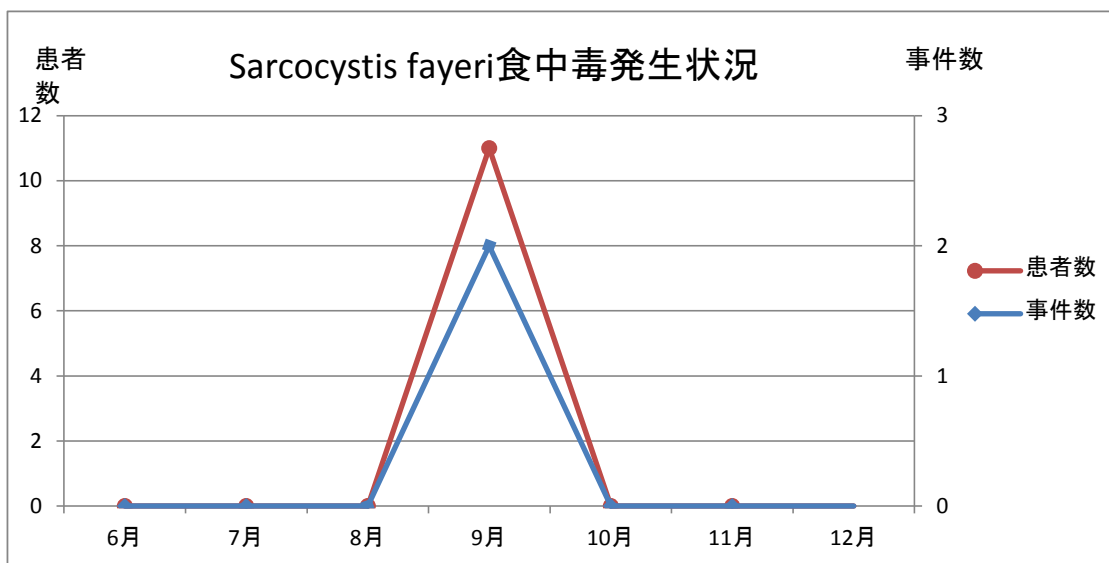
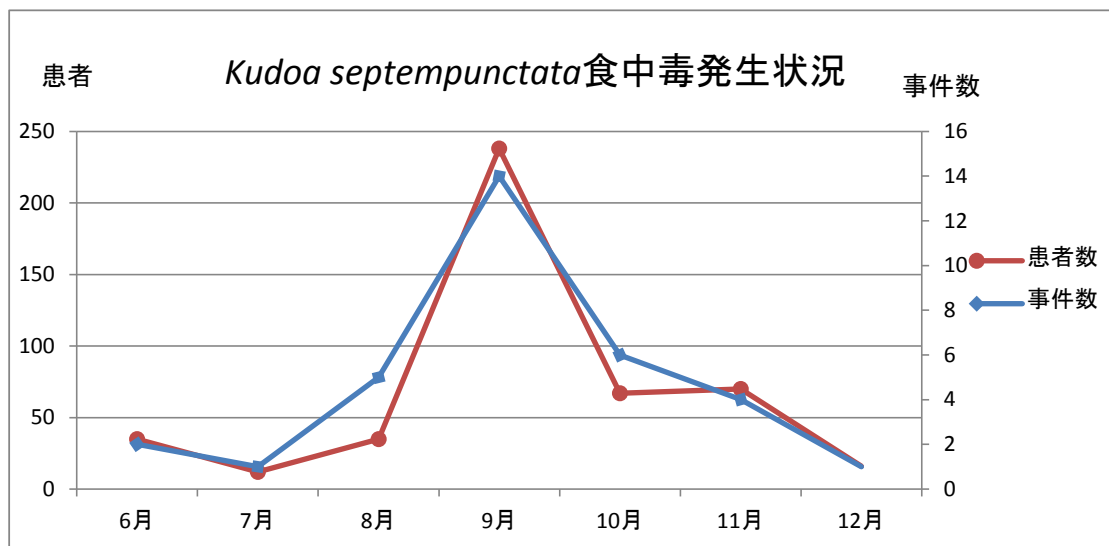
食品安全部監視安全課
食中毒被害情報管理室

Kudoa septempunctata 食中毒事例

	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
事件数	2	1	5	14	6	4	1
患者数	35	12	35	238	67	70	16

Sarcocystis fayeri 食中毒事例

	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
事件数	0	0	0	2	0	0	0
患者数	0	0	0	11	0	0	0



食安発0617第3号
平成23年6月17日

各
〔都道府県知事
保健所設置市長
特別区長〕殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長

生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について

本年4月、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において、標記有症事例に係る審議が行われ、生食用生鮮食品のヒラメ及び馬肉の摂取に関連した有症事例について、特定の寄生虫の関与が強く示唆され、食中毒発生リスクの低減を図るためにも必要な処理等を行うよう提言がなされたところである（別添）。

については、今後、当該寄生虫を起因とすると考えられる有症事例が報告された際には食中毒事例として取り扱うとともに、関係事業者等に対し食中毒の発生防止に努めるよう指導方、特段の対応をお願いします。

なお、原因物質の特定に係る調査、研究については、引き続き実施することとしていることを申し添える。

生食用生鮮食品による
病因物質不明有症事例についての提言

平成23年6月8日

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会

食中毒部会

乳肉水産食品部会

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を、平成23年4月25日に開催し、病因物質不明有症事例について、発生の状況及び試験研究機関で実施した研究について報告を受けた。

これらについて審議した結果、予防対策等についてとりまとめたので以下のとおり提言する。

1. 病因物質不明有症事例の発生状況について

近年、全国的に、食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢を呈し、軽症で終わる有症事例で、既知の病因物質が不検出、あるいは検出した病因物質と症状が合致せず、原因不明として処理された事例が報告されてきた。

平成21年6月から平成23年3月までに、厚生労働省が全国調査を実施したところ、同様の症状で報告された事例は198件であった。提供メニューのうち生食用鮮魚介類が含まれていた事例は178件(90%)あり、多い順にヒラメ135件(68%)、マグロ73件(37%)、エビ60件(30%)、タイ51件(25%)、カンパチ48件(24%)、イカ48件(24%)ほかと続いた。生食用鮮魚介類以外に、馬刺しが含まれていた事例は33件(17%)あった。

