

兵庫県の本シュウジカ (*Cervus nippon centralis*) に寄生が見られた
サルコシスティス (*Sarcocystis*) に関する研究

Studies on *Sacrocystis* detected from Japanese sika deer
(*Cervus nippon centralis*) in Hyogo Prefecture

松 尾 史 朗

兵庫県の本シュウジカ (*Cervus nippon centralis*) に寄生が見られた
サルコシスティス (*Sarcocystis*) に関する研究

Studies on *Sacrocystis* detected from Japanese sika deer
(*Cervus nippon centralis*) in Hyogo Prefecture

松尾 史朗

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：池 和憲)

2020 年 9 月

目 次

序 論	1
第 1 章 兵庫県の本シウジカにおける <i>Sarcocystis</i> の寄生状況	
1 緒言	4
2 材料および方法	4
3 結果	5
4 考察	7
5 小括	10
6 図表	11
第 2 章 兵庫県の本シウジカからの <i>Sarcocystis</i> の 形態学的検討	
1 緒言	17
2 材料および方法	18
3 結果	20
4 考察	22
5 小括	24
6 図表	26
第 3 章 兵庫県の本シウジカ由来 <i>Sarcocystis</i> の 分子分類学的検討	
1 緒言	34
2 材料および方法	35
3 結果	40
4 考察	41
5 小括	43
6 図表	45

第4章 兵庫県の本シウジカからの *Sarcocystis* の

イヌへの感染試験

1 緒言	48
2 材料および方法	48
3 結果	49
4 考察	49
5 小括	51
6 図表	52
総括	54
謝辞	58
参考文献	59

緒 論

サルコシスティス (*Sarcocystis*) 属原虫はアピコンプレックス門 (Apicomplexa) に属する孢子虫綱コクシジウム目サルコシスティス科に属する原虫であり (Dubey *et al.*, 1989)、中間宿主の筋肉中に肉眼でもみられるような大型のシストであるサルコシスト (sarcocyst) を形成することから、以前は住肉孢子虫と呼ばれていた。本属の原虫は生活環を完遂するために終宿主および中間宿主となる 2 種類の宿主を必要とする。終宿主はヒトを含む霊長類および肉食動物、中間宿主は草食性や雑食性動物、ウサギ、げっ歯類、および鳥類も含まれる (石井、2007)。中間宿主および終宿主とも宿主特異性が高いと考えられている (Dubey *et al.*, 1989)。中間宿主から終宿主への感染はサルコシストを摂食することにより、また終宿主から中間宿主への感染は終宿主の糞便中に排出されるスポロシストを摂食することによる (Dubey *et al.*, 1989)。

病原性に関しては、中間宿主では急性住肉孢子虫症と慢性住肉孢子虫症が知られており、急性住肉孢子虫症では発熱、下痢、食欲不振等が見られ、慢性住肉孢子虫症では好酸球性筋炎等の筋肉病変、筋中の帯緑色小結節形成が見られることが報告されている (Fayer, 2004)。また馬に寄生する *Sarcocystis neurona* のように、馬原虫性脳脊髄炎を発症する例もみられている (Fayer, 2004)。いずれも現時点では有効な治療法は確立されていない (Dubey *et al.*, 1989 ; Fayer, 2004)。

今回、狩猟および有害捕獲を目的として兵庫県中部山岳地帯の宍粟市福知下三方地区で捕獲されたニホンジカの 1 亜種であるホンシュウジカ *Cervus nippon centralis* において、捕獲直後の肉色が他とは異なる個体が発見され、その病態を追求するため病理組織検査を実施したところ、筋肉や内臓諸器官に病的所見は指摘されなかったが、心筋を含む筋肉から多数の

Sarcocystis 属原虫のサルコシストと思われる寄生体が認められた。わが国のシカにおいては、これまでに北海道のエゾシカ、ならびに群馬県、埼玉県、および岐阜県のホンシュウジカから *Sarcocystis* 属原虫の存在が報告されているが、ほとんどは調査頭数における感染率および簡単な形態に関する報告（斉藤ら、1998；成澤ら、2008；新井ら、2010；松尾ら、2014；Abe *et al.*, 2019）、あるいは断片的な *18S rDNA* 遺伝子解析（高野ら、2006；Abe *et al.*, 2019）に留まり、一部の種の決定を除いては詳細な検討はなされていない。本属の原虫は宿主特異性が極めて高いことが知られており（Dubey *et al.*, 1989）、野生草食動物には固有の *Sarcocystis* 種が寄生していることが推察される。

わが国では、中山間部におけるニホンジカおよびイノシシによる獣害がクローズアップされてきており、狩猟と有害捕獲によって捕獲が行われている。食肉家畜の普及が西洋に較べて劣っていたわが国では、これら野生獣肉は古来より重要な蛋白源として供給されてきたが、ニホンジカは十数年前まで捕獲数も僅かで食用としてはイノシシほど一般的ではなかった。しかしこの十数年で全国的に飛躍的に生息数を増やし、兵庫県では狩猟と有害捕獲を合わせて、2016 年度 43,682 頭、2017 年度 37676 頭、2018 年度 37234 頭、2019 年度 40937 頭（兵庫県農政環境部 環境創造局 鳥獣対策課、2020）となっている。狩猟獣は狩猟家とその周辺の人々によって消費されてきたが、最近ではニホンジカの肉の有効利用が提唱されている

（上田, 2015）。専用の解体施設を建て、解体と検査のルールを作っている所もある。受精、発育、そして食肉への利用までその全てのライフサイクルが管理されている肉用家畜と異なり、食肉として供給されるまでの食肉検査は不十分な状態にある。ひとたびその肉に食品衛生法に抵触する問題が発生すれば、風評等により今後ニホンジカの肉は、廃棄物に過ぎなくなる恐れがある。ヒトで *S. truncata* による食中毒が和歌山県で、滋賀県や

茨城県でも *Sarcocystis* 属によると思われる食中毒の事例が報告されている（青木ら、2013, 2017；中本ら、2017；山本ら、2020）。このような事態を防ぎ、ニホンジカを人の蛋白源として担保するためには、シカがもつ寄生生物に関する知見を集積することが望まれる。そこでこれらの感染状況、感染種、さらには終宿主を明らかにすることを目的として本研究を行うこととした。

第 1 章 兵庫県の本シュウジカにおける *Sarcocystis* の寄生状況

1 緒 言

狩猟および有害捕獲を目的として兵庫県中部山岳地帯の宍粟市福知下三方地区で捕獲された本シュウジカ *Cervus nippon centralis* の心筋を含む筋肉から多数の *Sarcocystis* 属原虫のサルコシストと思われる寄生体が認められた。わが国における野生のシカ（本シュウジカおよびエゾシカ）に寄生する *Sarcocystis* 属原虫についてはこれまでに斉藤ら（1998）、成澤ら（2008）、新井ら（2010）、松尾ら（2014）による簡単な寄生率と形態に関する報告があるのみで、詳細については未だ十分に知られていない。本章では、まず当該地域における本シュウジカの *Sarcocystis* の寄生率を知ることが目的とした。捕獲した本シュウジカの個体あたりの寄生率、年齢別、体の部位別の寄生率について調査を行った。

2 材料および方法

兵庫県宍粟市福知下三方地区（北緯 35 度 10 分、東経 134 度 37 分、標高 260～540 m）において、狩猟期（2007 年 1～3 月、11～12 月、2008 年 1～3 月）あるいは有害捕獲（2007 年 7～8 月）に捕獲された本シュウジカ 64 頭を調査対象とした。捕獲した個体において、雄では角の形状から、雌では体格および歯の摩耗を基に、成書及び地元猟友会員のアドバイスから年齢を推定した。その後各個体別に心筋、横隔膜、背最長筋、上腕二頭筋、大腿二頭筋をそれぞれ 10 g ずつ採取し、斉藤ら（1984）の簡易直接法に準じて実体顕微鏡下でサルコシストの有無を検査した。すなわち、それぞれの検体をメスを用いて約 5 mm 厚に薄切し、直径 12 cm のガラスシャーレに投

入したのち、生理食塩水を薄切が浸かる程度に入れ、サルコシストの有無を観察した。各筋肉内のサルコシスト密度については、10 g の検体から作製された薄切すべてに含まれるサルコシスト数を計測し、10 g あたりのサルコシスト数とした。実体顕微鏡観察に際しては、斜め上方から光を照射して筋肉観察を容易にするとともに、薄片は正確を期するため裏表両面から計測した（図 1-1）。

得られた結果については、寄生率についてはフィッシャーの直接確率検定（Fisher's exact probability test）を用いて年齢間、寄生部位間での有意差の有無を検定し、寄生密度については数値を対数変換したのち General linear model procedure および Tukey-Kramer test（SAS version 9.3, SAS Institute, U.S.A）を用いた分散分析（ANOVA）により有意差を解析した。

検出されたサルコシストの一部を実体顕微鏡下で 23 ゲージの注射針および小形のハサミを用いて筋肉中から単離し、あらかじめ生理食塩水を滴下してあるスライドグラス上に載せ、カバーグラスをかけて鏡検することにより、その形態および大きさを観察測定した（図 1-2）。また、サルコシスト内のブラディゾイトの観察のために、同様にスライドグラス上に載せたサルコシストを注射針で破壊し、カバーグラスをかけたのち光学顕微鏡で観察および測定を行った。大きさの計測には接眼マイクロメーターを使用した。

3 結 果

検査した 64 頭のホンシュウジカのうち、52 頭（81.3%）のいずれかの部位からサルコシストが検出された。これらを年齢別、寄生部位別にまとめたものを（表 1-1）に示した。

検査した 0 歳の子シカ 6 頭からは心臓、横隔膜、後肢、背最長筋のいずれからサルコシストが認められなかったが、1 歳齢のシカでは検査した 7

頭すべてからサルコシストの寄生が認められ、以後も高い寄生率で推移した。検査した 1 歳以上のシカ 58 頭における寄生率は 89.7% (52/58) で、1 歳齢から 5 歳以上までの各年齢のシカ間での *Sarcocystis* の寄生率には有意差は認められなかった。

寄生部位別の検索では、心筋、横隔膜筋膜、大腿二頭筋、背最長筋のいずれの筋肉にもサルコシストの寄生が見られたが、5 歳齢のシカにおける寄生率を除き、各年齢とも部位間での寄生率に有意な差は認められなかった。

サルコシストの寄生が見られた各年齢のシカの各部位における筋肉 10 g あたりに認められたサルコシスト数を (表 1-2) に示した。サルコシスト数の最高値は 4 歳のシカの心筋で見られた 2,262 個/10 g で、横隔膜筋ではサルコシスト数の最高は 1 歳のシカで見られた 88 個/10 g、後肢では 2 歳の 205 個/10 g、背最長筋では 4 歳の 336 個/10 g であった。これらのサルコシスト密度を年齢別、寄生部位別に比較すると、年齢間では 0 歳の子ジカを除き各部位とも有意差は認められなかったが、寄生部位別では心筋に見られたサルコシスト密度が他の部位と較べて有意に高かった (表 1-3)。

検出されたサルコシストは長円形を基本として細分すると卵形から細長い棍棒状を呈し、任意に選んだ 177 個のサルコシストの大きさは平均 $698.5 \times 170.2 \mu\text{m}$ ($243.0 \sim 1,067.4 \times 58.7 \sim 351.1 \mu\text{m}$) と幅広い変化を示した。この様々な形態と大きさをもつサルコシストは検査したいずれの部位からも認められた。

サルコシスト内部はいずれも隔壁で仕切られており (図 1-3)、仕切られた小室のそれぞれには三日月型を呈するブラディゾイトならびに球形のメトロサイトが充満していた (図 1-4)。任意に分離した 24 個のサルコシストから得た 118 個のブラディゾイトの大きさは平均 $16.5 \times 4.6 \mu\text{m}$ ($14.9 \sim 18.1 \times 2.4 \sim 6.5 \mu\text{m}$) であった。いずれの部位でも年齢、雌雄間で寄生密度の差異は認められなかった。

4 考 察

ニホンジカ(*Cervus nippon*) に寄生する *Sarcocystis* 属原虫の感染率に関しては、これまでに斉藤ら(1998)によるホンシュウジカ(*Cervus nippon centralis*) およびエゾシカ(*Cervus nippon yezoensis*) についての報告があるのみである。彼らの報告によれば、埼玉県および群馬県産のホンシュウジカでのサルコシストの寄生率は 92.1 % (70/76) で、北海道産のエゾシカでは寄生率は 85.0 % (51/60) と高い数値を示した。

今回得られた兵庫県産のホンシュウジカでもサルコシストの寄生率は 81.3% (52/64) と高く、わが国に生息するニホンジカの *Sarcocystis* 感染率はウシ (6.3%) (斉藤ら、1998)、ウマ (14%) (斉藤ら、2012)、ブタ (8.5%) (斉藤ら、1988) などの家畜のそれと比較してかなり高く、わが国に生息するニホンジカには高い割合で *Sarcocystis* が感染していることが判明した。

シカ類に寄生する *Sarcocystis* の感染率については、海外においても広く知られており、とくにアメリカ産のオジロジカ(*Odocoileus virginianus*) についてよく調査されている。すなわち、アラバマ、アーカンソー、フロリダ、ジョージア、ケンタッキー、ルイジアナ、メリーランド、ミシシッピ、ニュージャージー、ノースカロライナ、サウスカロライナ、テネシー、バージニア、ウェストバージニアの各州を含むアメリカ南東部に生息する個体では感染率は 51% (n=390) であり (Crum and Prestwood, 1982)、ミネソタ州の北東部のものでは 79% (n=100) (Emnet, 1986)、アラバマ州のシカでは 88% (n=34) (Lindsay *et al.*, 1988)、サウスダコタ州では 74% (n=23) (Emnett and Hugghins, 1982) であった。また、近縁のミュールジカ(*Odocoileus hemionus*)ではモンタナ州の個体で 85% (n=153) (Dubey and Speer, 1985)、サウスダコタ州のシカで 88% (n=24) (Emnett and Hugghins,

