

## 原 著

*Sarcocystis fayeri* のウサギに対する下痢原性齊藤守弘<sup>1)†</sup> 新井陽子<sup>1)</sup> 鎌田洋一<sup>2)</sup> 小西良子<sup>2)</sup> 橋本勝弘<sup>1)</sup>

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3月6日受付・2013年7月24日受理)

## 要 約

*Sarcocystis fayeri*の経口摂取によってウサギに対して、下痢が誘発されるか否かをブラディゾイトを用いて試みた。5.5 × 10<sup>6</sup>個のブラディゾイト投与で食欲不振や沈鬱などとともに軟便が観察された。1.5 × 10<sup>7</sup>個では、水様性の下痢を呈するようになり、さらに5.5 × 10<sup>7</sup>個の投与では重篤な水様性下痢から全例死亡した。1.5 × 10<sup>7</sup>個のブラディゾイトを投与後の経時的観察では、3時間後から食欲不振、沈鬱などの症状とともに、病理組織学的には、小腸の粘膜上皮細胞のアポトーシスと剝離・脱落が認められ、6及び9時間後になると腸絨毛の短縮もみられた。一方、下痢は投与後9時間で初めて出現した。以上の成績から、*S. fayeri*はウサギに対して小腸粘膜の傷害に起因する下痢を引き起こすことが明らかとなった。——キーワード：アポトーシス，下痢，*Sarcocystis fayeri*，毒素。

----- 日獣会誌 66, 813~815 (2013)

平成14年頃から、患者喫食物について細菌及びウイルス検査を行っても病原体が検出されない、検出されても症状その他と合致しない原因不明食中毒が増え、平成20年には、年間100件を超える状況となった。このことから、厚生労働省は平成21年6月から平成23年3月までの間に発生した有症苦情事例の調査の結果、198事例について共通食品が判明した。有症苦情事例の多くは、生鮮魚介類によるものであったが、食肉として馬刺しを含む事例が33例含まれていた。馬刺しとその他の食品を喫食した有症苦情6事例に関する発症率は19~78.9%，潜伏期間は1~19.5時間、主要症状は下痢、嘔吐、腹痛等の消化器系のものであるが、悪寒、発熱、倦怠感や脱力感等を示すことも特徴であった[1-4]。このことから、著者らは、馬肉を原因食品とみなして病因物質を解明するための調査を開始した[1-4]。現段階では、有症苦情事例に関した馬肉中に*Sarcocystis*が高濃度に寄生していること、その種は*S. fayeri*であることが判明している[5]。

今回は、*S. fayeri*の摂取と有症苦情事例の主訴である下痢[1-4]の発症との因果関係を解明することを目的とした。人に対する感染実験が困難であることから、実験動物として、すでに、著者らが報告した*Sarcocystis*

シストタンパク質に対して感受性のあるウサギ[6]をモデルとして、経口投与実験を実施した結果、有益な証左を得たので報告する。

## 材料及び方法

*S. fayeri*自然感染馬肉(横隔膜筋)より直接法[7]により生鮮シストを取り出し、あらかじめリン酸緩衝生理食塩水(以下PBS)を1,000 μl分注したマイクロチューブに浮遊させた。マイクロチューブを3,000rpmで10分間遠心し、上清を捨て、沈査に2%ペプシン(豚胃粘膜由来ペプシン粉末, 和光純薬株, 大阪)液を1,000 μl加え、37℃で10分間消化した。消化終了後ふたたび3,000rpmで10分間遠心し、上清を捨て、沈査にPBS液1,000 μl加え、ウサギへの経口投与用のブラディゾイト浮遊液とした。

ウサギの実験目的に適った*S. fayeri*投与量の確認と症状観察のために胃ゾンデを用いて、ブラディゾイト1 × 10<sup>6</sup>、1.5 × 10<sup>7</sup>及び5.5 × 10<sup>7</sup>個をそれぞれ2羽に経口投与した。投与後、48時間まで、食欲・飲水の有無、沈鬱や下痢等の症状や死亡の有無を観察した。

なお、無投与コントロールとしてウサギ1羽を使用した。

† 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

表1 ウサギへのブラディゾイト投与量と臨床症状

ブラディゾイト数	食欲・ 飲水	沈鬱	軟便	下痢	死亡	回復 時間
$5.5 \times 10^6$	●●	●●	●●	○○	○○	48
$1.5 \times 10^7$	●●	●●	●●	●●	○○	48
$5.5 \times 10^7$	●●	●●	●●	●●	●●	—