平成22年10月には、ヒラメを摂食した534名中113名が下痢、吐気、嘔吐等の症状を呈した病因物質不明の食中毒事件が報告された。

また、馬刺しの摂食が関連した病因物質不明有症事例の発症について疫学的に有意と考えられた事例は、同じく平成21年6月から平成23年3月までの間で4件あった。

このような状況から、報告数が最も多いヒラメと馬刺しについて原因の検討、予防策について国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所等で研究を実施した。

2. 病因物質不明有症事例の原因の検討及び予防対策について

(1) ヒラメを介した有症事例

①ヒラメ中の病因物質

有症事例について食中毒菌、マリントキシン、レクチン等、様々な既知の病因物質について検査を行ったが全て陰性であった。病原因子の網羅的ゲノム解析の結果、クドア属粘液胞子虫の *Kudoa septempunctata* が有意に多く存在することが判明し、高感度 RT-PCR 検査でもサンプルから DNA が検出された。

また、患者吐瀉物からも遺伝学的検査法でクドア属粘液胞子虫の DNA が検出され、そのうちのほとんどは塩基配列から、*K. septempunctata* であることが判明した。

②*K. septempunctata* の病原性

マウスに多量の *K. septempunctata* 胞子（以下クドア胞子と略す）を含むヒラメ筋肉濾過液を経口投与すると、沈鬱になり、血中の数種サイトカインが亢進した。

スunks（※1）（注積）に多量のクドア胞子を含むヒラメ切り身及び精製クドア胞子を経口投与した場合に、嘔吐が観察された。

乳のみマウスに、高濃度に精製したクドア胞子を経口投与した場合、水溶性下痢便、腸管液体貯留が認められた。

また、ヒト腸管細胞培養系を用いたクドア孢子の腸管毒性評価でも腸管細胞層の物質透過性の亢進を示すデータが得られた。

これらのことから総合的に考えると、ヒトにおいてクドア感染は下痢症状を引き起こす要因になっている可能性が強く示唆された。

なお、症状が一過性かつ予後良好であることから、クドア孢子が長期に人体で留まる可能性は低いと考えられる。

③ *K. septempunctata* の失活

冷蔵状態では少なくとも1週間程度、クドア孢子の病原性が保持されていたが、 -15°C ～ -20°C で4時間以上保管することで失活した。

また、条件によっては冷蔵条件下で、クドア孢子は失活する可能性も示唆された。

加熱処理では、中心温度 75°C 5分以上の加熱でクドア孢子は失活した。

(2) 馬刺しを介した有症事例

① 馬刺し中の病因物質

有症事例の検体について既知の食中毒菌、ウイルスにつ

いて検査を行ったが全て陰性であった。しかしながら、有症事例に関連した馬刺し残品の筋肉部位を鏡検したところ、多くに共通して住肉胞子虫の1種である *Sarcocystis fayeri* の感染が認められた。

② *S. fayeri* の病原性

S. fayeri のシスト（※2）（注釈）を含有する馬肉すり身を用いてウサギ腸管ループ試験を実施したところ、腫脹、液体貯留が確認され腸管病原性が示唆された。また動物実験では用量依存性が認められている。

これらのことから、*S. fayeri* がヒトにおいても下痢症状等を引き起こす可能性が示唆された。

なお、*S. fayeri* は犬を終宿主とし馬を中間宿主とする生活環を有し、ヒトには寄生しないことがわかっている。

③ *S. fayeri* の失活

馬肉を-20℃（中心温度）で48時間以上、-30℃（中心温度）で36時間以上、-40℃（中心温度）で18時間以上及び急速冷凍装置を用いた場合は-30℃（中心温度）で18時間以上を保持する冷凍方法、並びに、液体窒素に浸す場合にあっては、1時間以上保持する方法で失活した。

以上の結果からは、ヒラメ中の *K. septempunctata* 及び馬肉中の *S. fayeri* が原因不明の食中毒の病因物質として、関与が強く示唆された。

これらのことから、現在の時点で判明している知見をもとに可能な食中毒予防策をとるべきである。

3. 当面の対策と今後の課題

これらの病原体のヒトの健康へのリスクとして、症状が一過性で自然寛解すること、これまでのところ重症化した症例は報告されていないこと、持続的に体内に留まる可能性は小さいこと、そしてこれらの食材からの発症のリスクとしては、供給量と発生件数（※3）（参考）を比較すると頻繁に発生するものとは考えられないことが これまでの知見として得られた。

しかしながら、ヒラメ中の *K. septempunctata* 及び馬肉中の *S. fayeri* が有症事例の原因物質として関与が強く示唆されること、まだ事例数としてはとらえられていない事例がある可能性があり、かつ発症のメカニズム等にも不明な点も残されていることから、当面とることのできる対策と今後の課題について整理をし

た。

さらに、正確な事実を伝えることによって、消費者には過度に神経質になることのないよう、また、関係業者には現実的な対応をとるよう問題点を理解してもらうことが重要である。

(1) ヒラメの摂食による有症苦情の対応策

①現状の対応策

2. (1) ③の「*K. septempunctata* の失活」で示された条件により失活が確認されていることから、このような条件を踏まえたリスクの低減を図るべきである。ただし冷蔵については、現時点では限定的効果しかみられていない。

②今後の課題

冷蔵条件下における対策は、効果が限定的であるので、さらなる追試が必要である。効果的な冷蔵方法が確認できれば速やかに自治体等に情報提供すべきである。

なお、ヒラメに関して、発症件数と流通量、季節性に関連性がありそうなデータが存在している。

その他、養殖段階においての *K. septempunctata* 保有稚魚の排除、飼育環境の洗浄化、養殖場における出荷前のモニタリング検査を組み合わせた対応も検討していく必要