1982) であったことが報告されている。一方、ヨーロッパに生息するアカシカ (*Cervus elaphus*) での *Sarcocystis* 感染率は、スペイン (Rodriguez *et al.*, 1981) では 2 歳齢以下の子ジカで 76.3%、2 歳齢以上のシカでは 95.6% (n=317)、ハンガリー (Entzeroth *et al.*, 1988) で 33.3% (n=45)、リトアニア (Kutkiene, 2003) で 70.2% (n=37) であった。またノロジカ (*Capreolus capreolus*) における *Sarcocystis* 感染率はイタリア (Santini *et al.*, 1997) で 100% (n=22)、リトアニア (Kutkiene, 2001) で 80.0% (n=30)、スペイン (Lopez *et al.*, 2003) で 85.6% (n=132) であったことが報告されている。これらの結果は、世界各地に生息するシカ類の多くが 70%以上の高い感染率で *Sarcocystis* を保有していることを示している。

シカ類に寄生する *Sarcocystis* の多くの終宿主は、犬、オオカミ、コヨーテのようなイヌ科動物であることが知られており (Dubey and Speer, 1985)、ヨーロッパや北アメリカにおいては、シカ類への感染源であるスポロシストの供給にオオカミやコヨーテが大きな役割を果たしていると考えられている。わが国ではかつてニホンオオカミが同様の役割を果たしていたと思われるが、ニホンオオカミは絶滅しており、現在わが国では野生の日本ジカを捕獲する動物が存在せず、これがシカの異常繁殖の一因となっている可能性は否定できない。このような状況にもかかわらず、わが国のシカでも高い *Sarcocystis* の感染率が認められたことは、ニホンオオカミ以外の野生肉食動物であるキツネやタヌキのほか、猟犬や野犬などの犬も *Sarcocystis* の終宿主として生活環を完遂させるために大きな役割を果たしている可能性が示唆される。ハンターはしばしば獲物の一部を随伴する猟犬に与えることがある。中間宿主筋肉内のサルコシスト内には極めて多数のブラディゾイトが包含されており、それらが終宿主体内で有性生殖をしたのちオーシストとなり、さらにそれぞれのオーシスト内に 2 個ずつのスポロシストを形成し、少なくとも数週間に渡って糞便とともに外界に排出することから、1 頭の終宿

主が排泄するスポロシストは膨大な数にのぼる (Dubey and Speer, 1985) ので、比較的少数でもシカの生息域を広く行動するものは終宿主として好適なものとなろう。

年齢別の感染率調査では、1 歳以上の個体ではほぼ同様の値を示したが、0 歳の個体では寄生が認められなかった。ニホンジカは生後一定の時期を経てスポロシストの感染源と考えられる草食を始めることと、感染後臓器組織でシゾゴニー（メロゴニー）を経てメロゾイトが筋肉部位に到達し、大形のサルコシストを形成するまでの期間がこのことと関連している可能性が考えられたが、この期間は併せても 2 ヶ月から 3 ヶ月程度と推察されるので、それ以外の要因、たとえば幼仔期の何らかの免疫系作用が働いていることも推察できるかもしれない。この結果については、さらに調査個体数を増やす必要があると思われる。

部位別の調査では、心筋、横隔膜筋、後肢大腿二頭筋、背最長筋間での感染率にはほぼ有意差が認められなかったものの、寄生密度は心筋で有意に高い結果が得られた。この結果が調査したホンシュウジカに複数の種が寄生しているのか、単一種にある程度の心臓指向性があるのかは明らかにできなかったが、各部位から得られたサルコシストいずれも形態、大きさに同等の変異があり、一定の傾向は認められなかった。心筋で寄生密度が高かったのはおそらくスポロシスト感染後に各筋肉への移動が血液を介して行われたと考えられ、循環器の起点は心臓であることから、このような結果になったものと想像される。

これまでに我が国のホンシュウジカ寄生の *Sarcocystis* の種については、群馬県および埼玉県で捕獲されたホンシュウジカから *S. sybillensis* ならびに *S. wapiti* が同定されている (新井ら, 2010) が、今回得られたサルコシストはそれらとは形態的に異なっていた。今回検出された *Sarcocystis* の同定についてはさらなる詳細な形態学的検討、あるいは遺伝子による検討が

必要であると考えられた。

5 小 括

狩猟および有害捕獲を目的として兵庫県中部山岳地帯の宍粟市福知下三方地区で捕獲されたホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) 64 頭を年齢別 (1 歳未満～5 歳) および部位別 (心筋、横隔膜筋、大腿二頭筋、および最背長筋) に材料を採取し、そこに見られたサルコシストの寄生率を調査した。調査したホンシュウジカにおける寄生率は 81.3%と高率を示した。年齢別では 1 歳以降の個体の感染率に明瞭な差異は見られなかったが、0 歳の子ジカには寄生が認められなかった。部位別の調査では心筋、横隔膜筋、後肢大腿二頭筋、および背最長筋間での感染率にはほぼ有意差が認められなかったものの、寄生密度は心筋で有意に高い結果が得られた。この結果が、調査したホンシュウジカに複数の種が寄生しているのか、単一種である程度の心臓指向性があるのかは明らかにできなかった。得られたサルコシストはいずれの部位に寄生するものも長円形を基本として細分すると卵形から細長い棍棒状を呈し、大きさにはかなりの変異 ($445.5 \sim 1064.3 \times 99.0 \sim 247.5 \mu\text{m}$; 平均 $678.6 \times 174.2 \mu\text{m}$) が見られた。今回の調査で観察された *Sarcocystis* はこれまでわが国で報告されていた種とは形態学的に異なっていた。



図1-1. 筋肉中の*Sarcocystis* のサルコシスト
斜め上方から光を照射し、実体顕微鏡で観察した。

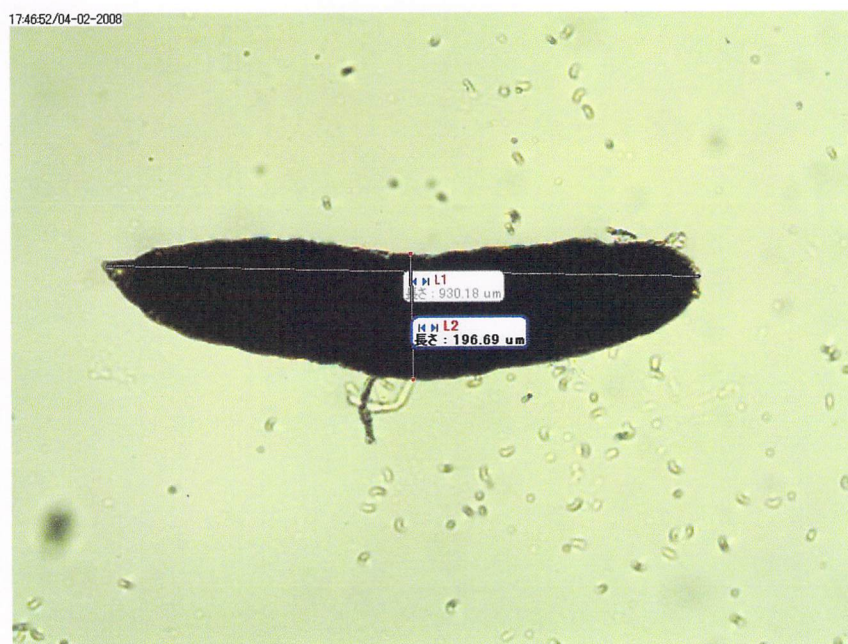


図1-2. 筋肉内より取り出したサルコシスト
長軸と短軸を計測した。一部ブラディゾイトが漏出している。

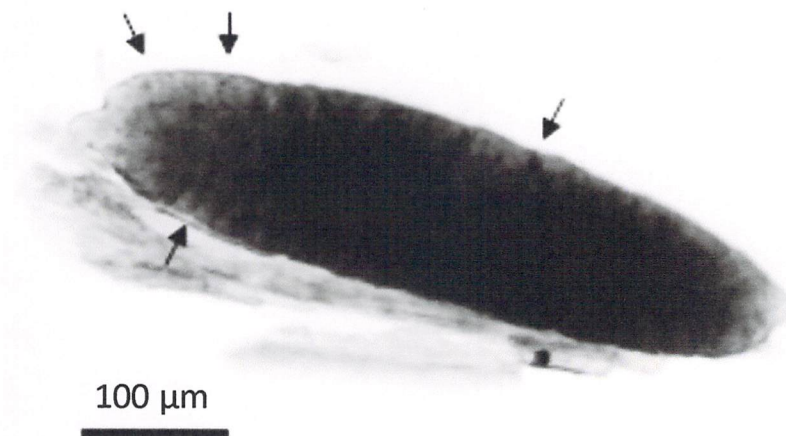


図1-3. サルコシストの内部構造

サルコシストの内部が隔壁（矢印）で仕切られた様子が確認できる。

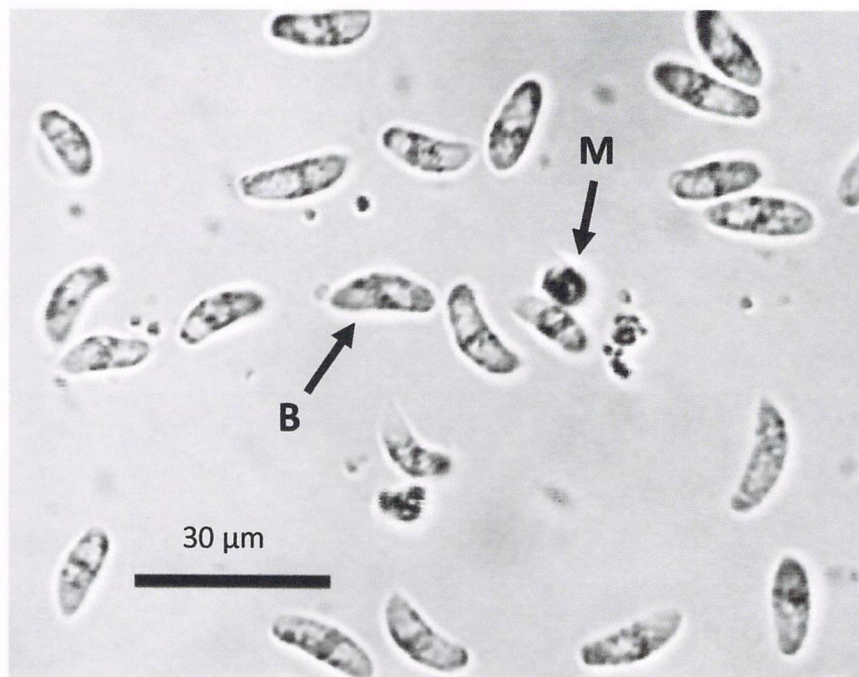


図1-4. サルコシストから漏出させたブラディゾイト (B) およびメトロサイト (M)

表 1-1. 兵庫県のホンシユウジカにおけるサルコシストの年齢・寄生部位別検出数

年齢	検査 頭数	寄生部位				
		心筋 ^x	横隔膜 筋膜 ^x	背最長筋 ^y	大腿 二頭筋 ^x	いずれか の部位
1 歳未満 ^a	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1 歳 ^b	7	4 (57.1)	3 (42.9)	4 (57.1)	3 (42.9)	7 (100)
2 歳 ^b	13	8 (61.5)	11 (84.6)	6 (46.2)	9 (69.2)	12 (92.3)
3 歳 ^b	9	5 (55.6)	6 (66.7)	4 (44.4)	7 (77.8)	8 (88.9)
4 歳 ^b	15	11 (73.3)	9 (60.0)	7 (46.7)	7 (46.7)	12 (80.0)
5 歳 ^b	14	10 (71.4)	9 (64.3)	4 (28.6)	10 (71.4)	13 (92.9)
合計	64	38 (59.4)	38 (59.4)	25 (39.1)	36 (56.3)	52 (81.3)

・括弧内の数字は検査頭数の中での検出率 (%) .

・年齢および寄生部位の後に示した上付き文字は、同じ文字のとき平均値がフィッシャーの直接確率検定により解析した.

