

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 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%）、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°C、30 秒間、60°C、1 分間、72°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°C、5 分間の保温後は 4°C で保温し、反応終了後は早めに -20°C 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) 1 μ l と PCR 産物 5 μ 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。

5) 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、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 ($\times 400$)、スライドグラス、カバーグラス、ピペットマン (100, 20 μ l)、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 rpm 10 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の場合に、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の場合、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の場合、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)

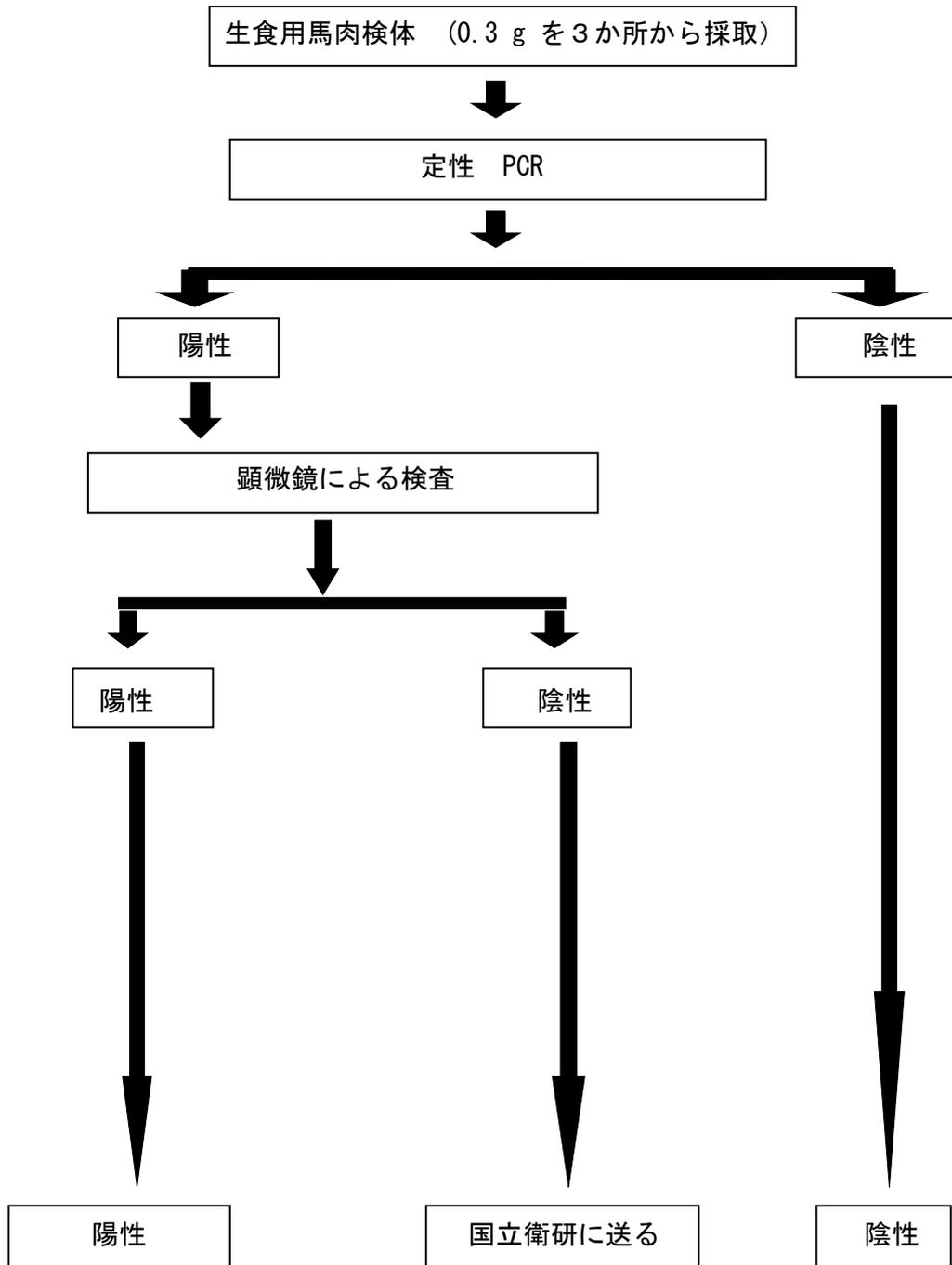
- * 1 片刃カミソリ替刃やメス替刃等、取り扱いには十分注意する。なお使用する器材はなるべく使い捨ての製品を使用し、相互汚染の危険性を下げる。カミソリ刃などは火炎で焼けば再使用（5回程度）できる。
- * 2 1検体で検査に使用できる部分が少ない場合（一切れしかなく、少量でとても薄い、また脂分が多いなどの場合）は、一切れの肉につき使える部分を複数箇所から切出し、1検体分としてまとめる。
- * 3 発泡スチロールのアイスボックスにトレイを準備し、切出した肉片やミンチ状の肉はパラフィルムごとその上に置き、次の処理まで冷やしておく。
- * 4 肉の切断が不十分だと試験管を振っても肉が固まったま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

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。