がある。

なお、動物実験では用量依存性が示唆されていることから、最小発症量を定め、流通・販売する際の判定基準を定めることも課題である。

(2) 馬肉を介した有症苦情の対応策

①現状の対応策

2. (2) ③の「*S. fayeri* の失活」で示された冷凍条件により失活が確認されていることから、このような条件を踏まえたリスクの低減を図るべきである。

②今後の課題

S. fayeri の生活環が判明していることから、生産段階における馬の感染を防御する方法について検討する必要がある。これが可能になれば、冷凍処理の必要もなくなると考えられる。

なお、動物実験では用量依存性が示唆されていることから、最少発症量を定めることも課題である。

(3) 共通する課題

都道府県等は、引き続き、病因物質不明有症事例について調査情報等を国に報告するとともに、国は、都道府県等と連

携して、事例の収集に努め、疫学的な全体像を明らかにすることが重要である。

また、国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所は一過性の下痢、嘔吐を引き起こす病因学的メカニズムを解明していくことも重要である。

厚生労働省、関係省庁、地方自治体、関係団体においては、現在科学的に判明していることを、消費者、関係業者が、正しく理解するよう普及・啓発を適切に行うことが大切である。

- (※1) 食虫目、体重 100 g 前後のネズミに似た実験小動物で、毒素等被検物質によって嘔吐症状を示すことが知られている。
- (※2) 馬の筋肉中に存在する袋状の構造物で嚢胞ともいう。*S. fayeri* の場合、犬に感染する虫体を多数内部に含む。
- (※3) ヒラメの1年間の流通量について築地市場及び大阪市場の取扱量を基に試算すると 2,400 トン、馬刺しの国内での1年間の取扱量と畜頭数を基に試算すると 7,000 トンとなり、取扱量に比較し 1. で示した有症苦情発生件数が少ないと言える。

平成23年7月11日
食安監発0711第1号

各
〔 都道府県知事
保健所設置市長
特別区長 〕 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長

*Kudoa septempunctata*の検査法について（暫定版）

平成23年6月17日付け食安発0617第3号「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について」（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）において、*Kudoa septempunctata*及び*Sarcocystis fayeri*を起因とすると考えられる有症事例が報告された際には食中毒事例として取り扱うとともに、関係事業者等に対し食中毒の発生防止に努めるよう指導方、特段の対応をお願いしたところです。

今般、*Kudoa septempunctata*の検査法について別添のとおり定めましたので、*Kudoa septempunctata*による食中毒が疑われる際には、暫定的に別添の検査法により実施されるようお願いいたします。

なお、*Sarcocystis fayeri*の検査法については、現在、検査法の確認中であり、確認でき次第、通知することとしていますので、検体等につきましては国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部第四室に冷凍にて送付するようお願いいたします。

ヒラメからの *Kudoa septempunctata* 検査法(暫定)

1. 検体採取方法

食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢を呈し、軽症で終わる有症事例で、既知の病因物質が不検出、あるいは検出した病因物質と症状が合致せず、原因不明として処理された事例のヒラメを対象とする。

2. 検査方法

AまたはBのどちらかの方法を用いる^(注)。

A リアルタイム PCR 検査法でスクリーニングを行い、その結果ある一定の値を示した検体に対して顕微鏡検査を行い、6～7極嚢を有する *Kudoa septempunctata* の孢子数を計測する。

B リアルタイム PCR 検査法でスクリーニングを行わず、顕微鏡検査を行い、6～7極嚢を有する *Kudoa septempunctata* の孢子数を計測する。陽性になった場合には、必要に応じて確認検査として、リアルタイム PCR 検査法(2.1.1)またはそれに同等以上の遺伝子検査法を行い、*Kudoa septempunctata* であることを定性的に確認することが望ましい。

注：別添試験法については、A リアルタイム PCR を用いた遺伝子検査法をスクリーニングに使用する方法及び B 顕微鏡検査を行い遺伝子検査法を実施する方法を併記している。遺伝子検査法は、機器等の整備は必要であるが、多検体を同時に検査できるという利点があり、顕微鏡試験法は、1検体当たりコストが低く、技術的に簡易であるという利点がある。

2.1. 遺伝子検査法

ヒラメからの *Kudoa septempunctata* の検出を、遺伝子検査法を用いて実施する。遺伝子検査法としてリアルタイム PCR 法(2.1.1)または、同等以上の結果が得られる方法を用いる。

2.1.1. リアルタイム PCR 法

2.1.1.1. 実験操作

- 1) ヒラメ試料からの DNA 抽出
- (1) 器具および試薬

1.5 mlのエッペンドルフチューブを使用できる遠心分離装置, 56°Cと70°Cで使用できるヒートブロックもしくはウォーターバス 2 台, マイクロピペット(20, 200, 1000 μ l), ボルテックスミキサー, ハサミ, エッペンドルフチューブ, 分子生物学用エタノール(96-100 %, QIAamp DNA Mini Kit)

(2) ヒラメ切り身からの DNA 抽出

ヒラメ切り身から約50mgを2ヶ所より採取する。キアゲン社の QIAamp DNA Mini Kit の「組織からのプロトコール」に準じて以下の方法で DNA を抽出する。

- ① ヒートブロックまたはウォーターバスを 56°Cと70°Cにセットする。
- ② エッペンドルフチューブに, ヒラメ試料 35~50 mg を秤量し, それを 25 で割った値を F(秤量した値 \div 25=F)とする。
- ③ Buffer ATL (180 \times F) μ l を加える。
- ④ Proteinase K (20 \times F) μ l を加え, ボルテックスする(ATLとProteinase Kを9:1で, 混ぜておき, (200 \times F) μ l 加えても良い)。
- ⑤ 時々ボルテックスミキサーで攪拌しながら 56°Cで溶解させる(通常 1 時間程度で溶解する)。
- ⑥ 溶解サンプル 225 μ l を新しいエッペンドルフチューブに移す。
- ⑦ Buffer AL 200 μ l を加え, 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する。
- ⑧ 70°Cで 10 分間インキュベートする。
- ⑨ 200 μ l の 99.5%エタノールを加え, 15 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する。
- ⑩ 2ml コレクションチューブのセットされた QIAamp Spin Column の中に⑨の溶液全量を入れる。8,000 rpm で 1 分間遠心する。QIAamp Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブにセットする。
- ⑪ 500 μ l の Buffer AW1 を加える。8,000 rpm で 1 分間遠心する。QIAamp Spin Column を新しい 2ml コレクションチューブにセットする。
- ⑫ 500 μ l の Buffer AW2 を加える。14,000 rpm で 3 分間冷却遠心する。
- ⑬ QIAamp Spin Column を 1.5ml エッペンドルフチューブ(No を記入)にセットする。200 μ l の Buffer AE を加える。1 分間室温でインキュベートとしてから, 8,000 rpm で 1 分間冷却遠心する。
- ⑭ その溶出液を PCR サンプルとして使用する。