表 1-2 兵庫県の本シウジカの各個体における寄生部位別の
筋肉 10 g あたりのサルコシスト数

No.	年齢	性別	寄生部位			
			心筋	横隔膜筋膜	背最長筋	大腿二頭筋
1	1 歳未満	♂	0	0	0	0
2	1 歳未満	♂	0	0	0	0
3	1 歳未満	♂	0	0	0	0
4	1 歳未満	♀	0	0	0	0
5	1 歳未満	♀	0	0	0	0
6	1 歳未満	♂	0	0	0	0
7	1 歳	♂	2	0	1	0
8	1 歳	♂	182	0	0	0
9	1 歳	♂	2	8	0	1
10	1 歳	♂	0	0	8	0
11	1 歳	♀	378	88	22	21
12	1 歳	♀	0	12	22	0
13	1 歳	♀	0	0	0	3
14	2 歳	♀	281	12	32	12
15	2 歳	♀	795	7	0	13
16	2 歳	♂	0	32	0	4
17	2 歳	♀	9	15	0	205
18	2 歳	♂	918	26	27	44
19	2 歳	♂	345	27	3	13
20	2 歳	♂	469	8	9	32
21	2 歳	♂	0	2	0	1
22	2 歳	♀	0	1	0	0
23	2 歳	♀	0	4	2	12
24	2 歳	♂	0	0	0	0
25	2 歳	♂	5	5	0	0
26	2 歳	♂	20	0	8	0
27	3 歳	♀	0	3	0	11
28	3 歳	♂	5	3	7	6
29	3 歳	♂	3	4	13	38
30	3 歳	♀	0	0	0	0

31	3 歳	♀	0	0	0	3
32	3 歳	♀	130	25	5	41
33	3 歳	♂	0	4	0	17
34	3 歳	♂	3	0	6	0
35	3 歳	♀	276	8	0	48
36	4 歳	♀	208	11	0	0
37	4 歳	♂	0	0	0	0
38	4 歳	♂	24	0	0	0
39	4 歳	♂	0	0	0	0
40	4 歳	♀	409	0	7	22
41	4 歳	♂	0	0	0	0
42	4 歳	♀	53	13	0	0
43	4 歳	♀	431	27	336	26
44	4 歳	♀	27	0	0	0
45	4 歳	♀	437	6	4	6
46	4 歳	♀	0	3	0	0
47	4 歳	♀	122	4	13	54
48	4 歳	♀	5	5	6	18
49	4 歳	♀	2,262	32	96	94
50	4 歳	♂	2	8	1	4
51	5 歳	♂	212	11	0	5
52	5 歳	♂	0	4	0	8
53	5 歳	♂	0	0	1	1
54	5 歳	♀	0	5	0	8
55	5 歳	♂	6	0	0	0
56	5 歳	♀	458	9	3	16
57	5 歳	♂	1,048	4	0	5
58	5 歳	♀	12	1	0	8
59	5 歳	♂	72	0	0	4
60	5 歳	♀	65	5	8	11
61	5 歳	♂	411	25	0	5
62	5 歳	♂	0	0	0	0
63	5 歳	♀	211	4	0	0
64	5 歳	♀	31	0	6	0

表 1-2 のつづき

表1-3. 寄生部位別の筋肉10 gあたりのサルコシスト数

年齢	検査頭数	検査部位			
		心筋 ^X	横隔膜筋膜 ^Y	背最長筋 ^Y	大腿二頭筋 ^Y
0	6	0.00 (0-0)	0.00 (0-0)	0.00 (0-0)	0.00 (0-0)
1	7	5.73 (0-378)	2.75 (0-88)	1.09 (0-22)	2.70 (0-21)
2	13	18.01 (0-918)	5.81 (0-32)	6.02 (0-32)	1.89 (0-205)
3	9	4.33 (0-276)	2.57 (0-25)	8.23 (0-13)	1.56 (0-48)
4	15	26.07 (0-2,262)	3.02 (0-32)	3.19 (0-336)	2.64 (0-94)
5	14	26.27 (0-1,048)	2.40 (0-25)	3.05 (0-8)	0.56 (0-16)
合計	64	11.66 (0-2,262)	2.70 (0-88)	3.18 (0-336)	1.44 (0-205)

年齢および寄生部位の後に示した上付き文字は、同じ文字のとき、平均値がフィッシャーの直接確率検定により解析した。

括弧内の数字はサルコシスト数の範囲。

寄生密度：数値を対数変換したのちGeneral linear model procedureおよびTurkey-Kramer testを用いた分散分析により有意差を解析。

第 2 章 兵庫県の本シュウジカからの *Sarcocystis* の形態学的検討

1 緒 言

第 1 章において、兵庫県の山間部に生息する本シュウジカにおける *Sarcocystis* の寄生状況について調査した結果、0 歳の個体を除く、さまざまな年齢の個体に高率にサルコシストの寄生が認められた。寄生状況の確認中、シストのサイズに視点を置いた場合、他の部位に較べて多数の寄生が認められた心筋に於いて、サルコシストの大きさに相当な差異が認められた。これは検体である本シュウジカの雌雄や年齢差に有意差は見られない現象であった。感染機会については日々継続しているものか、偶然かは野生獣のため確認できなかった。終宿主である肉食動物の糞便中に排出されたスポロシストを中間宿主である草食動物が経口的に摂取すると、消化管内でスポロゾイトが遊離し、各種臓器でシゾゴニーを行って多数のメロゾイトが産生される。このメロゾイトが心筋および骨格筋に達して大形のサルコシストを形成する。幼若なサルコシストは、はじめ 1~15 個のメトロサイトのみを有する小形のシストであるが、成熟するにつれてサルコシスト内虫体であるブラディゾイトが増数し、サルコシストは大形化する (Dubey *et al.*, 1989)。このようにサルコシスト形成後、このシストは成長するものとされており (Dubey *et al.*, 1989)、サイズの違いはこれによるものかを解明することも重要なことである。

これまで極めて多くの種の *Sarcocystis* が様々な動物から報告されており (Dubey *et al.*, 1989)、シカ類においてもワピチ (*Cervus canadensis*) に寄生する *S. wapiti*、アカシカ (*Cervus elaphus*) に寄生する *S. sybillensis*、トナカイ (*Rangifer tarandus*) に寄生する *S. grueneri* など 30 種以上の

種が記載されている (Dubey *et al.*, 1989; Dahlgren and Gjerde, 2008, 2009, 2010)。さらにわが国のホンシュウジカからは新井ら (2010) により *S. sybillensis* および *S. wapiti*、さらに Abe *et al.* (2019) により *S. japonica*、*S. cf. tarandi*、*S. matsuoae*、*S. pilosa*、*S. gjerdei*、*S. cf. taeniata*、および *S. ovalis* が報告されている。これらの種と今回認められた *Sarcocystis* 種を比較検討することを目的として、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いたシストの形態学的検討を行った。

2 材料および方法

2-1 材 料

2010 年から 2011 年にかけての冬季から春季の間の狩猟シーズンの際に捕獲されたホンシュウジカの心筋、横隔膜筋、大腿二頭筋、および背最長筋を用いた。これらは現地で解体し部位別に分けられた。サルコシストに関しては寄生率の観察の時点で、同一部位、別部位に関わらず大きさに大きな変異が見られたことから、同一検体から複数部位を寄生率の観察部位と同様に用いた。

冷蔵して持ち帰った検体は、直径 12 cm のガラスシャーレに生理食塩水を入れ、筋検体を薄く切り分けたのち、実体顕微鏡下で斉藤ら (1995) の簡易直接法に準じて観察しながら、筋肉中のサルコシストを有柄針を用いて筋線維に平行して掻き分け、眼科用無鉤ピンセットで 1 個ずつ摘みあげて分離し採取した。シストの形態観察にはスライドグラスに生理食塩液を 1 滴 (約 0.25 mL) 滴下し、そこに摘出したサルコシストを実体顕微鏡で確認しながら静置させた。

2-2 光学顕微鏡による観察

カバーガラスは慎重に被せてもサルコシストの変形が見られたため、生鮮シストをスライドガラスにのせ、生理食塩水を滴下し、先ずはカバーガラスをかけずに 100 倍の光学顕微鏡下で外形と全体像を観察した。続いてカバーガラスをかけて 400 倍で観察した後、内部に含まれるブラディゾイトおよびメトロサイトの観察のために、スライドガラス上のサルコシストを有柄針を用いて破壊したのちカバーガラスをかけて観察した。また、カバーガラスを圧迫してブラディゾイトを放出させて観察することもできた。以上の方法でシストの形態観察と計測を実施した。さらにサルコシスト内部に含まれるブラディゾイトの形態と計測を行った。

また、一部のサルコシストはシストの断面を観察する目的でサルコシストを含むホルマリン固定心筋を蒸留水 (DW) に20分、3回浸漬して脱ホルマリン処理を行ったのち、段階的にエタノールで脱水し(エタノールシリーズ)、パラフィンに包埋した。そしてLEICA 2035型ミクロトームを用いて約4 μm の切片を作製した後、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

2-3 透過型電子顕微鏡による観察

10% (v/v) グルタルアルデヒド液 (0.1M リン酸緩衝液) で固定したサルコシストを含むニホンジカの心筋の小ブロック (約 3 mm³) を DW に 20 分、3 回浸漬して脱グルタルアルデヒドした後、自動包埋装置 (ABC 社 RX-90 型) 内でリンス液 (0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液、4℃) による 10 分、2 回の洗浄、4% (w/v) オスミウム水溶液 (4℃) による 2 時間の再固定を行った。さらにエタノールシリーズで脱水し、n-ブチルグリシジリエーテル (QY-1) を 15 分、2 回揺り動かしながら浸漬し、さらに QY-1 とエポ

キシ樹脂（MNA：EPON812：DDSA＝5：5：12）の等量混合液に一晩浸透させ、エポキシ樹脂に6時間浸漬した。そしてプラスチック包埋板に新鮮なエポキシ樹脂を満たし、試料を入れて60℃の恒温器（SANYO、MIR-262型）で3日間重合させることにより樹脂ブロックを作製し、ウルトラミクロトーム（LEICA EM UC6型）を用いて約0.2 μmの超薄切片を作製した。これを1%（w/v）酢酸ウラニルで20分染色後、蒸留水の入ったビーカー中で20回上下に振ることで水洗し、0.4%（w/v）クエン酸鉛で20分染色後、蒸留水の入ったビーカー中で3回上下に振り水洗したのち乾燥させた。この試料を透過型電子顕微鏡（100CX-11型、日本電子、東京）を用いて、加速電圧200 kVで観察した。

3 結 果

3-1 光学顕微鏡による観察

サルコシスト観察時に得られたサルコシストはいずれの部位におけるものも両端が丸い棍棒状（長円形）を呈し、大きさにはかなりの変異（長さ445.5～1064.3 × 幅99.0～247.5 μm；平均678.6 × 174.2 μm；n=50）が見られた（図2-1）。新鮮な肉片より採取した場合、前部から先端が膨張してくるものがあるので大きさについては少し時間をおいて確認する必要があった。横隔膜や筋膜や筋膜直下部位では細長いシストが見られたが、採取すると糸状に細長状態ではあるがだんだんと長軸が縮んで横幅が太く膨張した。サルコシストは筋肉内の寄生部位によって実体顕微鏡による筋肉内寄生状態と摘出後で形態が違ってくるものが見られた。横隔膜や筋膜などで緊張の掛かっている部位では細長いシストが多いが、摘出すると膨張するシストがある一方、同じ筋肉内寄生部位に存在しているにも拘らず

サルコシストの筋肉内寄生形態に、最初から無理に緊張の掛かっていないものも見られた。サルコシストは筋肉内で筋線維に沿って寄生しているが、筋肉を観察すると細長いシストがU字型に見えたり、横軸が正面を向いていて円形に見えたりした。またここでは一応、サルコシストを形態により3型に分類し、a) 針型 b) 唐辛子型 c) 卵円型、としたが（図2-2）、実体顕微鏡による簡易直接法だけではサルコシストの形態測定は無理があった。

またサルコシスト内部には多数のブラディゾイトおよびメトロサイトが認められた（図2-3）。ブラディゾイトの平均の大きさは長さ $13.6 \pm 2.8 \times$ 幅 $2.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$ （範囲 $8.5 \sim 17.1 \times 2.1 \sim 2.8 \mu\text{m}$ ； $n=10$ ）、メトロサイトは直径 $4.3 \pm 1.2 \mu\text{m}$ （ $2.8 \sim 5.7 \mu\text{m}$ ； $n=10$ ）であった。ブラディゾイトに関しては光学顕微鏡下では形態による差異はみられず、計測値にも明らかな差異は認められなかった。サルコシストが大きくなるにつれて内容物であるブラディゾイトの割合が増してきた。この二つの計測値の相関係数は0.9となり、正の相関が認められた（図2-4）。

一般的なサルコシストに特徴的なシスト壁外側表面の絨毛状突起（villar protrusion）は、光学顕微鏡下では観察されなかった（図 2-5, 2-6）。一方、サルコシスト内部には多数の隔壁が観察された（図 2-6）。この隔壁の数とサルコシストの全長との間に相関関係は認められなかった。

3-2 透過型電子顕微鏡による観察

シスト壁に、光学顕微鏡では見られなかった絨毛状の突起が認められ、それらは鋸歯状を呈し電子密度の高いシスト壁から派生しており、その下に ground substance と呼ばれる電子密度の薄い層が存在した。ground substance はサルコシスト内方にも伸び、隔壁を構成していた。サルコシス

ト壁は厚さ $4.7 \pm 0.9 \text{ nm}$ ($4.0 \sim 6.4 \text{ nm}$; $n=10$) の電子密度の高い薄い膜および、その内側にある電子密度の低い幅 $224.5 \pm 18.7 \text{ nm}$ ($175.0 \sim 240.0 \text{ nm}$; $n=10$) の基底層で構成され、全体の厚さは $229.2 \pm 17.4 \text{ nm}$ ($200.0 \sim 275.0 \text{ nm}$; $n=10$) であった。電子密度の高い膜は鋸歯状に陥没しており、その深さは 16.1 nm ($14.9 \sim 16.6 \text{ nm}$; $n=10$)、幅は $31.8 \pm 1.6 \text{ nm}$ ($29.8 \sim 33.2 \text{ nm}$; $n=10$) であった (図 2-7a)。隔壁の厚さは $112.3 \pm 4.8 \text{ nm}$ ($105.8 \sim 117.6 \text{ nm}$; $n=10$) であった。壁の外側には細いリボン状を呈する絨毛状突起がみられた。絨毛状突起はサルコシスト壁から派生し、サルコシスト壁に平行に走行しており、長さは $1.4 \pm 0.2 \text{ nm}$ ($1.0 \sim 1.8 \text{ nm}$; $n=10$) であった。多くは互いに重なり合い 2~3 層の層状構造を呈していた。太さは基部から先端までほぼ一定で $31.6 \pm 1.6 \text{ nm}$ ($29.9 \sim 33.3 \text{ nm}$; $n=10$) であった。内部には微小管などの構造物は観察されなかった (図 2-7b)。基底層はサルコシスト内部に分枝を延ばし、その分枝は隔壁を構成していた (図 2-8)。