●：症状あり ○：症状なし

ブラディゾイト投与後の経時的変化を観察するため10羽のウサギを5群 (n = 2) に分け、ブラディゾイト  $1.5 \times 10^7$  個を胃ゾンデによって投与した。投与後、症状観察とともに1, 2, 3, 6及び9時間後に各2羽を麻酔薬の静脈注射により安楽死させ、病理組織学的に病変の観察を実施した。

病理組織学的検査は、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、大・小腸、膀胱、睪丸、胸腺、肺、舌及び骨格筋の12カ所を採取し、10%中性緩衝ホルマリン水溶液で固定した。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。

実験に使用したウサギは日本白色 (Std : JW/CSK, 10週齢, 体重1.9~2.0kg, 雄, 日本エスエルシー(株), 東京) で、実験施設搬入時から実験終了まで自由飲食とした。なお、実験動物であるウサギの取り扱いについては、成書 [8, 9] に従い、国立医薬品食品衛生研究所の指導のもとで実施した。

### 成 績

ブラディゾイト  $5.5 \times 10^6$  個投与したウサギはいずれも、食欲・飲水の廃絶、沈鬱の症状と軽度の軟便が観察されたが死亡することはなく、48時間までに、これらの症状は回復した。

$1.5 \times 10^7$  個投与したウサギではいずれも、食欲・飲水の廃絶、沈鬱の症状と軽度の軟便や水様性の下痢が観察されたが、48時間までに回復し死亡することはなかった。

$5.5 \times 10^7$  個投与したウサギは、食欲・飲水の廃絶、沈鬱の症状と軽度の軟便と水様性の下痢がみられ、全例死亡した (表1)。

ブラディゾイト  $1.5 \times 10^7$  個を経口投与した後の経時的観察の結果は、投与後1及び2時間は、臨床症状はもとより病理組織学的にも著変はみられなかった。

投与後3時間では、いずれも食欲・飲水の廃絶と沈鬱がみられた。病理組織学的には、腸管上皮細胞にアポトーシスに特徴的な変化とされる核クロマチンの濃縮、断片化や剥離・脱落がみられ、粘膜固有層には、偽好酸球の浸潤が観察された。

投与後6時間では、3時間と同様に食欲・飲水の廃絶

表2 Sarcocystis fayeri ブラディゾイト経口投与ウサギの経時的観察

時間	臨床症状			病理組織学的所見		
	食欲・ 飲水	沈鬱	下痢	粘膜剥離・ 脱落	アポトー シス	絨毛 短縮
1	○○	○○	○○	○○	○○	○○
2	○○	○○	○○	○○	○○	○○
3	●●	●●	○○	●●	●●	○○
6	●●	●●	○○	●●	●●	○○
9	●●	●●	●●	○○	○○	●●

●：症状あり ○：症状なし

と沈鬱がみられた。病理組織学的には、腸管上皮細胞のアポトーシスや剥離・脱落とともに、絨毛の短縮がみられ、さらに粘膜固有層には偽好酸球浸潤、粘膜下組織には軽度から中等度の水腫が観察された。しかし、この段階までに、下痢は観察されなかった。

投与後9時間では、食欲・飲水の廃絶、沈鬱に加えて下痢が観察された。病理組織学的には、短縮、平坦化した腸絨毛上にはもはや上皮細胞は乏しく、腸管腔内には剥離した上皮細胞はめだたなくなった。粘膜下組織には、6時間後と同様の水腫が観察された (表2)。

なお、観察時間を通じて、腸管以外には病変は観察されなかった。

### 考 察

生鮮馬肉に関係した有症苦情6事例に関する情報によれば、喫食後、数時間という短い潜伏期間で、下痢を主訴とする食中毒様の症状が現れるという [1-3, 9, 10]。さらに、有症馬肉事例には、*S. fayeri* が高濃度に共通して寄生していることが判明した [1, 3, 10]。

今回、人食中毒のモデル実験として *S. fayeri* の経口接種により、主訴である下痢を誘発されるか否か、さらにどのような消化器病変が惹起されるかを調べた。ブラディゾイトの投与量と臨床症状との関係は、 $5.5 \times 10^6$  個では下痢は観察されなかったが  $1.5 \times 10^7$  及び  $5.5 \times 10^7$  個で誘発された。