2) リアルタイム PCR による検出

(1) 器具および試薬

リアルタイム PCR 装置(ABI 社製または同等品), PCR 反応チューブ, TaqMan Universal Master Mix(ABI 社), プライマー・プローブミックス溶液, TE バッファー

(2) プライマー・プローブミックス溶液

使用するプライマーとプローブの配列は以下のとおりである。

Kudoa-F (sense): CATGGGATTAGCCCGGTTTA

Kudoa-R (antisense): ACTCTCCCCAAAGCCGAAA

Kudoa-P (probe): FAM-TCCAGGTTGGGCCCTCAGTGAAAA-TAMRA

10×Primer/Probe Mix はプライマーそれぞれが 4 μM, プローブが 2.5 μM になるように調整する(反応液中での最終濃度はそれぞれ 0.4 μM, 0.25 μM)。

(3) 陽性コントロールの調整

1×10⁹ コピー/1μl の *Kudoa septempunctata* 18S rDNA を組み込んだ陽性コントロールプラスミド溶液を配布するので, TE バッファーで段階希釈し, 2.5×10⁷/μl, 2.5×10⁵/μl, 2.5×10³/μl, 2.5×10¹/μl のプラスミド溶液を作成する(1 反応系につき 4 μl 使用するので, 反応系での最終コピー数はそれぞれ 1×10⁸, 1×10⁶, 1×10⁴, 1×10²になる)。

3) PCR 反応

表 1 に基づいて反応調整液を作成する。表 1 の 1, 2, 4 を混合し, 各ウエルに分注する。そこへ検体からの DNA 溶液, 検量線作成のための「(2)陽性コントロールの調整の項」で作成した陽性コントロール, 陰性コントロールとして精製水のいずれかを 4μl 加える。ボルテックスミキサー等で混合した後, 軽く遠心し, リアルタイム PCR にかける。蛍光は FAM, クエンチャーは TAMRA を指定する。

表 1. リアルタイム PCR 反応調整液

	試薬	
1	TaqMan 2×Universal Master Mix	10 μl
2	プライマー・プローブミックス	2 μl
3	検体からの DNA 溶液 or 陽性コントロール溶液 or 精製水	4 μl
4	精製水	4 μl

以下の条件で反応を行う

95°C 10 分 1 サイクル

95°C 15 秒

60°C 60 秒 45 サイクル

4) 定量

陽性コントロールのコピー数(対数値)を縦軸に, PCR 反応から得られた Ct 値を横軸にプロットし, 検量線を作成する。この際, 陽性コントロールの各濃度につき最低 n=3 で測定を行う。そこから, PCR に用いた DNA 溶液 4 μl 中のコピー数を求める。最終的にヒラメ 1g

あたりの *kudoa* rDNA のコピー数を以下の式を用いて算出する。検量線の傾きが -0.301 (± 0.020) 以下であることを確認する。

$$\begin{aligned} \text{試料 1g 中の } kudoa \text{ rDNA のコピー数} &= \text{検量線から得られた DNA 溶液 } 4 \mu\text{l のコピー数} \times \\ & 50 (200 \mu\text{l の DNA 溶液の内 } 4 \mu\text{l を使用したため) \times 1000 \text{ mg} \div \\ & \text{DNA 抽出に用いた試料の重量 } 25 (\text{mg}) \\ & = 4 \mu\text{l 中のコピー数} \times 2000 / 1 \text{ グラム試料} \end{aligned}$$

(例) 検量線から得られた DNA 溶液 $4 \mu\text{l}$ のコピー数が 200 の場合

$$\text{それに } 200 \times 2000 = 4.0 \times 10^5 \text{ } kudoa \text{ rDNA のコピー数/1 グラム試料}$$

2. 1. 1.2. 結果の判定

暫定的に 10^7 *kudoa* rDNA のコピー数/1 グラム試料 以上検出された場合、遺伝子検査のスクリーニング陽性とする。

2. 2. 顕微鏡による検査

2. 2. 1. 実験操作

検体を 0.5g 秤量し、シャーレ等に入れ $200\mu\text{m}$ 程度のメッシュを検体の上に置き、PBS 約 3mL を加え、ピンセットや注射筒の底で軽くつぶす。メッシュを通した PBS 溶液をさらに $100\mu\text{m}$ 程度のメッシュに通し、そのろ液を遠心管等に回収する。遠心管等を 1500rpm , 10 分, 10°C の条件で遠心したのち、上清を出来る限り完全に捨て PBS 0.5mL を正確に加え、懸濁する。そこから $10\mu\text{L}$ をパラフィルム等にとり、同量のトリパンプルー溶液を加え混合し、Burker-Turk 型等の白血球用血球計算盤で、 $6\sim 7$ 極嚢を有する *kudoa* 胞子を計測する。

1 区画 $5\sim 200$ 個になるように、適時 PBS で希釈する。

2. 2. 2. 結果の判定

血球計算盤の $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0.1\text{mm}$ の区画を4箇所計測し、平均値 (n) を算定する(定量限界は1区画 $n=5$)。

$$(n \times 10^4) \times 2 \times \text{希釈倍数} = \text{グラム当たりの } Kudoa \text{ septempunctata}$$

定量限界 10 万胞子

3. 総合判定

A 遺伝子検査法かつ顕微鏡検査の結果が陽性の場合に、陽性と判定し、食中毒の原因と判断する。遺伝子検査法で陰性の場合には、顕微鏡検査を行わず陰性と判定する。遺伝子検査法が陽性であって顕微鏡検査で陰性の場

合は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に郵送する。遺伝子検査法が陽性であって顕微鏡検査で定量限界以下の場合は、「*Kudoa septempunctata* は認められたが、定量限界以下」であることを明記する。

- B 顕微鏡検査のみで陰性と判定することはできる。顕微鏡検査で陽性と判定された場合には、必要に応じて遺伝子検査により、*Kudoa septempunctata* の定性確認を行うことが望ましい。