4 考 察

今回観察された心筋におけるサルコシストのサイズと形態に多様性がみられた。この要因については、種の相違によるものか同種に於いて発育状態の差異によるものなどが考えられる。サルコシストは最初にその内側周縁部にメトロサイトを形成し、メトロサイトは内部出芽二分裂を繰り返して多数のブラディゾイトを形成することにより (石井、2007)、サルコシスト内部のブラディゾイト、メトロサイトの比率を調べることで、サルコシストの発育の程度を推測できると考えられる。今回、光学顕微鏡観察下においてサルコシストの全長と、サルコシスト内部に占めるブラディゾイトの割合について

て調べると、両者間に高い正の相関がみられた。このことから今回観察されたサルコシスト間での大きさの多様性は、シストの成長の程度の差異によるものと考えられた。サルコシスト内部に観察された隔壁については、その数とサルコシストの全長との間に相関性が見られなかったことより、サルコシストの成長に伴う隔壁数の増加は無いものと思われた。

光学顕微鏡による形態の多様性については、その外観より細長く両端が先鋭なものを針型、幅は一定で一端が丸いものを唐辛子型、丸みを帯び両端が丸いものを卵円型と 3 つの型にここでは仮に分類した。これについての妥当性は次章の遺伝子検索の結果にゆだねることとした。

既知の *Sarcocystis* 種と比較するにあたり、中間宿主をシカ類とするものとの比較に限定した。これは *Sarcocystis* 種の中間宿主の特異性は一般に厳密であるとされていることによる (Dubey *et al.*, 1989)。 *Sarcocystis* 種の形態学的分類には、シストの壁構造の比較が有用とされて、特に一般的なサルコシストの壁から外側に派生する絨毛状突起の形態比較が有用である (Dubey *et al.*, 1989) ため、異種間のサルコシストの形態学的差異の比較にはこれを利用した。 *Sarcocystis* 種のうちでシカ類を中間宿主とする既知種と今回の種と類似した絨毛状突起をもつものとして *S. alceslatrans* (Dubey, 1980)、 *S. rangi* (Gjerde, 1984c, 1985a)、 *S. grueneri* (Gjerde, 1985c)、 *S. cervicanis* (Dubey *et al.*, 1989)、 *S. wapiti* (Speer and Dubey, 1982) が挙げられる。これら 5 種との差異を調べるためにサルコシスト壁の構造を比較した (表 2-1)。サルコシスト壁の構造では、 *S. alceslatrans* については、サルコシストが本研究種に比べ著しく大きく、今回の観察ではこのように肉眼で明らかに確認できるような大きさのサルコシストは認められなかったため、これが発育による差異であるとは考えにくく、また絨毛状突起の幅が本研究種に比べ小さかった。 *S. rangi* については、 *S.*

alceslatrans と同様にサルコシストが本研究種のものに比べ著しく大形で壁が厚く、絨毛状突起の幅が大きいことに加えて、本研究種にみられない絨毛状突起内部の空隙がみられた点で本研究種とは異なっていた。*S. grueneri* については、サルコシスト壁が著しく薄く、絨毛状突起内部に空隙がみられ、*S. cervicanis* については、サルコシスト壁が厚く、絨毛状突起の幅が大きい点が異なっていた。*S. wapiti* は、本研究種と最も類似していたが、サルコシスト壁が薄い点で相違がみられた。

このように形態学的観察からのみでは本研究種の分類学的位置の決定は困難であるが、比較したいずれの種とも異なる未記載種であると考えられた。次章以降では遺伝子による分類および感染実験によるプレパテントピリオドの決定などを行うことで、総合的に本研究種の分類学的位置を決定する必要性が示唆された。

5 小 括

兵庫県のホンシュウジカの *Sarcocystis* 種の寄生状況を調べるために筋肉中のサルコシストを確認したところ、そのサイズや形態に差異が見られた。そこでサルコシストの形態を調べるために光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて形態学的特徴を調べた。サルコシストとブラディゾイトの総数の関連性を求めた結果、サルコシストの大きさとブラディゾイトの数については正の相関がみられ、サルコシストのサイズの違いは発育程度によるものであることが示唆された。サルコシストの形態学的検討では、シストの壁構造の比較が有用とされており、異種間のサルコシストの形態学的差異の比較についてはシスト壁の外側に見られる絨毛状突起の形態比較が有用であることからこれを利用し、世界各地で報告されているシカ寄生種のなかではトナカイ

(*Rangifer tarandus*) およびアカシカ (*Cervus elaphus*) でみられる *S. grueneri* に今回検出されたサルコシストが最も類似していたが、検討したいずれの種とも異なった未記載種である可能性を示唆するものであった。

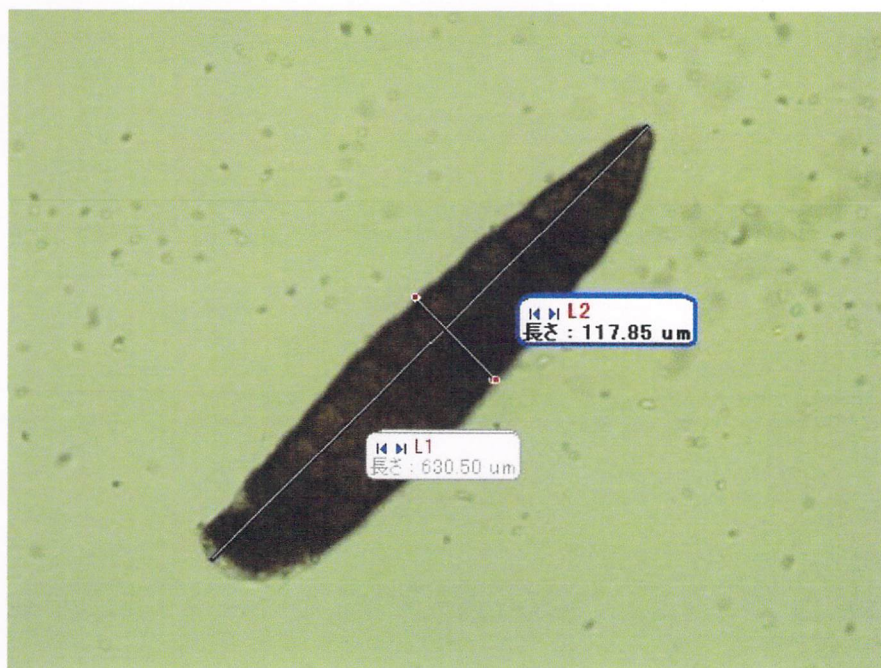


図2-1. 心筋組織から単離したサルコシスト

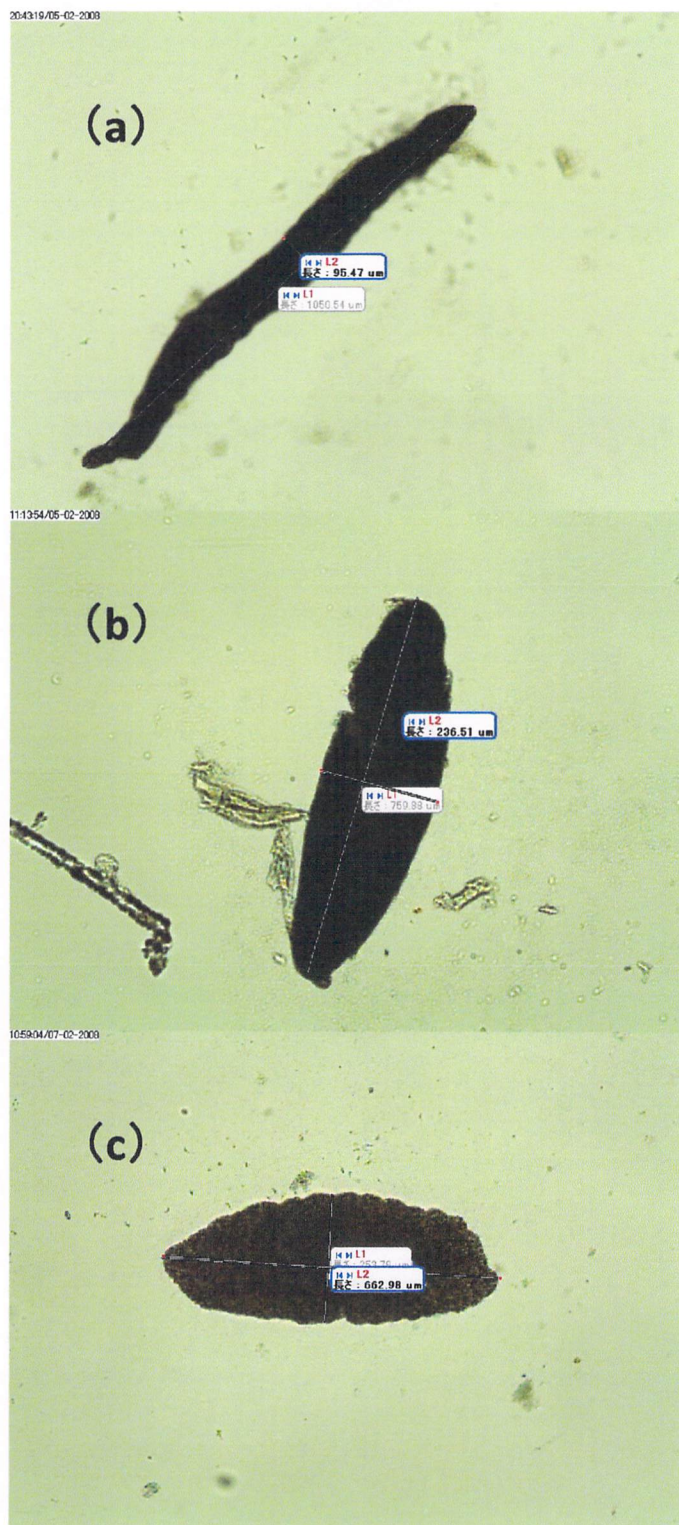


図2-2. 兵庫県の本ンシュウジカからのサルコシスト
(a) 針型、(b) 唐辛子型、(c) 卵円型

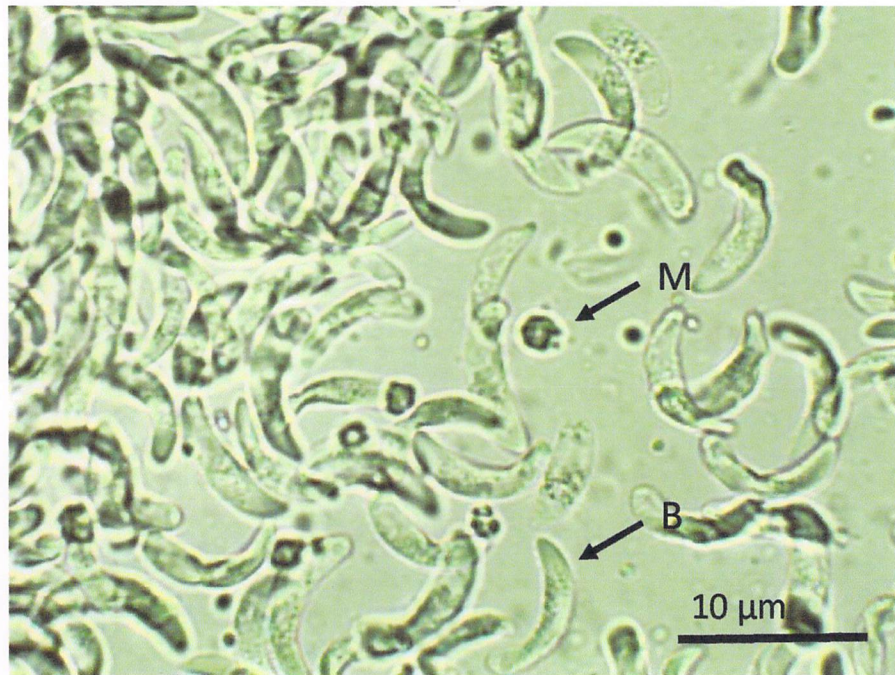


図2-3. サルコシストの内容物
ブラディゾイト (B) 、メトロサイト (M)

