

平成28年4月27日  
生食監発0427第4号

各 

都道府県
保健所設置市
特別区

 衛生主管部（局）長 殿

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  
( 公 印 省 略 )

*Sarcocystis fayeri*の検査法について

*Sarcocystis fayeri*の検査法については、平成23年8月23日付け食安監発0823第1号「*Sarcocystis fayeri*の検査法について（暫定版）」により通知しているところです。

今般、当該通知を廃止し、*Sarcocystis fayeri*の検査法について別添のとおり定めましたので、検査を行う場合はこの方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

#### 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あって、当該病因物質が原因と疑われる事例の生食用馬肉（生食用馬肉として調理された肉片及び調理用に保存された肉ブロックも含む。）を対象とする。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

- 1) または 2) のどちらかの方法を用いる。
- 1) スクリーニング検査を行い、陽性の結果が得られた検体に対して、「4 顕微鏡検査」で述べる方法で、ブラディゾイトを確認する。
- 2) スクリーニング検査を行わず、直接、「4 顕微鏡検査」で述べる方法で検査を行い、ブラディゾイトを確認する。ただし、夾雑物が多いとブラディゾイトの確認が難しいため、顕微鏡検査が陰性の場合にはスクリーニング検査を行い、スクリーニング検査でも陰性であることを確認することが望ましい。

#### 3 スクリーニング検査

スクリーニング検査は定性 PCR 法又は Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法がある。これらの方法以外のスクリーニング検査法を用いることは妨げないが、これらの検査法と同等以上の性能を持っていることを確認すること。

##### 1) 定性 PCR 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サルコシスティス虫体（サルコシストの状態）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  $\mu$ 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 %)、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

③ 生食用馬肉からの DNA 抽出用の肉片切出しとその前処理

- A) 検体から肉片を切り出す。馬刺しとして調理された肉片 (薄切り肉) 及び保存された肉ブロックから 3 か所より肉片を切り出す。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。
- B) 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  $\times$  1 cm 程度の小片を切出す (\* 2)。
- C) トレイにパラフィルム (5 cm  $\times$  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)。
- D) 秤量計に 2.0ml 遠心管を乗せ、ゼロ補正し、ピンセットで 0.3g 分のミンチ状の試料を試験管に入れる。
- E) TE バッファーを加え 1ml 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)。
- F) 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  $\mu$ l を新しい 1.5ml 遠心管に移す (\* 6)。この上清を TE 上清液とする。

④ DNA の抽出精製

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 51304、51306) 又は同等の性能をもつ製品を用いて、各製品の手順書に従い③ F) で回収した 200  $\mu$ l の TE 上清液より DNA を抽出精製し、最終的に 100  $\mu$ 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  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存する。

⑤ 定性 PCR による検出

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。

A) 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  $0.2\mu\text{M}$  で使用する。全量で  $25\mu\text{l}$  の反応液とする場合、テンプレート DNA の割合は  $1\mu\text{l}/25\mu\text{l}$  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。

B) 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

C) 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、 $94^{\circ}\text{C}$ 、30 秒間、 $60^{\circ}\text{C}$ 、1 分間、 $72^{\circ}\text{C}$ 、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  $72^{\circ}\text{C}$ 、5 分間の保温後は  $4^{\circ}\text{C}$  で保温し、反応終了後は早めに  $-20^{\circ}\text{C}$  に反応液を移す。

D) 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)  $1\mu\text{l}$  と PCR 産物  $5\mu\text{l}$  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。

E) 結果の判定

陽性対照で約 1,100 bp 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、スクリーニング検査陽性と判断する。

2) LAMP 法

操作に当たっては各製品の説明書に記載された方法に従い検査する。キットに付属の DNA 抽出液を用いて、肉片から DNA を抽出する。等温増幅蛍光測定装置又は通常のリアルタイム PCR 装置を用いて測定を行う。使用機器によって結果の判定方法が異なるため注意する。

現在までに *S. fayeri* 検出用として試験室間バリデーションが行われているものとして以下のキットがある。また、以下のキットと同等以上の性能を有する他のキットを使用してもよい。

・ EasyAmp ザルコシステイヌ・フェアリー検査キット

(製造：株式会社ニッポンジーン、販売：株式会社ファスマック)

\*上記のキットは国内試験研究機関で試験室間バリデーションが行われ、馬肉 1g 当たり  $10^4$  コピー以上の *S. fayeri* DNA を検出できることが確認されている。

#### 4 顕微鏡検査

スクリーニング検査で陽性となった場合、必ず顕微鏡検査を行いブラディゾイトの確認を行う。顕微鏡検査には以下の4通りの方法がある。どれを選択してもよい。

##### 1) 馬肉の懸濁液を作成しブラディゾイトを確認する方法

###### ① 器具および試薬

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

###### ② 実験操作

A) 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。

B) 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又は紡錘状のブラディゾイトを確認する。ブラディゾイトを確認できた場合、顕微鏡検査陽性とする。