注釈

(ア)本試験で示したリアルタイム PCR 法は *Kudoa septempunctata* に高い特異性を示すが、他のクドア属への交差反応は否定できない。正確に *Kudoa septempunctata* の同定を行いたい場合は直接 18srDNA のシーケンスにより確認することが望まれる。

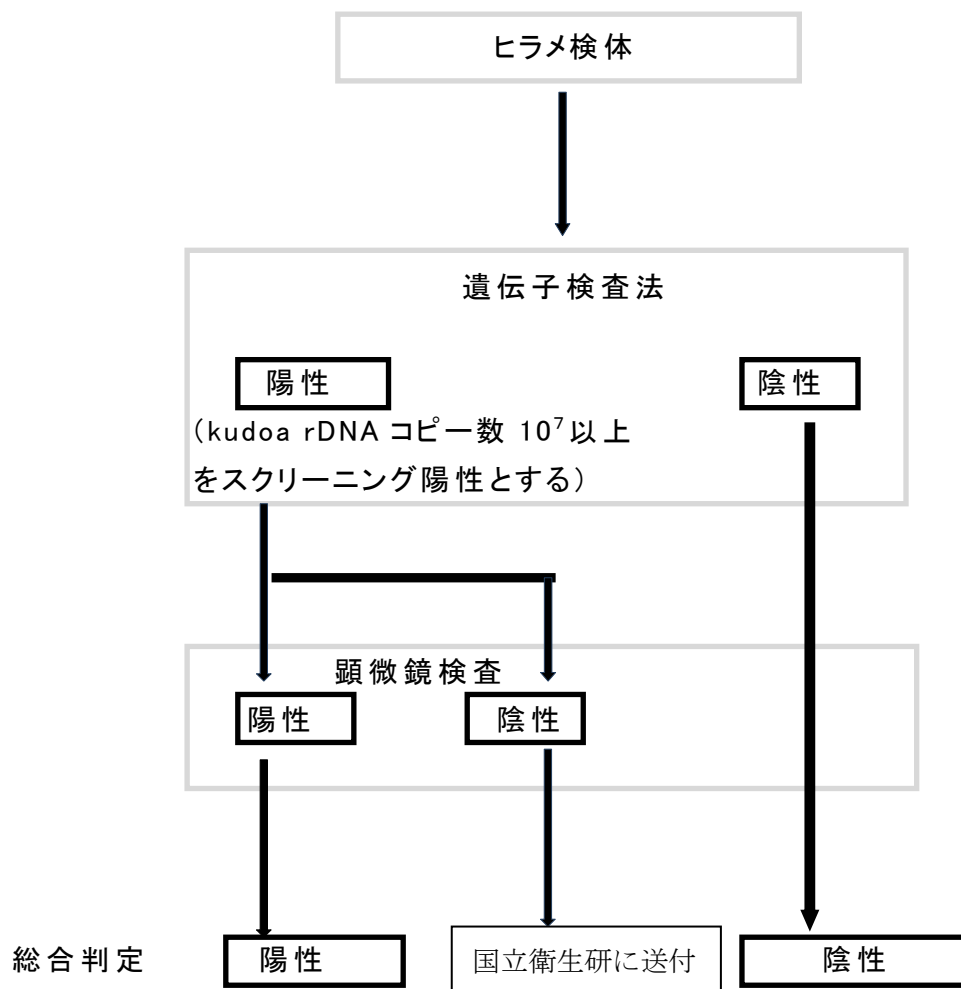
(イ)1*Kudoa* 孢子中の rDNA のコピー数は、現段階では不明なため、スクリーニング法の判定には rDNA コピー数を用いる。複数機関による妥当性試験の結果から、カットオフ値を暫定的に 10^7 とした。

<参考> *Kudoa* 孢子の顕微鏡検査法

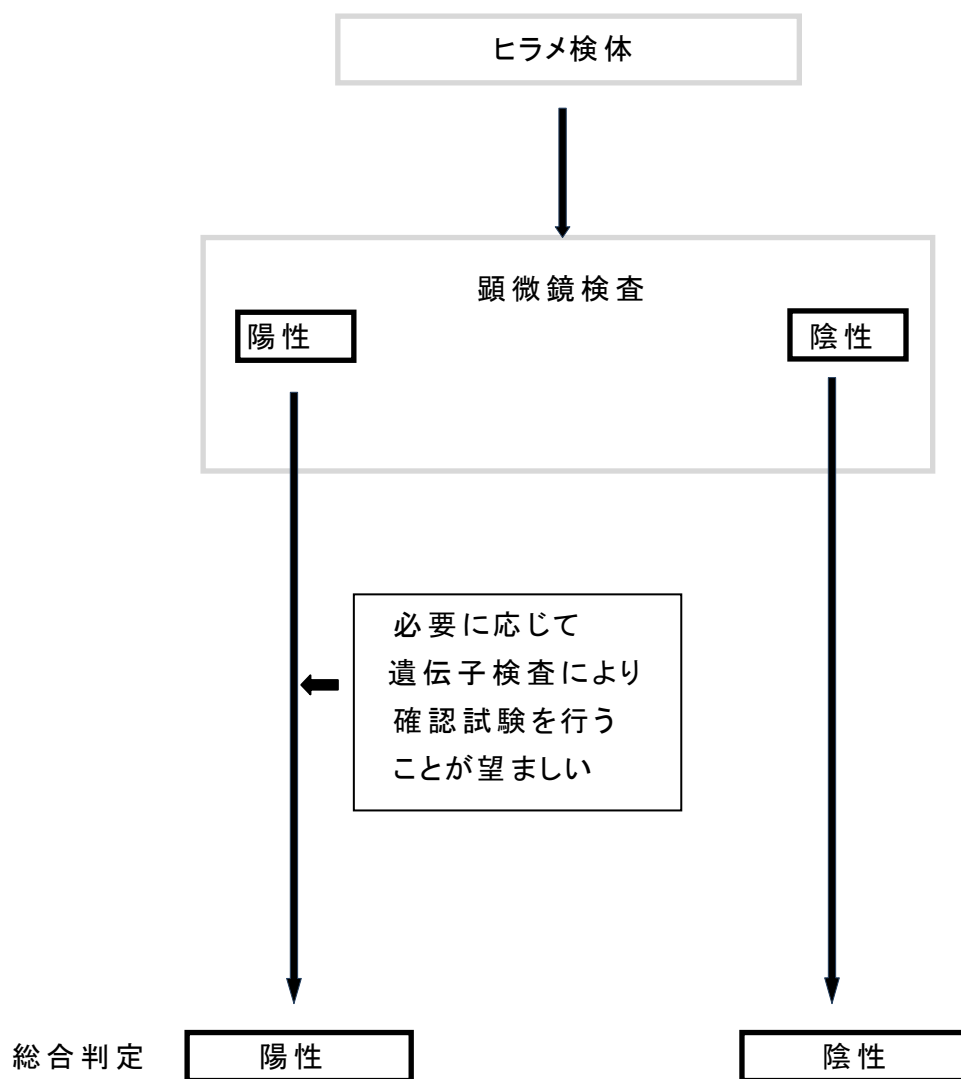
URL : http://www.nihs.go.jp/kanren/kudoa_houshi_20110711-01.pdf