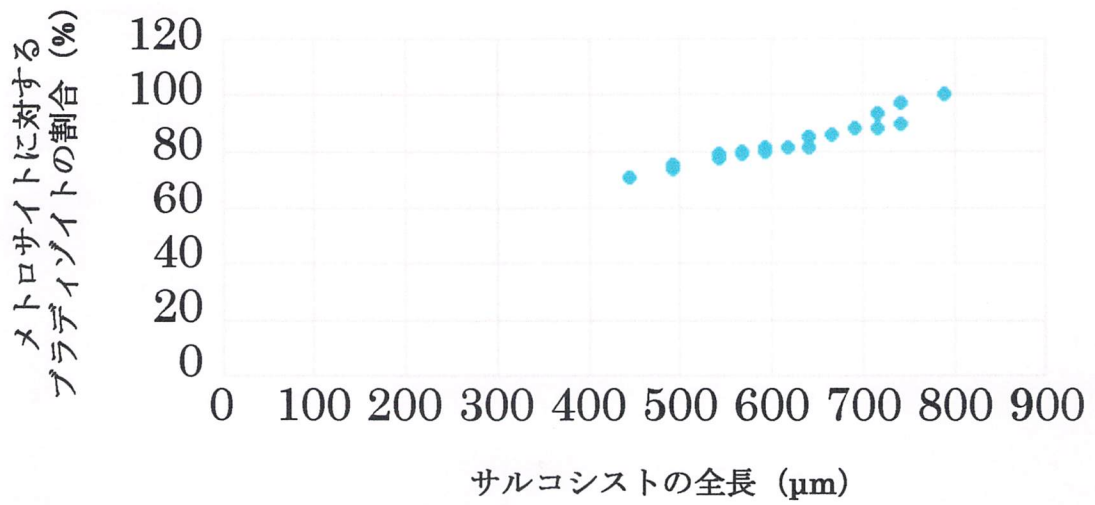


図2-4. サルコシストの大きさと内容物中のブラディゾイトの割合の相関関係
相関係数 : 0.9

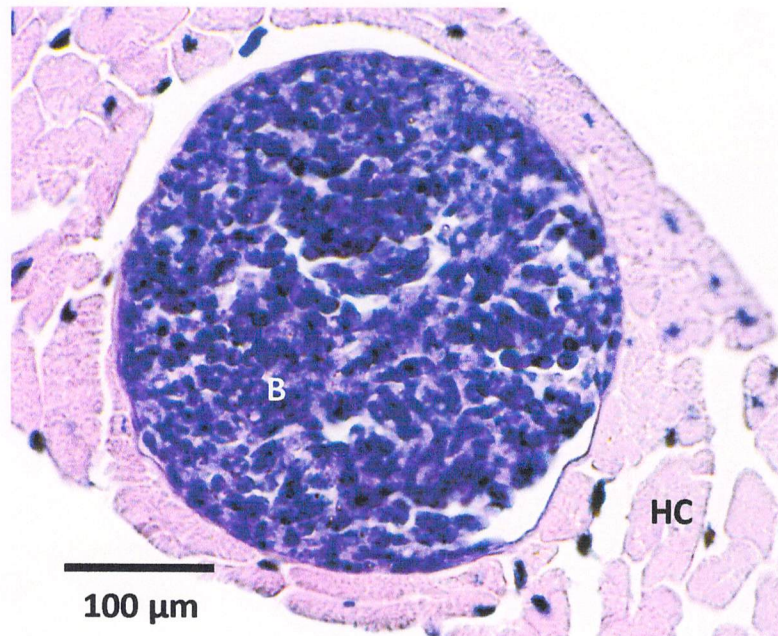


図2-5. サルコシストの横断面 (H&E染色)
HC : 宿主細胞、B : ブラディゾイト

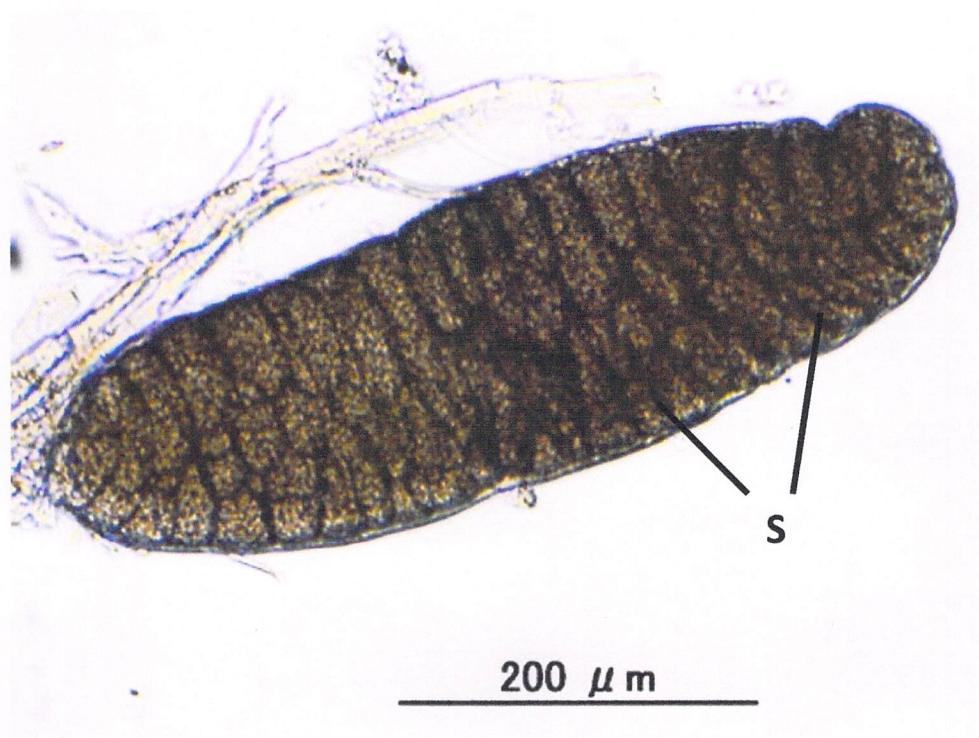


図2-6. 心筋組織から単離したサルコシストの全景
隔壁 (S) が観察される.

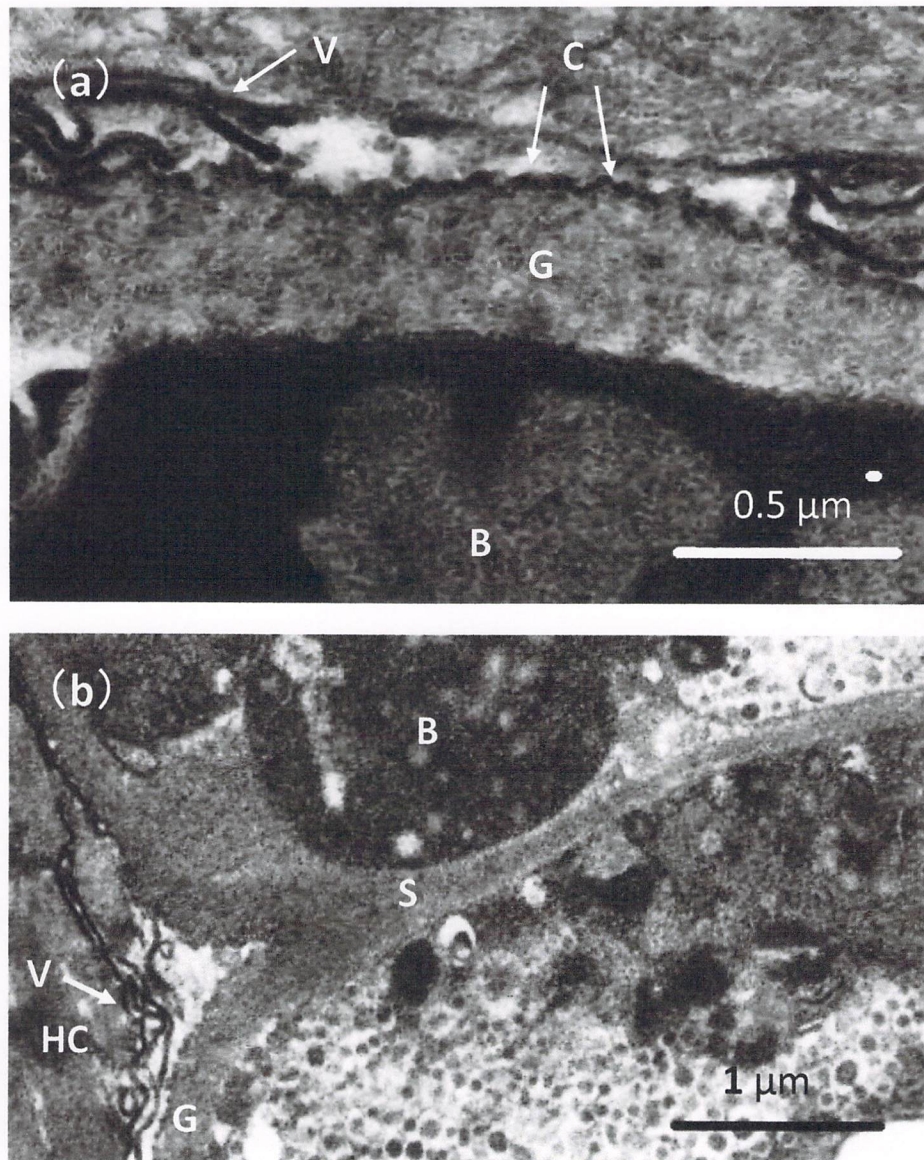


図2-7. サルコシスト壁の透過型電子顕微鏡像

- (a) サルコシスト壁の微細構造
サルコシスト壁は鋸歯構造 (C)、基底層 (G)、絨毛状突起 (V) から構成される。絨毛状突起内に微小管などの構造物はみられない。
B: フラディゾイト、HC: 宿主細胞
- (b) サルコシストの隔壁部
隔壁 (S) はサルコシスト壁の基底層 (G) の連絡として存在し、隔壁が内部に伸展する部位は窪んでいる。
B: ブラディゾイト、HC: 宿主細胞、V: 絨毛状突起

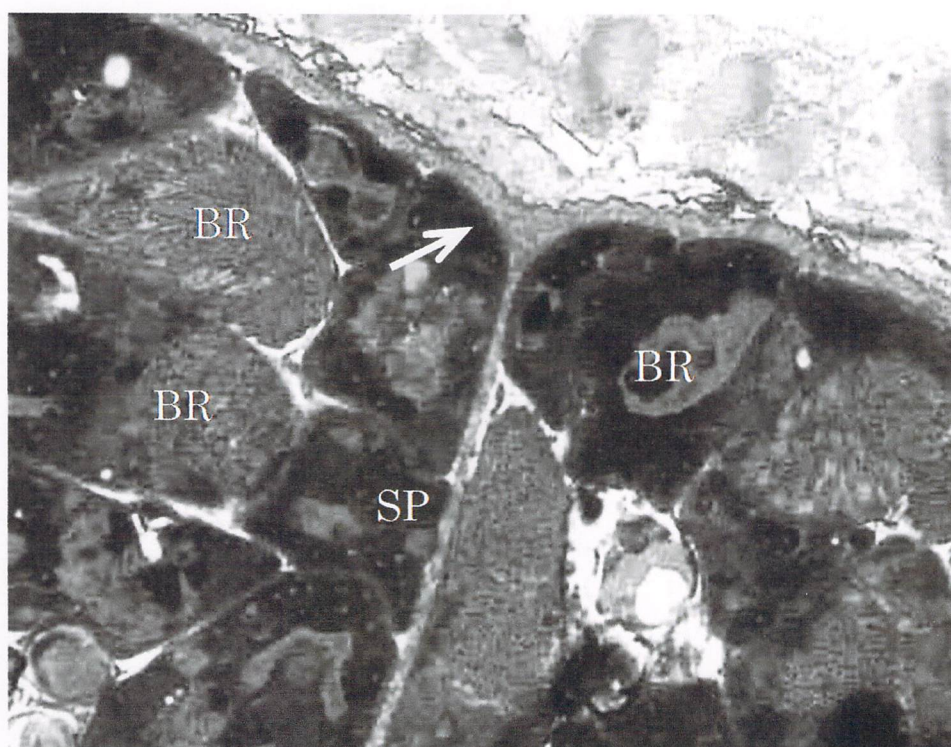


図2-8. サルコシスト内にみられる隔壁

基底層がサルコシスト内部に分枝をのばして隔壁を構成する（矢印）．
BR：ブラディゾイト、SP：セプタ（隔壁）

表2-1 本研究種と類似した構造の絨毛状突起をもつ既知の *Sarcocystis* 種との形態学的比較

種	本研究種	<i>S. alceslatrans</i>	<i>S. rangi</i>	<i>S. grueneri</i>	<i>S. cervicanis</i>	<i>S. wapiti</i>
サルコシストの大きさ(μm)	445.5 - 1,064.3	7,000	8,990	580	150 - 200	580 - 900
壁の厚さ(μm)	0.2	<1.0	0.3 - 0.6	0.04 - 0.06	0.5	0.04
隔壁の厚さ(μm)	0.1	不明	0.02 - 0.03	0.01 - 0.03	0.5 (0.2 - 0.8)	不明
突起の幅(μm)	0.03	0.01	0.5	0.03 - 0.04	0.05	0.04
突起中の空隙	なし	なし	あり	あり	なし	なし
ブラディゾイトの大きさ(μm)	13.6	10 - 13	12 - 17	14 - 17	14 - 18	14 - 18
中間宿主	ホンシユウジカ	アメリカヘラジカ	トナカイ	トナカイ	アカシカ	ワピチ
終宿主		イヌ科動物	イヌ科動物	イヌ科動物	イヌ科動物	イヌ科動物
プレパテントピリオド(日)		10 - 14	11	11 - 17	11 - 12	10 - 12
参考文献	本研究	①	②	③	④	⑤

- ① Dubey, J. P. 1980.
 ② Gjerde, B. 1984c.
 ③ Gjerde, B. 1985c.
 ④ Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. 1989.
 ⑤ Speer, C. A. and Dubey, J. P. 1982

第 3 章 兵庫県の本シュウジカ由来 *Sarcocystis* の分子分類学的検討

1 緒 言

真核生物の比較によく用いられているものに細胞の核遺伝子である *Small subunit (18S) ribosomal RNA* をコードする *DNA* の塩基配列 (*18S rDNA*)、さらにリボソーム *RNA* 遺伝子のスペーサー領域である ITS-1 (18S と 5.8S の間) および ITS-2 (5.8S と 26S の間) などがある。また一方、*Sarcocystis* 属原虫ではミトコンドリア・チトクローム C 酸化酵素サブユニット I 遺伝子 (*cox1*) による遺伝子のデータベースが蓄積され、分類に応用されている。種の比較には変異の多い ITS 領域の比較が望まれるが、シカを含む各種動物に寄生するサルコシスティスについてこれまでに得られている遺伝子情報のほとんどが *cox1* および *18S rDNA* 遺伝子であり、その分類には主に *cox1* 遺伝子配列が用いられている。

