

18S rRNA 遺伝子部分塩基配列によるエゾシカ筋肉から分離された 住肉孢子虫の系統解析

Phylogenic Analysis of *Sarcocystis* sp. Isolated from Muscle of Sika Deer in Hokkaido
by Partial 18S rRNA Gene Sequence

高野 敬志 濱田 恵子* 荻原 弥生* 八木 欣平

Keishi TAKANO, Keiko HAMADA, Yayoi OGIWARA and Kinpei YAGI

Cyst of *Sarcocystis* sp. was isolated from a sika deer in Hokkaido (*Cervus nippon ezoensis*). The deer was a 3-year-old female and had been captured in Kushiro Town on 23 April 2002. The isolated cyst was spindle shaped and its size was 3 mm×1 mm. It had a hairy wall of 5 μm thick and was interiorly divided by the septa which contained numerous bradyzoites. To identify the sample to the species level, genomic DNA was extracted for the phylogenetic analysis. The portion of 18S rRNA gene was amplified and 1,892 bp of its partial sequence was determined.

The highest identity was 94.4% by the comparison of 1,534 bp sequence between the sample and *S. fusiformis* by a BLAST search. The identities of the sample with pathogenic *S. hominis* and *S. suihominis* were 94.2 % and 92.5 %, respectively. These identities indicate that the sample is different species from the pathogenic species ever reported.

Phylogenetic tree was constructed with the close related species retrieved from GenBank. The tree revealed that there was no species which composed the clade with the sample. This result suggests that the sample does not correspond to the species whose 18S rRNA sequences have been reported up to the present. In addition, there is no sequence data of *Sarcocystis* isolated from deer in the previous reports. Therefore, accumulation of the sequence data for various *Sarcocystis* species isolated from deer is needed to identify the sample to species level.

Key words : *Sarcocystis* (住肉孢子虫) ; 18S rRNA gene (18S リボゾーム RNA 遺伝子) ; sika deer in Hokkaido (エゾシカ)

目 的

住肉孢子虫は、原生動物門アピコンプレクサ類アイメリア目に含まれる寄生性の原虫である¹⁾。この原虫が終宿主である肉食動物の腸管に寄生することにより、糞便と共にスポロシストまたはオーシストが環境中に排出される。このスポロシストを中間宿主である草食動物が摂食すると、草食動物の筋肉などの組織中に虫体（ブラディゾイト）が寄生する。さらに肉食動物が草食動物を食べることにより肉食動物への感染が成立し、動物の捕食被食関係を通じて生活環が形成されている。

近年、北海道ではエゾシカ (*Cervus nippon ezoensis*) の個体数が増加したため、平成 14 年 3 月に「エゾシカ保護管理計画」が策定され、それに関連して、食用資源としてエゾシカを有効活用することが検討されている²⁾。一方で、食肉の寄生虫に対する注意が喚起されており、住肉胞

子虫はそれに含まれる³⁾。ヒトに対して病原性を持つ住肉孢子虫は、腸管に寄生して、下痢、腹痛などの症状を引き起こす。北海道において、住肉孢子虫のヒトへの感染例はこれまで認められていないものの、エゾシカに寄生する種によるヒトへの感染の可能性は否定できない。さらに本虫が寄生した筋肉の表面には白色の斑点が生じるため、外観の劣化による食用肉としての品質低下も懸念される。住肉孢子虫には、宿主に対して特異性があるが⁴⁾、エゾシカに寄生する住肉孢子虫についてのこれまでの調査報告例は少ない。

住肉孢子虫の同定は、シスト（内部にブラディゾイトを含む）の大きさなどの形態的特徴に加えて、宿主の情報に基づいて行われている。近年、住肉孢子虫の遺伝子の情報が収集され、これまでの系統分類の裏づけが行われている。これまで、ヒトに感染して病原性を持つ住肉孢子虫の種は、主にウシの筋肉に寄生する *Sarcocystis hominis* とブタの筋肉に寄生する *S. suihominis* が知られている⁵⁾。本研究では、釧路管内で処理されたエゾシカ筋肉中に認められた

*北海道釧路保健所

住肉胞子虫を分離し、その遺伝子解析を行うことで、ヒトに対して病原性を持つ種を含めた既知の住肉胞子虫種との類縁関係を明らかにし、エゾシカ寄生種の系統分類学的位置を特定することを目的とした。