検査法フローチャート

A.スクリーニング法として、リアルタイム PCR を行う場合



B.顕微鏡検査から行う場合



食安監発0823第1号
平成23年8月23日

各

都道府県知事
保健所設置市長
特別区長

 殿

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6月17日付け食安発0617第3号「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について」（厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）において、*Kudoa septempunctata*及び*Sarcocystis fayeri*を起因とすると考えられる有症事例が報告された際には食中毒事例として取り扱うとともに、関係事業者等に対し食中毒の発生防止に努めるよう指導方、特段の対応をお願いしたところです。

今般、*Sarcocystis fayeri*の検査法について別添のとおり暫定的に定めましたので、*Sarcocystis fayeri*による食中毒が疑われる際には、別添の検査法により実施されるようお願いいたします。

(別添)

生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法 (暫定法)

1 検体採取方法

食後数時間程度で一過性の嘔吐や下痢を呈し、軽症で終わる有症事例で、既知の病因物質が不検出、あるいは検出した病因物質と症状が合致せず、原因不明として処理された事例の生食用馬肉を対象とする。生食用馬肉として調理された肉片および調理用に保存された肉ブロックも含む。これらが冷凍で保存されている場合は室温にて解凍して使用する。冷凍検体の場合は肉表面が変色、乾燥している場合があり、可能であればそれらの部分は削除して検査する。

2 検査方法

定性 PCR 検査法でスクリーニングを行い、陽性検体を対象に顕微鏡検査法により、*Sarcocystis fayeri* の三日月状、あるいは紡錘状のブラディゾイトを確認する。

3 定性 PCR 試験法

1) 生食用馬肉試料からの DNA の調整

本検査法では肉中に存在するザルコシステス虫体 (ザルコシストの状態) を筋肉組織とともに溶液中に分離遊出させ、遠心で筋肉組織を沈殿させることで上清中に虫体を回収する。回収した上清は市販 DNA 精製キットにより処理するので多数検体より簡便、迅速に DNA 調整することが可能である。

2) 器具および試薬

鋭利な刃物* 1、トレイ、パラフィルム (5 cm×5 cm)、ペーパータオル、1.5 ml のエッペンドルフチューブ、2.0 mL の遠心管、2.0 mL の遠心管が使用できる遠心分離装置、1.5 ml のエッペンドルフチューブを使用できる遠心分離装置、マイクロピペット (20, 200, 1000 µl)、ボルテックスミキサー、ハサミ、エッペンドルフチューブ、分子生物学用エタノール (96-100%)、10%中性ホルマリン溶液、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 51304、51306)、TE 緩衝液、定性 PCR 装置、PCR 反応チューブ、プライマー・セット、市販 PCR 用試薬、フィルター付きピペットチップ、TE バッファー、滅菌蒸留水、電気泳動装置、2.0%アガロースゲル、泳動用サンプルバッファー、DNA サイズマーカー (100bp のラダー製品)、エチジウムブロマイド UV イルミネーター

4 生食用馬肉からの DNA 抽出用の肉片切出しとその前処理

- (1) 検体から肉片を切出す。馬刺しとして調理された肉片（薄切り肉）および保存された肉ブロックから3ヶ所より肉片を切出す。部位によっては脂身が多く、検査にはなるべく脂肪分の少ない部分を選ぶ。
- (2) 筋線維の方向を確認し、鋭利な刃物 * 1 を用いて筋線維と垂直に厚さ 5 mm 程度、面積 1 cm × 1 cm 程度の小片を切出す * 2。
- (3) トレイにパラフィルム（5 cm × 5 cm）をのせたペーパータオルを準備し、パラフィルム上に切出した肉片を置く。切出しに使った刃物を用いて肉片を細かくたたき切りながら均一に混ぜていく。馬肉は柔らかく、数分間の処理でミンチ状になる * 3。
- (4) 秤量計に 2.0 ml 遠心管をのせゼロ補正し、ピンセットで 0.3 g 分のミンチ状の試料を試験管に入れる。
- (5) TE バッファーを加え 1 ml にメスアップする。30 秒間激しく試験管を振りミンチ肉を攪拌し、肉眼で肉が均一に分散していることを確認する * 4。
- (6) 卓上の遠心機で数秒間遠心し * 5、ピペットを用いて上清 200 μ l を新しい 1.5 ml 遠心管に移す * 6。この上清を TE 上清液とする。

5 DNA の抽出精製

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 51304、51306) あるいは同等の性能をもつ製品を用いて、手順書に従い 4 (6) で回収した 200 μ l の TE 上清液より DNA を抽出精製し、最終的に 100 μ L の溶出用バッファー (kit 付属) で DNA を溶出する。溶出した DNA 溶液は -20°C で保存する。

6 定性 PCR よる検出

PCR は極めて高感度な検査法であることから、実験操作中の汚染、特に増幅目的の DNA による汚染には十分な注意が必要である。DNA を扱う作業 (DNA 抽出操作、電気泳動など) の実験台と PCR 反応液を調整する実験台は場所を離すなど工夫する。またフィルター付きピペットチップの使用、手袋の頻繁な交換、試薬類の分注保存などで汚染の可能性を最小限に止める。