第 2 章に於いて兵庫県の本シュウジカ筋肉中の *Sarcocystis* のサルコシストの大きさの差については、サルコシストの発育の差であることが形態学的検討で示唆され、またシカから分離された既報告種とは形態学的に異なることも示唆された。日本の本シュウジカに寄生する *Sarcocystis* には、サルコシストの形態あるいは遺伝子型に基づいて *S. sybillensis*, *S. wapiti* (新井ら, 2010)、および *S. cf. tarandi*, *S. pilosa*, *S. cf. taeniata*, *S. ovalis*, *S. japonica*, *S. matsuoae*, および *S. gjerdei* が報告されている (Abe *et al.*, 2019 ; Dahkgren and Gjerde, 2007, 2008)。一方、兵庫県の生息している本シュウジカ由来 *Sarcocystis* については形態学的検討を行った 2010～2011 年に採取したサルコシストについては *18S rDNA* 遺伝子の解析を行ったのみで種の同定までは行わなかった。そのため 2019 年に再度兵庫県の同地区の本シュウジカ 11 頭から *Sarcocystis* のサルコシストを採取し、

2010～2011 年に採取したものと比較し、さらにその種同定を行うべき研究を継続し、遺伝子解析に *cox1* 遺伝子を用いて分類学的位置を検討することとした。

2 材料および方法

2-1 実験 1 (*18S rDNA* の決定)

2-1-1 材 料

2010 年 2 月～2011 年 3 月に兵庫県宍粟市福知で捕獲されたホンシュウジカの心筋より無差別に実体顕微鏡を用いて生理食塩水中でサルコシストを分離し、光学顕微鏡下で形態を観察後に第 2 章で記載したように 3 形態に分類した。そして遺伝子解析のために 100%エタノールで固定後、 -20°C で試験時まで保管した。分離したサルコシストは実体顕微鏡を用いて、光学顕微鏡による形態学的に細長く両端が先鋭な針型のもの 2 個を H18、H114、幅は一定で一端が丸い唐辛子型のもの 3 個を T25、T97、T120、丸みを帯び両端が丸い卵円型のもの 1 個を R119 として実験に供した (図 2-2)。

2-1-2 DNA 抽出と PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)

まず形態と遺伝子型との関係の研究では、サルコシストからの DNA の抽出は UltraClean Tissue & Cells DNA Isolation Kit (MO BIO, Bath, UK) を用いてマニュアルに従って、100 %エタノール固定サルコシストから DNA を抽出した。

目的となる *18S rDNA* を増幅する目的で PCR には *Ex Taq* DNA Polymerase (タカラバイオ、滋賀、日本) 使用した。Fischer and Odening (1998) を参考にしたプライマーは、フォワードプライマーはウシ由来のサルコシストの遺伝子解析で用いられた *18SrDNA* 49-70 bp の領域の塩基

配列を基に設定し、リバープライマーは、*S. hjorti* (Dahlgren and Gjerde, 2010a)、*S. ovalis* (Dahlgren and Gjerde, 2008)、*S. hardangeri* (Gjerde, 1984b) の *18S rDNA* の塩基配列に共通である 1,807-1,834 bp の領域を基に設計した。フォワードプライマー (F) は 5'-CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG C-3'、リバープライマー (R) は 5'-GTG TTA AGG TTC ACA AAA CTT TCC ATT C-3'である。PCR を行った反応液の組成は *Ex taq* 0.125 μ L、10 \times *Ex taq* buffer 2.5 μ L、dNTP mixture (2.5 mM each) 2 μ L、各プライマー0.2 μ M、鋳型 DNA 1 μ L (250 ng)、および核酸フリーDW で 25 μ L とした。PCR による増幅反応は 95 $^{\circ}$ C で 5 分間の前変性処理の後、57 $^{\circ}$ C で 30 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長反応の 2 ステップの反応を 35 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分間の後伸長反応を行い、これら全ての行程はサーマルサイクラー (TP240 ; タカラバイオ) を用いて行った。

2-1-3 クローニング

PCR にて増幅した PCR 産物(遺伝子断片)は pT7 Blue-T vector (Novagen, Germany) へ T4 DNA Ligase (タカラバイオ) を用いたライゲーションを行うことでクローニングを行った。その後、大腸菌 INV α F' のコンピテントセルへトランスフォーメーションを行い、50 μ g/mL アンピシリンおよび X-gal を含んだ 2 \times YT 寒天培地上に白色コロニーを発育させた。最終的にコロニーを移植した液体培地にて培養後、Barmboim and Doly の方法 (1979) によってプラスミド抽出を行い、シーケンスに供した。

2-1-4 シーケンス解析

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 東京) によりシーケンス反応を行い、マルチキャピラリーDNA シーケンサ (Genetic Analyzer PRISM 3100 ; ABI, USA) を用いてシーケンスを行った。得られた配列は、BLAST (Altschul *et al.*, 1997) により既知の配

列との相同性検索を行った。

シーケンスに用いたプライマーは、F1、R1 として、サブクローニングサンプル用のプライマー M13 Forward、T7（グライナー ジャパン、東京）を用いた。また、F3、R2 は、ウシ由来のサルコシストの遺伝子解析で用いられた *18S rDNA* の 1,031-1,052 bp、659-683 bp の領域の塩基配列 (Fischer and Odening, 1998) を基に、F4 はウシおよびスイギュウ由来のサルコシストの遺伝子解析で用いられた同遺伝子の 1,530-1,551 bp の領域の塩基配列 (Yang *et al.*, 2001) を基に設定した。さらに、F2、R3 は、*S. fusiformis* (Holmdahl *et al.*, 1994)、*S. suihominis* (Yang *et al.*, 2001)、*S. hominis* (Fischer and Odening, 1998) の *18S rDNA* 塩基配列に共通である 468-480 bp、1,014-1,033 bp、1,014-1,033 bp の領域を基に、R4 は、*S. hjorti* (Dahlgren and Gjerde, 2010a)、*S. ovalis* (Dahlgren and Gjerde, 2008)、*S. hardangeri* (Gjerde, 1984b) の塩基配列に共通である 1,485-1,504 bp の領域を基に設計した。プライマーの配列は F1 : 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3' (M13 Forward primer)、F2 : 5'-GCC GCG GTA ATT CCA GCT CCA A-3'、F3 : 5'-TTG TTA AAG ACG AAC TAC TGC G-3'、F4 : 5'-GTC TAA CGC AAG GAA GTT TG-3'、R1 (T7 Primer) : 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'、R2 : 5'-TTC TAG TGA TTG GAA TGA TGG GAA T-3'、R3 : 5'-CAT AAG GTG CAG GAG AAG TC-3'、R4 : 5'-ACC TGT TAT TGC CTC AAA CTT C-3'である。

2-2 実験 2 (*cox1* および *18S rDNA* の決定)

2-2-1 材 料

今回検出されたサルコシストの分類学上の位置を特定するために 2019 年 2 月～3 月の間に実験 1 と同地区である兵庫県宍粟市福知のホンシュウジカ 11 頭から同様に心筋よりサルコシストを採取し、100%エタノールに

浸漬後、 -20°C にて試験時まで保存した。

2-2-2 DNA 抽出と PCR

DNA 抽出は 100%エタノール固定サルコシストから QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてマニュアルに従って行った。

目的とする *cox1* 遺伝子および *18S rDNA* 領域をコードする遺伝子増幅は PrimeSTAR Max DNA Polymerase (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いた PCR によって行った。供試したプライマーは *cox1* ではフォワードプライマー-SF1 : 5'-ATG GCG TAC AAC AAT CAT AAA GAA-3' (SF1; Gjerde, 2013) およびリバースプライマー-SR9 : 5'-ATA TCC ATA CCR CCA TTG CCC AT-3' (SR9; Gjerde, 2014b) である。一方 *18S rDNA* を標的とした場合のフォワードプライマーは AF : 5'-GCT TGC ATG CCT GCA G CT GGT TGA TCC TGC CAG TAG-3'、CF : 5'-GCT TGC ATG CCT GCA GTT TAA CTG TCA GAG GTG AAA TCT T-3'、リバースプライマーは BR : 5'-GAC GGC CAG TGAATT CGG CAA ATG CTT TCG CAG TAG-3'、DR : 5'-GAC GGC CAG TGAATT CGC AGG TTC ACC TAC GGAA A-3'で、AF-BR および CF-DR の組み合わせで使用した。

PCR は各プライマー $0.2\ \mu\text{M}$ 、 $12.5\ \mu\text{L}$ の PrimeSTAR Max Premix ($\times 2$)、 $0.1\ \mu\text{g}$ の鋳型 DNA、および核酸フリーDW の計 $25\ \mu\text{L}$ で構成されていた。PCR による増幅反応は 98°C で 5 分間の前変性処理の後、 98°C で 10 秒間の熱変性、 55°C で 15 秒間のアニーリング、 72°C で 5 秒間の伸張反応の 3 ステップの反応を 35 回繰り返し、最後に 72°C で 5 分間の後伸長反応を行い、これら全ての行程はサーマルサイクラー (TP240 ; タカラバイオ) を用いて行った。

2-2-3 クローニング

PCR にて増幅した *18S rDNA* 用の PCR 産物 (遺伝子断片) は *EcoRI* お

よび *Pst*I で制限酵素処理した pMD20 vector (タカラバイオ) へ Infusion HD cloning kit (Clontech Lab. Inc., CA, USA) を用いたライゲーションを行うことでクローニングを行った。その後、大腸菌 INV α F' のコンピテントセルへトランスフォーメーションを行い、50 μ g/mL アンピシリンおよび X-gal を含んだ 2 \times YT 寒天培地上に白色コロニーを発育させた。最終的にコロニーを移植した液体培地にて培養後、Barmboim and Doly 方法 (1979) にてプラスミド抽出を行い、さらにカラムを用いて精製を行いシーケンスに供した。

2-2-4 塩基配列の決定

cox1 遺伝子を標的とした PCR によって増幅して得られた遺伝子断片は FastGene Gel/PCR Extraction Kit (ニッポンジェネティクス、東京、日本) のマニュアルに従って精製を行った。遺伝子の濃度は分光光度計 Ultrospec 3000 Pro (Amersham pharmacia biotech, England, U.K.) を用いて行った。精製 PCR 産物はシーケンスサービス (ユーロフィンジェノミクス、東京、日本) へ送付し、上記の SF1 および SR9 プライマーを用いてサイクルシーケンス反応試薬 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) でシーケンス反応 (ダイレクトシーケンス) を行った後、3730xl DNA アナライザー (Thermo Fisher Scientific) でシーケンス解析を行った。

また *18S rDNA* のクローニングした遺伝子については pMD20 上の M13 Primer M4 : 5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' および M13 Primer RV : 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' を用いて、上記同様にシーケンスサービス (ユーロフィンジェノミクス、東京、日本) へ送付し、シーケンスを行った。

2-3 系統学的解析

シーケンスにより得られたシーケンスデータは塩基配列解析ソフトである GENETIX ver. 13 (ジェネティクス, 東京, 日本)でシーケンスを確認した。系統樹作成にあたり、比較可能な *Sarcocystis* および外群として *Toxoplasma* の *18S rDNA* 配列を NCBI/Nucleotide データベースより抽出した。アライメントには MEGA5 および 10 (Tamura *et al.*, 2011; 以下 MEGA) に組み込まれている Cluster W (Thompson *et al.*, 1994) を用い、1,325bp を比較対象として、近隣接合法 (NJ 法) および最小進化法により系統樹を作成した。信頼性指数値はブートストラップを 1,000 回繰り返して検出した (Felsenstein, 1985)。

3 結 果

3-1 実験1におけるシーケンス解析

実験1ではホンシュウジカからのサルコシストの形態の異なる3パターン6つのサルコシスト (H18, H114, T25, T97, T120, R119) の *18S rDNA* の遺伝子を解析した。その結果、H18から1,810 bp、H114から1,808 bp、T25から1,806 bp、T97から1,785 bp、T120から1,811 bp、R119から1,787bpの *18S rDNA* の塩基配列が得られた。塩基配列の比較により98.9~99.9%と高い相同性が得られたことから同一のサルコシストと判断し、H18から得られた1,810 bpの配列を標準配列 *Sarcocystis* sp. T18としGenBankに登録した (AB698065)。

3-2 実験2におけるシーケンス解析

18S rDNA の塩基配列は1,895~1,904 bpであった。そして実験1におけるT18との相同性は99.1~99.8%であり、T18と実験2で検討した *Sarcocystis* は同種であると考えられ、兵庫県宍粟市福知におけるホンシュウジカの分布

には変化がないことが明らかとなった（図3-1）。この結果を基に、次に兵庫県からのホンシュウジカ由来*Sarcocystis* の分類学的位置を*cox1*遺伝子を用いて検討することとした。

解析に供した62個の単一サルコシスト由来*cox1* 遺伝子はプライマー部分を除いて全て1,038 bpであった。62解析の中では1-2タイプが47 (75.8%)、2-2タイプが7 (11.3%)、3-2タイプおよび11-2タイプがそれぞれ2 (3.2%)、その他1-3タイプ、1-7タイプ、3-3タイプおよび5-5タイプがそれぞれ1 (1.6%) ずつであった。これらの62個のサルコシスト由来の*cox1*遺伝子の種内のホモロジーは99.7～100%であった。

一方、*cox1* 遺伝子のデータベースより検索した*Sarcocystis* 内の近隣の相同性を有したものは*S. taeniata*、*S. linearis*、*S. cervicanis*、*S. morae* の4種であった。今回検討した*Sarcocystis* と近隣の4種との相同性では、平均相同性では今回の*Sarcocystis* 対*S. taeniata* は0.87、対*S. linearis* は0.86、対*S. cervicanis* では0.95、そして対*S. morae* は0.89であり、遺伝子型からは*S. cervicanis* と最も近縁であることを示していた（表3-1）。