方 法

白斑が認められたエゾシカ筋肉は、10%ホルマリン溶液及び70%エタノール溶液中で保存した。ホルマリン溶液で保存した筋肉組織はエタノールで脱水した後、パラフィンで包埋して裁断した。その後、ヘマトキシリン-エオシンにより染色し、光学顕微鏡下で筋肉組織中の虫体を観察した。

エタノール溶液で保存した筋肉組織から、実体顕微鏡下で住肉胞子虫のシスト1個体をピンセットを用いて分離した。シストをリン酸緩衝液で洗浄した後、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 製) を用いてDNAを抽出、精製した。PCRには、White ら⁹⁾により報告されている真核生物の18S rRNA 遺伝子を増幅するプライマーセットに加えて、本研究で設計したNSF (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'), NS301 (5'-GCGAAAGCATTTGCCAAGGATG-3') NS302 (5'-CATCCTTGCAAATGCTTTCGC-3') 及びNSR (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTTACC TAC-3') を用いた (Fig. 1)。PCR反応液は、DNA溶液1 μ Lに10 X 緩衝液5 μ L, dNTPs (2 μ mol/mL) 4 μ L, センスプライマー (20 pmol/ μ L) 0.5 μ L, アンチセンスプライマー (20 pmol/ μ L) 0.5 μ L, Ampli-Taq Gold (2.5 Units/ μ L, Applied Biosystems 製) 0.25 μ Lを加え、滅菌蒸留水を加えて全量を50 μ Lとした。

PCR反応は、95°Cで12分間過熱して酵素を活性化させた後、94°C30秒間、53~55°C30秒間、72°C1分30秒間を1サイクルとして50サイクル、最後に72°C7分間の条件で行った。

PCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動した後、DNA断片を含むゲル部分を切り出し、それからEASY TRAP (TaKaRa 製) を用いて精製し、DNA増幅部分の塩基配列を調べるためのサイクルシーケンス反応の鋳型とした。サイクルシーケンス反応は、PCRで用いたプライマーとBig Dye Sequence Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 製) を用い、DNA塩基配列はABI PRISM 310 DNA シーケンサーにより決定した。

得られた塩基配列から、DDBJ/EMBL/GenBank[®]に登録されている近縁の塩基配列をBlast searchにより検索した。近縁種であると推定された塩基配列を基にDNASIS (日立製作所製) のプログラムを用いてアライメントを行い、近隣結合法⁷⁾により系統樹を作成し、同時に系統樹の分枝の信頼性を確かめるために、1000回の繰り返しによるブーツストラップ値を求めた。

結果及び考察

住肉胞子虫を有していたエゾシカは、釧路町で平成14年4月23日に捕獲された3歳メスである。右大腿部筋肉組織中に認められた住肉胞子虫のシストの断面をFig. 2、拡大した断面をFig. 3に示した。形態は長さ3.0 mm、幅1.0 mmの紡錘型であった。光学顕微鏡による観察では、5 μ mの薄い外壁を有し、その内側に多数の伸長した三日月型のプラディゾイトが充満した隔膜の構造が認められた