1) PCR 反応液の調整

市販 PCR 用試薬がキット化されており、これらを使用する。キットの指示に従い反応液を調整する。PCR プライマーは 0.2 μ M で使用する。全量で 25 μ l の反応液とする場合、テンプレート DNA の割合は 1 μ l / 25 μ l とする。PCR の陰性対照として DNA 試料の代わりに滅菌蒸留水を加えたもの、陽性対照として陽性 DNA を加えたものを同時に調製する。

2) プライマー・セット

使用するプライマーとプローブの配列は以下のとおりである。(Pritt B.ら、J. Food Protect., 71:2144-2147, 2008 より)

F-primer (18S1F) : 5' -GGATAACCGTGGTAATTCTATG

R-primer (18S11R) : 5' -TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG

3) PCR 反応

反応チューブをPCR装置にセットする。各種DNAポリメラーゼに応じた初期変性温度と時間で加温した後、94℃、30秒間、60℃、1分間、72℃、1分間を1サイクルとし、40サイクルのPCR増幅を行う。続いて72℃、5分間の保温後は4℃で保温し、反応終了後は早めに-20℃に反応液を移す。

4) PCR産物の確認

TBEあるいはTAEバッファーを用いて2.0%アガロースゲルを作製する。泳動槽にゲルとゲル作製に用いたバッファーを入れ、泳動用サンプルバッファー(6倍濃縮用)1μlとPCR産物5μlを混合し電気泳動にかける。DNAサイズマーカーも同時に泳動する。マーカーは100bpのラダー製品が産物サイズの確認に使いやすい。全泳動距離の3/4程度のところで泳動を止める。泳動後、エチジウムブロマイド染色を行いUVイルミネーターで可視化し泳動像を記録する。

5) 結果の判定

陽性対照で約1,100bpのDNAが増幅され、陰性対照でのDNA増幅が認められない時に同一検体からの複数DNA試料中に1試料で陽性対照と同サイズ及び同強度のDNAが増幅された場合、定性PCR陽性と判断する。

7 顕微鏡による検査

1) 器具および試薬

光学顕微鏡(×400)、スライドグラス、カバーグラス、ピペットマン(100, 20 μl)、0.1%Tween20生食リン酸緩衝液(PBS)

2) 実験操作

- (1) 秤量した馬肉(2g以上が望ましい)と等量のPBSを加え、30秒のストマッキングを行う。1~2分、激しく手で揉んでも良い。上清をスライドグラスに一滴落とし、カバーグラスをかけ、光学顕微鏡での観察を行う。虫体が多い場合、この時点でブラディゾイトが確認できる。
- (2) ストマッカー袋内の上清を全量回収し、遠心分離する(3,000 rpm10分)。沈殿を少量のPBSで懸濁する。スライドグラスに懸濁液をセットし、400倍の光学顕微鏡下で

三日月状、あるいは紡錘状のブラディゾイトを確認する。

8 総合判定

- 1) 遺伝子検査法かつ顕微鏡検査の結果が陽性的場合に、陽性と判定し、食中毒の原因と判断する。
- 2) 遺伝子検査法で陰性的場合は、顕微鏡検査を行わず陰性と判定する。
- 3) 遺伝子検査法が陽性であって顕微鏡検査で陰性的場合は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に郵送する。

(注釈)

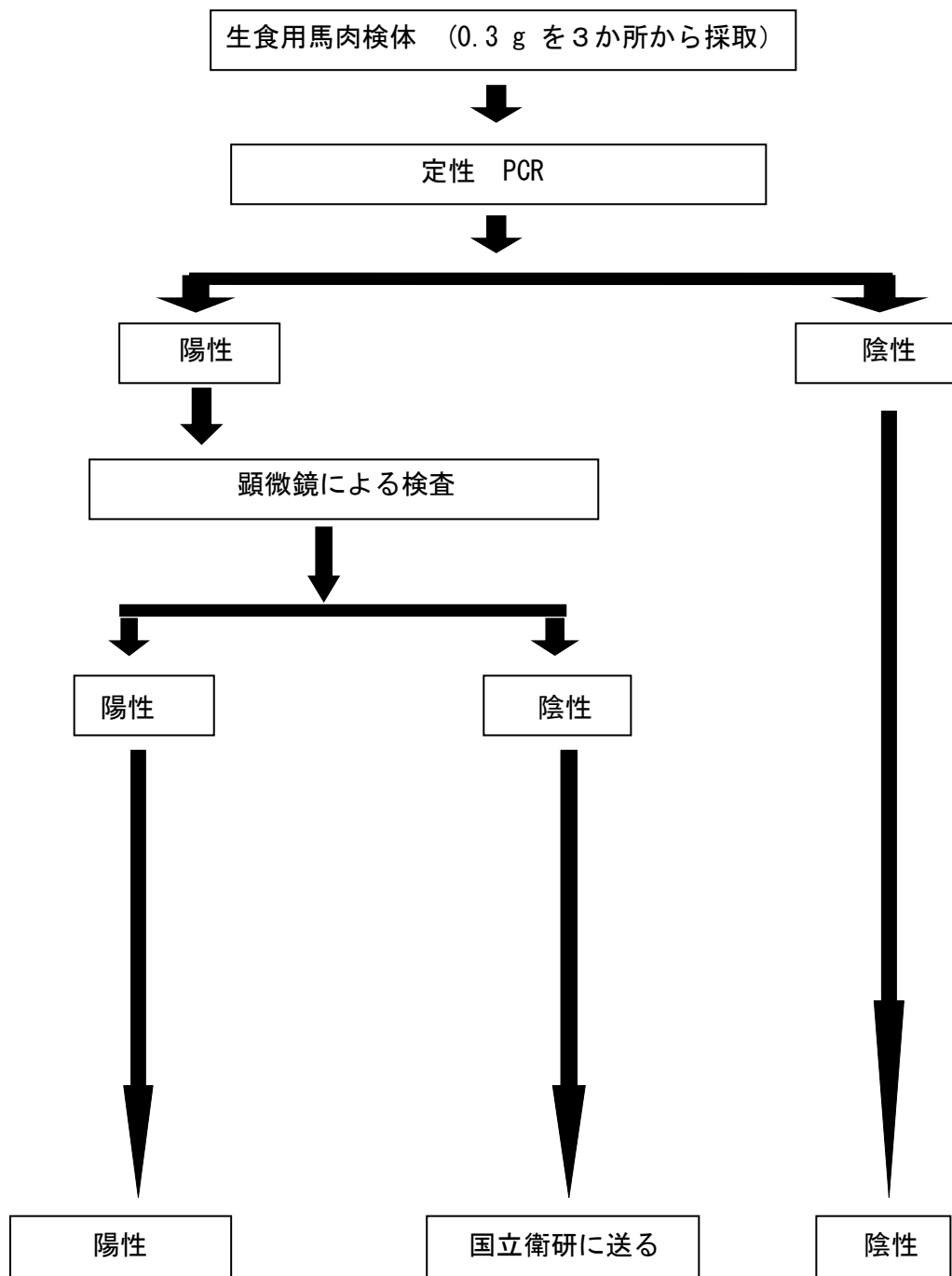
- * 1 片刃カミソリ替刃やメス替刃等、取り扱いには十分注意する。なお使用する器材はなるべく使い捨ての製品を使用し、相互汚染の危険性を下げる。カミソリ刃などは火炎で焼けば再使用（5回程度）できる。
- * 2 1検体で検査に使用できる部分が少ない場合（一切れしかなく、少量でとても薄い、また脂分が多いなどの場合）は、一切れの肉につき使える部分を複数箇所から切出し、1検体分としてまとめる。
- * 3 発泡スチロールのアイスボックスにトレイを準備し、切出した肉片やミンチ状の肉はパラフィルムごとその上に置き、次の処理まで冷やしておく。
- * 4 肉の切断が不十分だと試験管を振っても肉が固まったままで肉が分散しない。
- * 5 遠心機は2,000～5,000×gの能力がある小型遠心機でよい。遠心後に脂肪分が液面近くに凝固する場合は、ピペット先端を脂肪層の下に入れ上清を回収する。
- * 6 多数検体の前処理ではDNA抽出まで試験管内の試料は氷中で保存する。