さらに表3-1は近縁な*Sarcocystis* の種内および種間の平均相同性を示した。この表から種内の相同性は0.98～0.99であり、種間の相同性は0.86～0.96であることを示していた。またこの表から本種と*S. cervicanis* の平均相同性は0.95であり、*S. taeniata* と*S. linearis* の相同性0.96よりも低いもので、おそらく本種は単一の未記載種である可能性を示していた。

図3-2にはシカ由来の*Sarcocystis* の系統樹を示した。本系統樹から本研究種の*cox 1* 遺伝子は*S. cervicanis* のそれとはかなり近縁な関係性を示していたが、完全に分岐したクレードに位置することが示された。

4 考 察

兵庫県中部山岳地帯で捕獲されたホンシュウジカの心筋からサルコシスティスのシストが分離された。シストの形態から第2章に示した唐辛子型、針型、および卵円型の形状の区分があった。それぞれの型について *18S rDNA* 塩基配列の相同性はいずれの型の間でも 98.9%以上の高い相同性を示した。この結果から、3 タイプの *Sarcocystis* はいずれも分子分類学的に同種であると判断した。サルコシストの形態学的差異は、同種においても、シストの発達の程度や感染部位によりさまざまであるという報告 (Dubey *et al.*, 1989) もあることから、この地区で得られるシストの形態学的差異も既報のシストの発達程度の差や寄生部位による要因で生じたものと考えられた。

一方、兵庫県宍粟市福知で 2010 年 2 月～2011 年 3 月に捕獲されたホンシュウジカからのサルコシストと 2019 年 2～3 月に捕獲されたホンシュウジカからのサルコシストは現時点では *18S rDNA* 遺伝子の塩基配列から同種ということが判明し、この地区のホンシュウジカはかなり狭い範囲で行動していることが想像された。

Sarcocystis の分類には *cox1* 遺伝子が多く用いられており、2019年2～3月に採取された *Sarcocystis* についてその分類学的位置関係の検討をその *cox1* 遺伝子を用いて行った。今回解析に供した62個の単一サルコシスト由来 *cox1* 遺伝子はプライマー部分を除いて全て1,038 bpで、62解析の中では1-2タイプが47 (75.8%)、2-2タイプが7 (11.3%)、3-2タイプおよび11-2タイプがそれぞれ2 (3.2%)、その他1-3タイプ、1-7タイプ、3-3タイプ、5-5タイプがそれぞれ1 (1.6%) ずつであった。これらの62個のサルコシスト由来の *cox1* 遺伝子の種内のホモロジーは99.7～100%であった。

一方、*cox1* 遺伝子のデータベースより検索した *Sarcocystis* のうち近隣の相同性を有したものは *S. taeniata*、*S. linearis*、*S. cervicanis*、および *S. morae* の4種であった。表3-2において各近縁な *Sarcocystis* 属原虫間の平

均相同性を示した。この表から種内の相同性は0.98～0.99で、種間の相同性は0.86～0.96であることを示していた。またこの表から本種と最も近縁である *S. cervicali* の平均相同性は0.95であり、*S. taeniata* と *S. linearis* の相同性0.96よりも低いもので、本研究における *Sarcocystis* 種は単一の未記載種である可能性が示唆された。これらの種のうち遺伝子学的に最も近縁種は *S. cervicanis* であるが、本種は1981年にHernandes-Rodriguez *et al.* がヨーロッパ（スペイン）のアカシカより報告（Hernandes-Rodriguez *et al.*, 1981a, b）している種である。それによるとサルコシストの大きさは150～200 × 40～70 μmで種の形態的特徴として重要なvillar protrusion（vp）はstraw- or ribbon-likeで、そして終宿主は犬でそのプレパテントピリオドは11～12日となっている。一方本研究における *Sarcocystis* 種のサルコシストの大きさは445～1,064 × 99～248 μmで *S. cervicanis* のそれよりも相当大型であった。しかし本種のvpはstuffed ribbon-likeであり類似していた。一方、*S. cervicanis* は長らくその *cox1* および *18S rDNA* の遺伝子配列の検討が行われてこなかったが、2017年にGjerde *et al.* によって遺伝子型の記載がなされた（Gjerde *et al.*, 2017）。そしてその報告から *18S rDNA* 遺伝子でも *cox1* 遺伝子型でも本種と *S. cervicanis* は近縁ではあるが、一定の異なったクレードを形成していることが判明した。

兵庫県からのホンシュウジカ由来の *Sarcocystis* sp. が *S. cervicanis* との相違をさらに明瞭にするために、次章では本種を犬に投与することで感染が成立する（終宿主）か否か、および成立した場合のプレパテントピリオドを調べることにした。

5 小 括

兵庫県に生息するホンシュウジカに寄生する *Sarcocystis* のサルコシス

トは第 2 章における形態学的検討から形の異なる針型、唐辛子型、卵円型の 3 つの型に分けられた。しかしこれら 3 つの型は *18S rDNA* 遺伝子解析から全て同じ種であることが判明した。この *Sarcocystis* の分類学的位置を *18S rDNA* および *cox1* 遺伝子を用いて検討した。その結果、シカ由来 *Sarcocystis* 属原虫の *cox1* 遺伝子による分類からこの *Sarcocystis* sp. はこれまで報告されてきたものとは独立したクレードを形成した。このことから遺伝子解析からは本種はこれまでに報告されていない単一種である可能性を示唆するものであった。

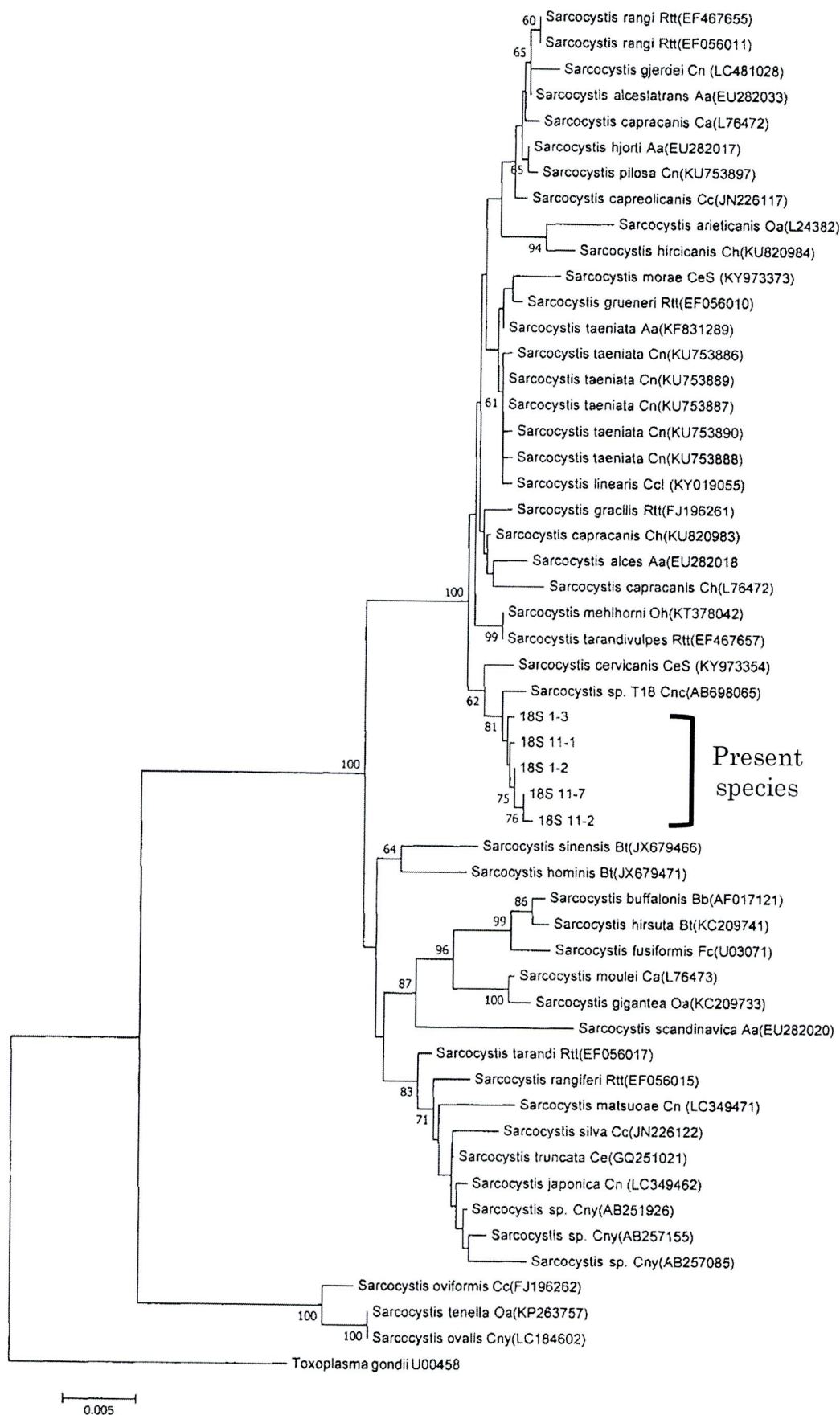


図3-1. 兵庫県のホンシュウジカからの *Sarcocystis* の 18S rDNA を用いた分子系統樹

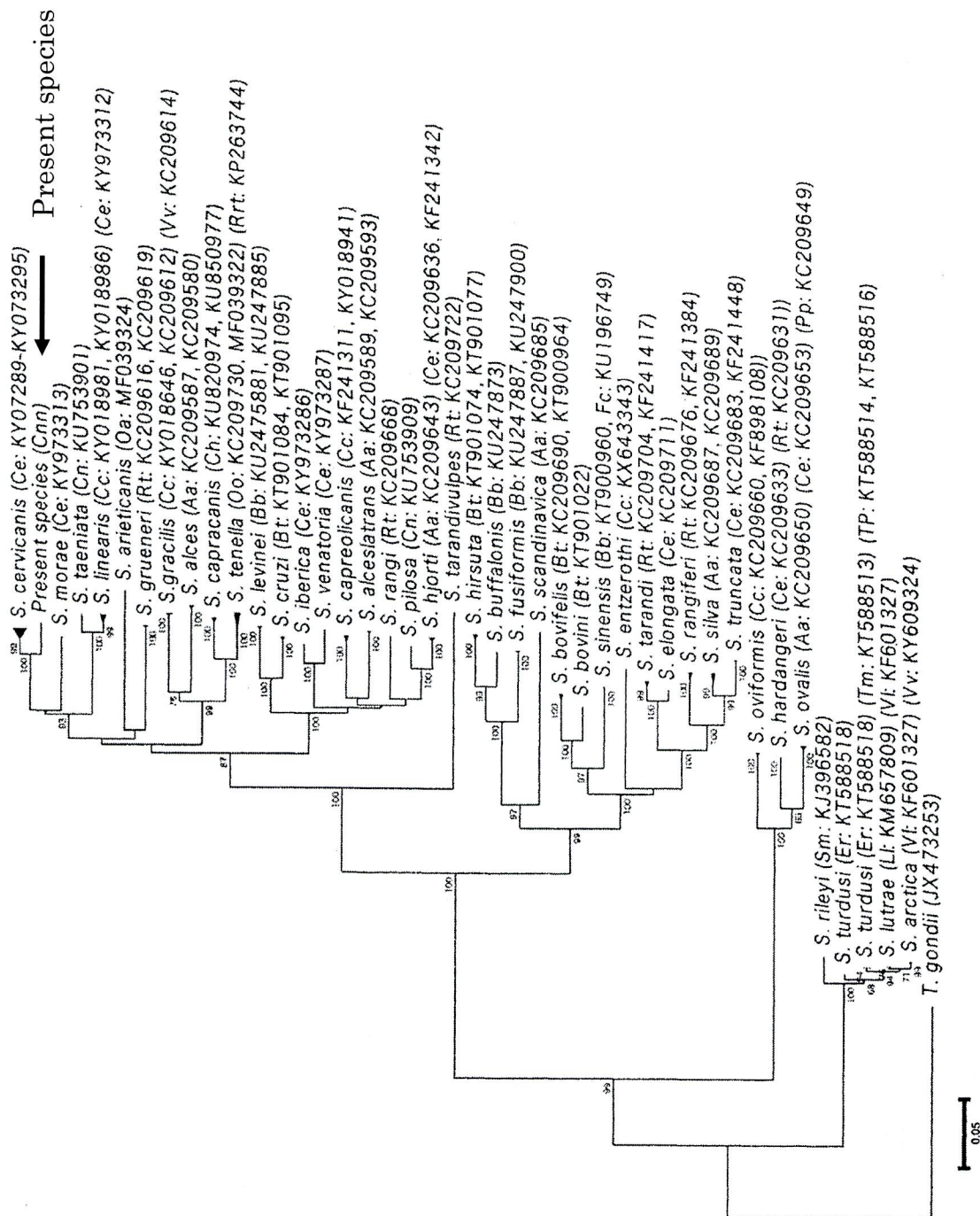


図3-2. 兵庫県からの *Sarcocystis* の *cox1* 遺伝子を用いた分類学的位置 (分子系統樹)

表3-1. 兵庫県のホンシユウジカからの*Sarcocystis* と近縁種の *cox 1* 遺伝子の種内および種間相同性

	<i>S. taeniata</i>	<i>S. linearis</i>	<i>S. cervicanis</i>	<i>S. morae</i>	Present species
<i>S. taeniata</i>	0.98				
<i>S. linearis</i>	0.96	0.99			
<i>S. cervicanis</i>	0.87	0.86	0.99		
<i>S. morae</i>	0.87	0.87	0.90	0.99	
Present species	0.87	0.86	0.95	0.89	0.99