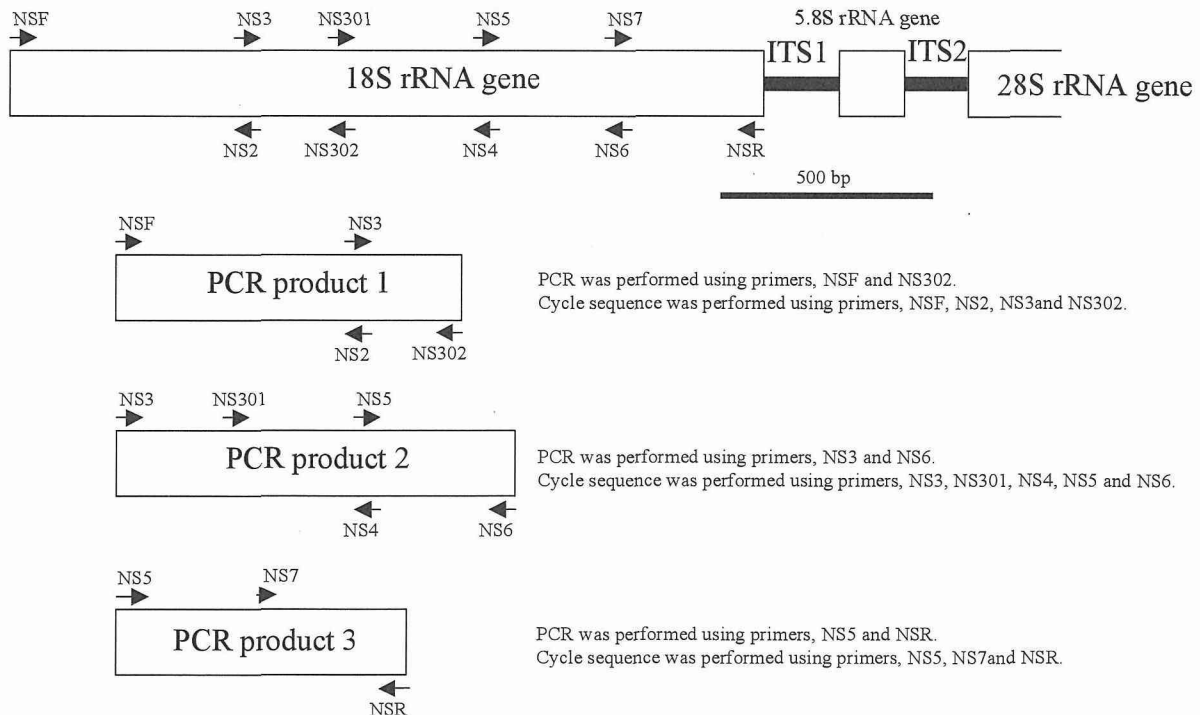


Fig. 1 Locations of Primers in 18S rRNA Gene Used in PCR and Cycle Sequence of PCR Products

(Fig. 4).

本研究により分離した住肉胞子虫の18S rRNA 遺伝子の長さ1,892 bpの塩基配列を決定した。さらに、決定した塩基配列と類似した塩基配列を持つ原虫を検索した結果、全て一致を認めた塩基配列を持つ住肉胞子虫の種は検索されなかった。塩基配列が最も一致した種は *S. fusiformis* (AF176927) で、1,534塩基の比較で94.4%一致した。検索された近縁種の塩基配列を用いてアライメントを行い、すべてに対応する領域を基に作成した系統樹を Fig. 5 に示した。

今回の検体と同一のクレードに配置された種は認められないことから、今回検索された近縁種の中では単系統であることが示唆された。従って、現在のところ、今回の遺伝子解析の結果のみでは種までの同定は不可能であり、今後の住肉胞子虫類の遺伝子情報の蓄積に委ねられる。ヒトに対して病原性をもつと報告されている他の住肉胞子虫類 *S. hominis* 及び *S. suis* は、それぞれ同種内で同じクレードに属し、今回の検体とは明らかに異なる系統であることが示された。今回の検体と *S. hominis* (AF176945) とは1,434塩基の比較で94.4%一致し、*S. suis* (*S. suis*) (AF176936) とは1,329塩基の比較で92.5%一致した。このことから、今回の検体は、現在まで病原性があると報告された住肉胞子虫種とは別種であると推測する。

シカ科動物に対する住肉胞子虫の寄生状況に関する情報は世界各地から報告がある。リトアニアにおけるノロジカの例では、検査対象の80%に感染が認められ、形態観察により *S. gracilis*, *S. capreolicanis*, *S. cf. hofmanni* 及び *Sarcocystis* sp. が検出されたことが報告されている⁹⁾。アメリカにおけるオジロジカ及びミュールジカの例では、検査対象のおおよそ70%以上の感染が認められ、終宿主についても、コヨーテ、イヌ、アカギツネなどに対する感染が認められている⁹⁾。日本においては、ホンシュウジカ

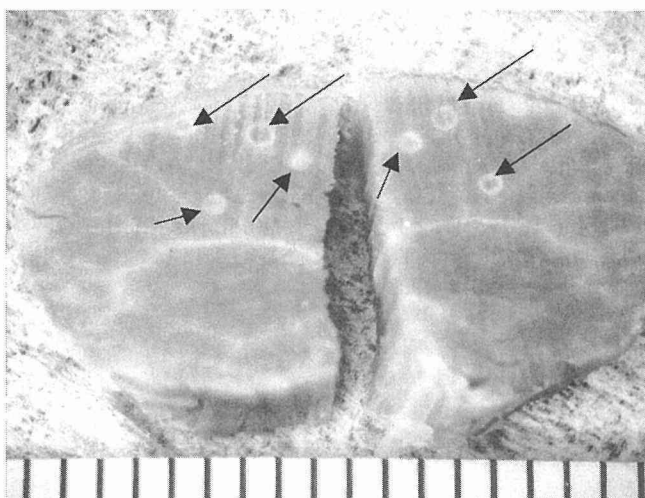


Fig. 2 Morphology of *Sarcocystis* Appeared in Muscle of Sika Deer in Hokkaido

A scale is 1 mm.