ザルコシスティス シストおよびブラディゾイドの検査法

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 HP

URL : <http://www.nihs.go.jp/dmb/1stSarcocystis.pdf>

フローチャート



<参考1> 実体顕微鏡による検査法

かなりの熟練を要するがシストを実体顕微鏡を用いて切り出し、顕微鏡検査する方法もある。(当該法で陽性の場合、顕微鏡検査のみで陽性と判定できる。)

1) 器具および試薬

実体顕微鏡(オリンパス SZX16 等)、顕微鏡用光源(オリンパス LG-PS2 等)、光学顕微鏡($\times 400$)、ハサミ、スライドガラス、カバーガラス、ピペットマン(100, 20 μ l)、眼科用ピンセット、先端の鋭利なピンセット、10 ml シリンジ、24G 注射針、生食リン酸緩衝液(PBS)

2) 実験操作

(1) 検体の調整

馬肉がブロック状であれば、筋肉の走行に直角にスライスする。スライスの厚さは1 cm 程度とする。既にスライスされている検体については、筋束の走行に注意しながら、出来るだけ筋束の走行が垂直になるように、実体顕微鏡の鏡台にスライスを置く。

(2) 顕微鏡観察、シストの特徴

スライスに上方から斜めに光を当てる。指やピンセットの影がスライスの上に出ないように光源の角度を調整する。10 倍程度の拡大でシストは確認できる。

手袋をした指先、眼科用ピンセット、あるいは10 ml シリンジに装着させた24G 注射針を用いて、筋束を分離しながら、筋側の走行と平行に走る住肉胞子虫シストを探索する。シストは線虫様で、透明感や光沢のない濃い白色を示す。長いシストは1 cm に達する。シストの幅は0.5~1 mm 程度である。脂肪との類別に注意する。脂肪はギラギラした光沢がある。筋束を分離してゆくと、筋(スジ)状の構造物ができることがあるが、シストは必ず筋束の内側、筋膜直下に分布しているので、筋状の構造物とシストを混合しないよう注意する。

(3) シストの分離

新品の24G 注射針をメスのように用い、シストの左右にシストの走行に平行に筋膜に切れ目を入れる。先端が極細のピンセット、あるいは先端を針穴と逆方向に反らせた(釣り針のようにする)24G 注射針(10 ml シリンジに装着させてある)を用いて、シストを引っ掛け、あるいは柔らかく保持し、ゆっくりとシストを引き抜く。

(4) シストおよびシストから遊出するブラディゾイトの確認

スライドガラスにPBS を一滴落とし、シストの摘出に用いたピンセットや注射針の先端をPBS 滴中にこすりつけ、シストを滴中に移す。白い物体がPBS 中にあることを確認する。シストをピンセット、あるいは注射針でつつき、またはPBS 中で上下左右に揺する。適当な大きさのカバーガラスを掛け、実体顕微鏡下でシストを確認した後、光学顕微鏡を用いてシストから遊出しているブラディゾイトを観察する。400 倍の倍率が必要である。三日月状、あるいは紡錘状のブラディゾイトを確認する。

3) 判定

- (1) 実体顕微鏡検査で陽性の場合、顕微鏡検査のみで陽性と判定できる。
- (2) 本顕微鏡検査で陰性と判定された場合には、遺伝子検査及び顕微鏡検査を実施し、判定を行うこと。

<参考2> 4 (6) で調製した TE 上清を使用する顕微鏡検査法

定性 PCR 検体の TE 上清液を使用することから、手間は少ないという利点はあるが 7 の顕微鏡検査と比較して夾雑物が多くなり、ブラディゾイトの確認が難しくなる。

1) 器具および試薬

定性 PCR 検体の TE 上清液、光学顕微鏡 (×400)、スライドガラス、カバーガラス、ピペットマン (100, 20 μl)

2) 実験操作

住肉胞子虫の遺伝子検査を実施する際に作成した TE 上清液に等量の 10% 中性ホルマリン溶液を加え固定し、をスライドガラスにセットし、三日月状、あるいは紡錘状のブラディゾイトを確認する。

3) 判定

- (1) 遺伝子検査法かつ当該顕微鏡検査の結果が陽性の場合には、陽性と判定し、食中毒の原因と判断する事ができる。
- (2) 当該検査法によりブラディゾイトが確認できない場合には「7 顕微鏡による検査」を実施し判定すること。