著者らは、牛寄生種 *S. cruzi* シスト抽出液をウサギ皮下接種により、断続的な下痢と腸管による水腫病変等がみられることを報告している [6]。投与方法は異なるが、下痢や病理組織所見が類似することから、種は異なるが、牛寄生種 *S. cruzi* と馬寄生種 *S. fayeri* のウサギに対する病原性はほぼ同様であると考えられた。

著者らは、*S. cruzi* シスト抽出液から HPLC により抽出した推定分子量 15~16kDa タンパク質がウサギに対して下痢を誘発することを報告している。また、Nakamura らは [11]、牛寄生種 *S. cruzi* シスト抽出物をウサギに皮下接種すると、血中の TNF $\alpha$  の値が増加することを報告している。このことから、今後の研究目標とし

て、牛寄生種 *S. cruzi* に存在したウサギに対する下痢を誘発させる推定分子量 15～16kDa タンパク質の *S. fayeri* における存在の有無、また、ウサギ腸管にみられたアポトーシスと関連性のある TNF $\alpha$  について解明を進めていきたいと考えている。

#### 引用文献

- [1] 鎌田洋一：ザルコシスティスが含まれる馬肉による食中毒，日食微生物学会誌，29，47-52 (2012)
- [2] 小西良子：ヒラメ及び馬肉を原因とした病因物質不明食中毒（有症事例）について，獣医公衆衛生研究，14，9-12 (2012)
- [3] 齊藤守弘：*Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒，獣医学誌，16，114-125 (2012)
- [4] 温泉川肇彦：生食用生鮮食品を共通食とする病因物質不明有症事例の解明をめざして，日食微生物学会誌，29，43-46 (2012)
- [5] 齊藤守弘，鎌田洋一，小西良子：馬の *Sarcocystis fayeri* 感染状況，動物の原虫病，27，28-31 (2013)
- [6] 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, 57, 1049-1051 (1995)
- [7] 齊藤守弘，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)
- [8] 熊谷 進：動物試験法，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)
- [9] 山崎省二：実験動物，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)
- [10] 鎌田洋一：*Sarcocystis fayeri* を含んだ馬肉による食中毒，食品研究，61，21-27 (2011)
- [11] Nakamura Y, Saito M, Shibata Y, Itagaki H : Induction of tumor necrosis factor $\alpha$  and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*, Vet Parasitology, 85, 235-243 (1999)

### Diarrheagenicity of *Sarcocystis Fayeri* in Rabbits

Morihiro SAITO<sup>1)†</sup>, Yoko ARAI<sup>1)</sup>, Yoichi KAMATA<sup>2)</sup>, Yoshiko KONISHI<sup>2)</sup>  
and Katuhiro HASIMOTO<sup>1)</sup>

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

2) National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, 158-8501, Japan

#### SUMMARY

Whether or not *Sarcocystis fayeri* sarcocysts induces diarrhea was investigated via oral inoculation of bradyzoites into rabbits. When inoculated with  $5.5 \times 10^6$  bradyzoites, the rabbits had loose stool with some clinical signs including anorexia and depression. The rabbits receiving  $1.5 \times 10^7$  and  $5.5 \times 10^7$  bradyzoites showed watery stool. All of the latter died within 48 hours. Groups of the rabbits given  $1.5 \times 10^7$  bradyzoites were sacrificed one, two, three, six and nine hours after inoculation for histopathological analysis over time. The rabbits did not show any clinical signs and pathological changes until two hours later. By three hours post-inoculation, the rabbits revealed some clinical signs of anorexia, lost drinking behavior and depression that lasted until nine hours. Upon histopathological examination, apoptosis and desquamation of epithelial cells were found in the small intestine of the rabbits sacrificed at three to nine hours post-inoculation. The rabbits examined at six and nine hours also showed moderate to severe atrophy of villi as well as circumferential edema of submucosa. Diarrhea appeared only after a period of nine hours. These results suggest that *S. fayeri* sarcocysts induced diarrhea subsequent to acute damage of the intestinal mucosa in the rabbit.

—Key words : apoptosis, diarrhea, *Sarcocystis fayeri*, toxicity.

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

5-18-24 Kamiochiai, Chuo-ku, Saitama-shi, 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, 813 ~ 815 (2013)