##### 2) 実体顕微鏡によって直接シストを分離する方法①

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。

###### ① 器具及び試薬

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、スライドグラス、カバーグラス、ピペットマン (100, 20  $\mu$ l)、眼科用ピンセット、先端の鋭利なピンセット、10ml シリンジ、24G 注射針、生食リン酸緩衝液 (PBS)

###### ② 実験操作

###### A) 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。

#### B) 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。脂肪はキラキラした光沢がある。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。

#### C) シストの分離

新品の24G注射針をメスのように使い、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又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、又は柔かく保持し、ゆっくりとシストを引き抜く。

#### D) 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又は注射針でつつき又は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。三日月状又は紡錘状のブラディゾイトを確認する。ブラディゾイトの遊離が確認しづらい場合は、プレパラートを光学顕微鏡から一旦降ろし、カバーガラスの上からカバーガラスを割らないよう注意しながら指で圧平してシストがつぶれたのを確認してから再び光学顕微鏡で観察する。ブラディゾイトを確認できた場合、顕微鏡検査陽性とする。

### 3) 実体顕微鏡によって直接シストを分離する方法②

馬肉をPBS中であらかじめ揉みほぐしてから観察する方法である。『2) 実体顕微鏡によって直接シストを分離する方法①』に比べて虫体の辺縁がはっきりと観察されるため、脂肪組織や筋と虫体を混同しにくくなる。また、大きさの違う虫体が混在していても、小さな虫体についても周囲の筋肉組織よりシルエットが濃く観察されるため発見しやすく、混合感染を見逃しにくい。

## 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（ $\times 100 \sim \times 400$ ）、ハサミ、滅菌強化ポリ袋（ストマッカー用検査袋 19cm $\times$ 30cm、または 15cm $\times$ 23cm）、スライドグラス、カバーグラス、ピペットマン（100, 20  $\mu$ l）、鉤なし眼科用ピンセット、先端の鋭利なピンセット、生理食塩水または生食リン酸緩衝液（PBS）

## ② 実験操作

### A) 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 5mm $\sim$ 1 cm 程度とし、10g 程度を目安とする。馬肉を滅菌ストマッカー用検査袋に入れる。生理食塩水又は生食リン酸緩衝液（PBS）を 20 $\sim$ 30ml 程度加え、ストマッカー用検査袋の上部を押さえ、液がこぼれないように配慮しながら筋肉組織をほぐすように手のひら全体で 1 分間ほど揉む。この際、肉と溶液は完全には混和されない。馬肉の筋肉組織が水分を含んだ状態を目安にし、プラスチック製シャーレに液ごと馬肉を入れる。実体顕微鏡の鏡台にシャーレを置く。

### B) 顕微鏡観察、シストの特徴

プラスチックシャーレに上方から斜めに光を当てる。指やピンセットの影が検体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。手袋をした指先と鉤なし眼科用ピンセットを用いて、両側から肉を引っ張りながら虫体を探索する。筋側の走行と平行に走る住肉胞子虫シストは線虫様で、透明感や光沢のない濃い白色を示す。シストの長さは 2 $\sim$ 6mm 程度である。シストの幅は 0.5 $\sim$ 1 mm 程度である。水分を含んだ筋肉組織は光に透け、組織中の虫体は水分を含まず、周囲の筋肉組織よりも密度が高いため、顕微鏡視野において濃いシルエットとなって観察される。脂肪や筋（スジ）は筋肉組織と同様光に透け、シルエットがはっきりしない。また、シストは必ず筋束の内側、筋膜直下に分布しているので、脂肪や筋とシストを混合しないよう注意する。

### C) シストの分離

鉤なし眼科用ピンセットを用い、シストの走行に平行に筋膜にピンセット先を閉じて突き刺し、ピンセット先を開いて裂け目を作る。鉤なし眼科用ピンセット又は先端が極細のピンセットを用いて、シストを引っ掛け、又は柔らかく保持し、ゆっくりとシストを引き抜く。

### D) 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

『2) 実体顕微鏡によって直接シストを分離する方法①』で述べた方法に準じる。ブラディゾイトを確認できた場合、顕微鏡検査陽性とする。

#### 4) 定性PCR検体のTE上清液で調製したTE上清を使用する方法

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『1) 馬肉の懸濁液を作成しブラディゾイトを確認する方法』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）、スライドグラス、カバーグラス、ピペットマン（100, 20 μl）

##### ② 実験操作

C) 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て固定し、をスライドグラスにセットし、三日月状又は紡錘状のブラディゾイトを確認する。ブラディゾイトを確認できた場合、顕微鏡検査陽性とする。

#### 5 総合判定

- 1) スクリーニング検査及び顕微鏡検査の結果がともに陽性的の場合に、陽性と判定する。
- 2) スクリーニング検査の結果が陰性的の場合に、顕微鏡検査を行わずに陰性と判定する。
- 3) スクリーニング検査の結果が陽性であって、顕微鏡検査の結果が陰性的の場合に、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に郵送する。この場合、国立医薬品食品衛生研究所で再検査を行い、陽性又は陰性的の最終判定を行う。
- 4) スクリーニング検査を行わずに顕微鏡検査のみを行い、結果が陽性的の場合、陽性と判定する。
- 5) スクリーニング検査を行わずに顕微鏡検査のみを行い、結果が陰性的の場合、確認のためスクリーニング検査を行い、スクリーニング検査でも陰性的であることを確認することが望ましい。