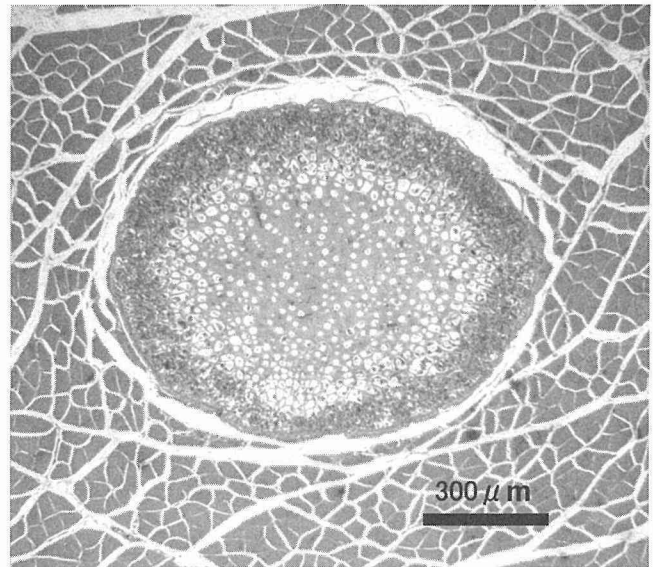


Fig. 3 Light Micrograph of a Round Section of *Sarcocystis* Appeared in Muscle of Sika Deer in Hokkaido

(*Cervus nippon centralis*) からの検出が報告されており、形態観察により *S. sybillensis* と種が推定されている¹⁰⁾。*S. sybillensis* は長さ約0.5 mm、幅0.06 mm、外皮の厚さ6~10 μmと報告されており、今回の検体と比較した場合、明らかに異なっていた。しかし、*S. sybillensis* など、シカに寄生していると報告された上記5種の住肉胞子虫類については遺伝子による解析は報告されていない。これらと今回の検体との比較検討を行うために、遺伝子解析の情報が必要であり、今後の報告を期待している。さらに、北海道産食品としてのエゾシカの食肉を流通させ、価値を高めるためには、住肉胞子虫に関して、寄生頻度、寄生種、ヒトに対する病原性、終宿主に関わる情報を収集し、食肉の品質及び安全を確保するための基礎資料とする必要があると考えられる。

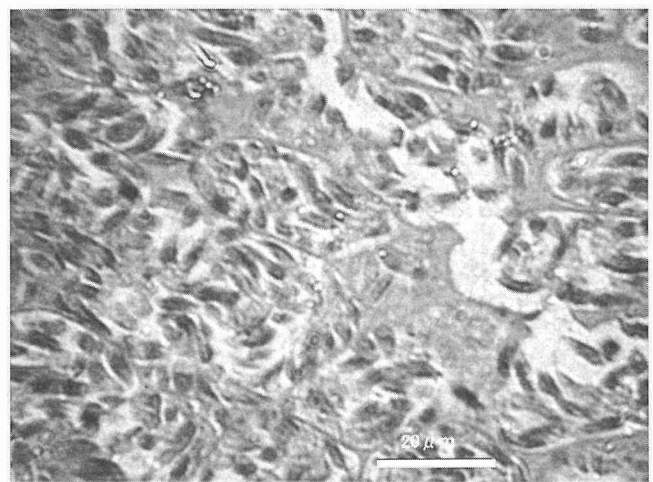


Fig. 4 Light Micrograph of Bladyzoites in Septa

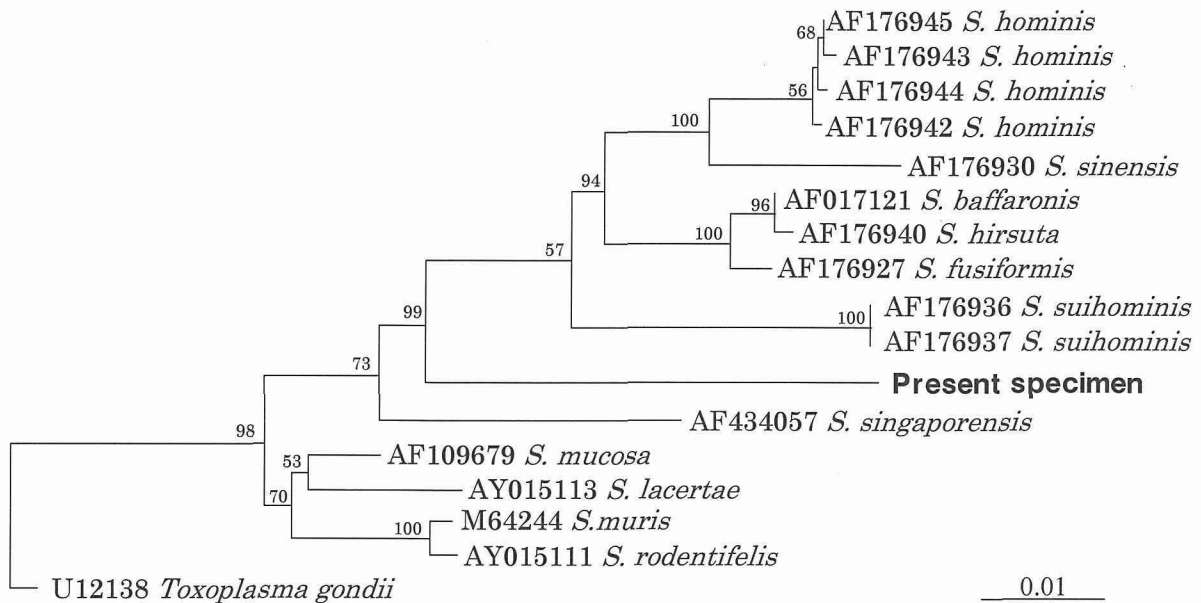


Fig. 5 Phylogenetic Tree Based on the Partial Sequence of 18 S rRNA Gene in *Sarcocystis* by Neighbor-joining Method. Numbers at nodes represent percentages of bootstrap. The scale bar represents a distance of 0.01 substitutions per site. GenBank accession numbers are noted at the front of species names.

要 約

2002年4月23日に釧路町で捕獲された3歳メスのエゾシカから住肉胞子虫のシストを分離した。分離したシストは、長さ3mm、幅1mmの紡錘型で、5 μ mの外皮を持ち、内部に多数のブラディゾイトを含む隔壁の構造が認められた。このシストを同定するため、ゲノムDNAを抽出して系統解析を行った。18S rRNA遺伝子の領域を増幅して1,892bpの塩基配列を決定した。

BLAST searchの結果、本検体と最も高い一致度が認められたのは *Sarcocystis fusiformis* で、1,534bpの塩基配列の比較では94.4%が一致した。本検体と病原性のある *S. hominis* 及び *S. sui hominis* との比較では、それぞれ94.2%及び92.5%が一致した。これらの一致度は、本検体はこれまで病原性があると報告されている種とは別種であることを示している。

GenBankから検索した本検体に近縁である種を用いて系統樹を作成した。系統樹では、本検体と同じクレードに属する種はないことから、これまでに18S rRNA遺伝子の塩基配列を登録している種とは異なることが示唆された。さらに、過去にシカから分離された住肉胞子虫の塩基配列の報告はないことから、本検体を種まで決定するためには、

シカ由来の住肉胞子虫の遺伝子の情報を蓄積する必要がある。

文 献

- 1) Olsen OW : Animal Parasites. Their Life Cycles and Ecology. 3rd ed., University Park Press, Baltimore, USA, 1974, p.173
- 2) 北海道環境科学研究センター, 北海道立林業試験場, 北海道立根釧農業試験場, 北海道立十勝農業試験場, 北海道立滝川畜産試験場, 北海道立衛生研究所: 平成8~12年度重点研究報告書エゾシカの保全と管理に関する研究, 北海道環境科学センター, 札幌, 2001
- 3) 佐野基人: 食品寄生虫, 南山堂, 東京, 1984, p.46
- 4) Fayer R : Clin. Microbiol. Rev., 17, 894 (2004)
- 5) Olson ME, Guselle N : Advances in Pork Production, 11, 153 (2000)
- 6) White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor JW : PCR Protocols. Guide to Methods and Applications (eds. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ), Academic Press, New York, USA, 1990, p.315
- 7) Saitou N, Nei M : Mol. Biol. Evol., 4, 406 (1987)
- 8) Kutkuene L : Acta Zoologica Lituanica, 11, 97 (2001)
- 9) Emmett CW, Huggins EJ : J. Wildl. Dis., 18, 187 (1982)
- 10) Saito M, Itagaki T, Shibata Y, Itagaki H : Jpn. J. Parasitol., 44, 218 (1995)