#### (注釈)

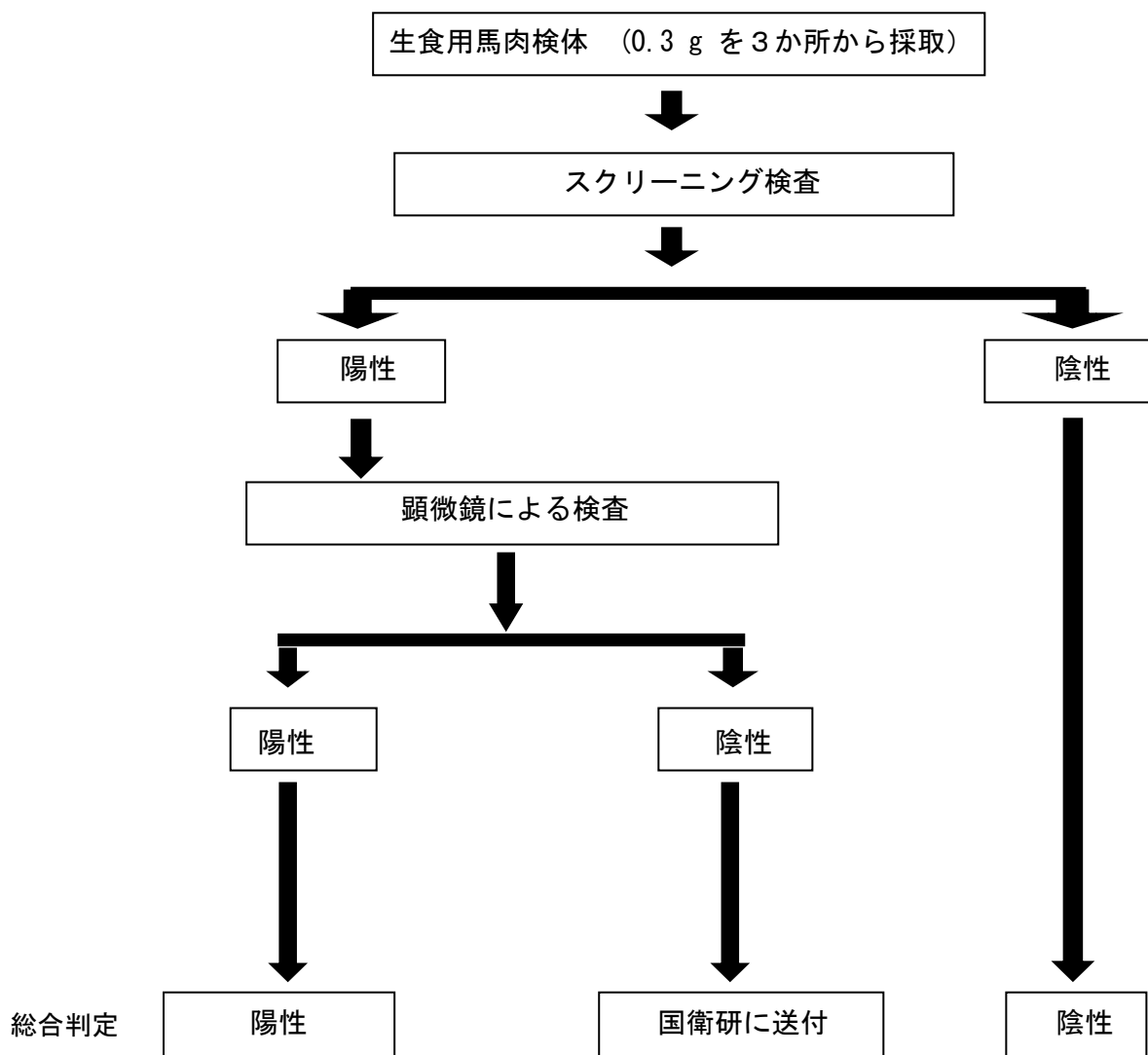
- \* 1 片刃カミソリ替刃やメス替刃等、取り扱いには十分注意する。なお、使用する器材は可能な限り使い捨ての製品を使用し、相互汚染の危険性を下げる。カミソリ刃などは火炎で焼けば再使用（5回程度）できる。
- \* 2 1検体で検査に使用できる部分が少ない場合（一切れしかなく、少量でとても薄い、また脂が多いなどの場合）は、一切れの肉につき使える部分を複数箇所から切出し、1検体分としてまとめる。
- \* 3 発泡スチロールのアイスボックスにトレイを準備し、切り出した肉片やミンチ状の肉はパラフィルムごとその上に置き、次の処理まで冷やしておく。
- \* 4 肉の切断が不十分だと試験管を振っても肉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



脂肪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、試験管内の試料は DNA 抽出まで氷中で保存する。

(参考) 検査法フローチャート

1) スクリーニング検査から行う場合



## 2) 顕微鏡検査から行う場合