第 4 章 兵庫県の本シュウジカからの *Sarcocystis* のイヌへの感染試験

1 緒 言

形態学的検討の結果、兵庫県産の本シュウジカから認められたサルコシスティスはトナカイ、アカシカから報告されている *Sarcocystis grueneri* に、そして分子分類学的な *cox1* 領域における解析からアカシカからの *S. cervicanin* に最も類似していた。

今回の本種と形態的にもっとも類似していた *S. grueneri* や遺伝学的に類似していた *S. cervicanis* はいずれも、形態学的比較を行ったりボン状もしくはひも状の突起を有する種はいずれもイヌが終宿主であることが報告されている。そこで今回の調査で得られた *Sarcocystis* 種についても、犬が終宿主となり得るか、また感染が成立した場合、プレパテントピリオドがどれほどの長さかについて知るために、サルコシストを含有している本シュウジカの生鮮心筋を犬に摂食させ、感染の有無およびプレパテントピリオド等の感染動態を検証した。

さらにこの感染実験が成功すれば本 *Sarcocystis* 種の終宿主およびプレパテントピリオドを決定することとなり、ひいては生活環を解明することにつながり、*Sarcocystis* に対する衛生対策上非常に有意義なことである。

2 材料および方法

供試犬：5 歳と 11 歳のイヌ 2 頭を実験に供した。

実験施設：実験施設として株式会社食環境衛生研究所（群馬県前橋市）の GLP 適合施設を用いて行った。

方法：2 頭のイヌそれぞれに約 400 g のサルコシスト陽性のシカ肉を摂食

させた。摂食後 4 日目より毎日同一時間帯に糞便を全量採取し、常法通りのシヨ糖遠心浮游法を用いてスポロシストを抽出し（上村ら、2003）、光学顕微鏡の 200 倍での鏡検によりスポロシストの確認を行った。

3 結 果

イヌ 1 からは感染後 6 日目から、イヌ 2 からは感染後 5 日目からスポロシストの排泄が確認できた（表 4-1）。感染後 7 日目にはさらに多数のスポロシストが認められた。検出されたスポロシストは楕円形で、長径 $17.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ($17.0 \sim 20.0 \mu\text{m}$)、短径 $11.5 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ($10.0 \sim 12.5 \mu\text{m}$) であった。シスト内部に 4 個のスポロゾイトと残体を認め、*Sarcocystis* 属原虫特有の排出像を示していた。このことから、本種の終宿主は犬であること、さらにプレパテントピリオドは 5~6 日であることが明らかとなった（図 4-1）。

4 考 察

寄生虫はその種類によりプレパテントピリオドはほぼ決まっているので（石井・今井, 2007）、プレパテントピリオドの違いが種の同定の一助となる。犬を終宿主とするシカ寄生種の多くのプレパテントピリオドは 10 日前後であり、その中では形態学的に本種と類似している *S. grueneri* のプレパテントピリオドは他種より短く 6~7 日であることが（Gjerde, 1985a）、また *S. cervicanis* のそれは 11~12 日と報告されており（Hernández-Rodríguez *et al.*, 1981a, b）、いずれも本種においてはそれらよりさらに短く、5~6 日であった。

S. wapiti も本種もホンシュウジカからの報告があることから（新井ら、2010）、本種との関連性が疑われるが、*S. wapiti* のプレパテントピリオドは

10 日で別種である可能性が高いと考えられた。またプレパテントピリオドについて、わずかな違いながら *S. grueneri* や *S. cervicanis* のそれらとは相違が認められることは、今回の種がシカ由来の既知種とは異なる種であることを示唆していた（表 4-2）。

今回感染試験に供した 2 頭のイヌは実験前までに少なくとも 1 年は鹿肉を与えていない。*Sarcocystis* 属が含まれる所謂コクシジウム類は通常糞便内にはオーシストを排出する。しかし *Sarcocystis* 属原虫は成熟オーシストが体内で形成され、外界である糞便内にはスポロシストの形で排出され、オーシストよりもサイズが小型である。従ってみかけの陰性の可能性が危惧されたが、検査期間中は感染後 4 日目では両犬共スポロシストは検出されず、感染後 6 日目のスポロシスト密度は 3.6/ g および 0.2/ g、7 日目では 5.5/ g および 5.0/ g であり、感染後 6 日目のスポロシスト密度よりも 7 日目の方が高値を示したことから、検査方法に問題はなかったと考えられる。

今回の試験で少なくともイヌが本種の終宿主であることが明らかにされた。猟犬がホンシュウジカの生息域に入るのは、狩猟期（11～3 月）とそれ以外の期日指定の有害捕獲（4～10 月）に限定されているが、スポロシストは年余にわたって外界で生存可能なこと、一般に終宿主が排泄するスポロシスト量は高いことが知られていることから、ホンシュウジカーイヌ科動物（特に猟犬）の間で生活環が容易に回ることが考えられた。しかし今回の広大な猟区に投入される猟犬は 1 日当たり数頭までである。最近では農村部でもイヌの繋留飼育は確実に実施されていて、放し飼いは見られない。今後は野外での終宿主は何であるのか興味深い問題が残された。

以上より兵庫県宍粟市のホンシュウジカからの *Sarcocystis* の終宿主はイヌ科動物であり、プレパテントピリオドから本種はシカ寄生の既知の *Sarcocystis* 種とは異なる単一種であることが示唆された。

5 小 括

兵庫県の本シュウジカの筋肉内から検出されたサルコシストを含有する本シュウジカ心筋を 2 頭の犬に与えて感染試験をする機会を得た。目的としては感染が成立するかどうか、およびそのプレパテントピリオドは何日であるのかを確認することである。

サルコシスト投与前には検出されなかったスポロシストが投与後 5 および 6 日目に排泄が確認された。このことにより本種はイヌが終宿主となることが証明され、そして本種のプレパテントピリオドは 5～6 日であることが判明した。

これらのことから、形態学的、遺伝子学的、およびプレパテントピリオドの違いから兵庫県から検出された *Sarcocystis* は既知種とは異なった新種であることが示唆され、さらに本種は終宿主がイヌ科動物－中間宿主がシカで生活環が維持されていることが判明した。

表 4-1. サルコシスト感染犬のプレパテントピリオド

	感染後日数（日目）			
	4	5	6	7
イヌ 1	陰性	陰性	陽性 (3.6 /g)	陽性 (5.5 /g)
イヌ 2	陰性	陽性	陽性 (0.2 /g)	陽性 (5.0 /g)

サルコシスティス陽性生鹿肉を与えた犬 2 匹より
スポロシストが検出されるまでの日数.
括弧内はスポロシストの密度.



図 4-1. 実験感染犬の糞便内のスポロシスト

感染後 6 日目のイヌ糞便から検出されたスポロシスト.

長径 : 17.0~20.0 (17.7 ± 0.8) μm 、

短径 : 10.0~12.5 (11.5 ± 1.1) μm 、

内部に 4 個のスポロゾイトと残体を確認できる.

表4-2. 本研究種と類似した構造の絨毛状突起をもつ既知の *Sarcocystis* 種との形態学的比較

種	本研究種	<i>S. alceslatrans</i>	<i>S. rangi</i>	<i>S. grueneri</i>	<i>S. cervicanis</i>	<i>S. wapiti</i>
サルコシストの大きさ(μm)	445.5 - 1,064.3	7,000	8, 990	580	150 - 200	580 - 900
壁の厚さ(μm)	0.2	<1.0	0.3 - 0.6	0.04 - 0.06	0.5	0.04
隔壁の厚さ(μm)	0.1	不明	0.02 - 0.03	0.01 - 0.03	0.5 (0.2 - 0.8)	不明
突起の幅(μm)	0.03	0.01	0.5	0.03 - 0.04	0.05	0.04
突起中の空隙	なし	なし	あり	あり	なし	なし
ブラディゾイトの大きさ(μm)	13.6	10 - 13	12 - 17	14 - 17	14 - 18	14 - 18
中間宿主	ホンシユウジカ	アメリカヘラジカ	トナカイ	トナカイ	アカシカ	ワピチ
終宿主	イヌ	イヌ科動物	イヌ科動物	イヌ科動物	イヌ科動物	イヌ科動物
プレパテントピリオド(日)	5 - 6	10 - 14	11	11 - 17	11 - 12	10 - 12
参考文献	本研究	①	②	③	④	⑤

- ① Dubey, J. P. 1980.
 ② Gjerde, B. 1984c.
 ③ Gjerde, B. 1985c.
 ④ Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. 1989.
 ⑤ Speer, C. A. and Dubey, J. P. 1982

総 括

サルコシスティス (*Sarcocystis*) 属原虫はアピコンプレックス門 (Apicomplexa) に属する孢子虫綱コクシジウム目サルコシスティス科に属する原虫であり、中間宿主の筋肉中に肉眼でもみられるような大型のシストであるサルコシスト (sarcocyst) を形成する。本属の原虫は生活環を完遂するために終宿主と中間宿主となる 2 種類の宿主を必要とする。終宿主はヒトを含む霊長類と肉食動物、中間宿主は草食性や雑食性動物、ウサギやげっ歯類や鳥類も含まれる。中間宿主および終宿主とも宿主特異性が比較的高いと考えられている。中間宿主から終宿主への感染はサルコシストを摂食することにより、また終宿主から中間宿主への感染は終宿主の糞便中に排泄されるスポロシストを摂食することによる。わが国では、中山間部におけるニホンジカおよびイノシシによる獣害がクローズアップされてきており、狩猟と有害捕獲によって捕獲が行われている。食肉家畜の普及が西洋に較べて劣っていたわが国では、これら野生獣肉は古来より重要な蛋白源として供給されてきたが、ニホンジカは十数年前まで捕獲数も僅かで食用としてはイノシシほど一般的ではなかった。しかしこの十数年で全国的に飛躍的に生息数を増やし、狩猟獣は狩猟家とその周辺の人々によって消費されてきたが、最近ではニホンジカの肉の有効利用が提唱されている。しかしニホンジカの *Sarcocystis* の現状に関する報告は未だ十分なものとは言えない。今回兵庫県におけるニホンジカの狩猟の機会を得たのでその実態について調査研究を行った。

1. 兵庫県のホンシュウジカにおける *Sarcocystis* の寄生状況

狩猟および有害捕獲を目的として兵庫県中部山岳地帯の宍粟市福知下三方地区で捕獲されたホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) 64 頭を

年齢別（0歳～5歳以上）および部位別（心筋、横隔膜筋、大腿二頭筋、および最背長筋）に材料を採取し、サルコシストの寄生率を調査した。調査したホンシュウジカにおける寄生率は81.3%と高率を示した。年齢別では1歳以上の個体の感染率に明瞭な差異は見られなかったが、0歳の子ジカには寄生が認められなかった。部位別の調査では心筋、横隔膜筋、後肢大腿二頭筋、および背最長筋間での感染率にはほぼ有意差が認められなかったものの、寄生密度は心筋で有意に高い結果が得られた。この結果が、調査したホンシュウジカに複数の種が寄生しているのか、単一種である程度の心臓指向性があるのかは明らかにできなかった。得られたサルコシストはいずれの部位に寄生するものも長円形を呈し、大きさにはかなりの変異（ $445.5 \sim 1064.3 \times 99.0 \sim 247.5 \mu\text{m}$ ；平均 $678.6 \times 174.2 \mu\text{m}$ ）が見られた。今回の調査で観察された *Sarcocystis* はこれまでわが国で報告されていた種とは形態学的に異なっていた。

2. 兵庫県のホンシュウジカからの *Sarcocystis* の形態学的検討

兵庫県のホンシュウジカの *Sarcocystis* 種の寄生状況を調べるために筋肉中のサルコシストを確認したところ、そのサイズや形態に差異が見られた。そこでサルコシストの形態を調べるために光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて形態学的特徴を調べた。サルコシストとブラディゾイトの総数の関連性を求めた結果、サルコシストの大きさとブラディゾイトの数については正の相関がみられ、サルコシストのサイズの違いは発育程度によるものであることが示唆された。サルコシストの形態学的検討では、シストの壁構造の比較が有用とされており、異種間のサルコシストの形態学的差異の比較についてはシスト壁の外側に見られる絨毛状突起の形態比較が有用であることからこれを利用し、世界各地で報告されているシカ由来種のなかではトナカイ（*Rangifer tarandus*）およびアカシカ（*Cervus elaphus*）から記載され

ている *S. grueneri* に今回検出されたサルコシストが最も類似していたが、検討したいずれの種とも異なった未記載種である可能性を示唆するものであった。

3. 兵庫県のホンシュウジカ由来 *Sarcocystis* の分子分類学的検討

兵庫県に生息するホンシュウジカに寄生する *Sarcocystis* のサルコシストは第 2 章における形態学的検討から形の異なる針型、唐辛子型、卵円型の 3 つの型に分けられた。しかしこれら 3 つの型は *18S rDNA* 遺伝子解析から全て同じ種であることが判明した。この *Sarcocystis* の分類学的位置を *18S rDNA* および *cox1* 遺伝子を用いて検討した。その結果、シカ由来 *Sarcocystis* 属原虫の *cox1* 遺伝子による分類からこの *Sarcocystis* はこれまで報告されてきたものとは独立したクレードを形成した。このことから遺伝子解析からは本種はこれまでに報告されていない単一種である可能性を示唆するものであった。

4. 兵庫県のホンシュウジカからの *Sarcocystis* のイヌへの感染試験

兵庫県のホンシュウジカの筋肉内から検出されたサルコシストを含有するホンシュウジカ心筋を 2 頭の犬に与えて感染試験をする機会を得た。目的としては感染が成立するかどうか、およびそのプレパテントピリオドは何日であるのかを確認することである。サルコシスト投与前には検出されなかったスポロシストが投与後 5 および 6 日目に排泄が確認された。このことによりイヌが本種の終宿主となることが証明され、そして本種のプレパテントピリオドは 5~6 日であることが判明した。これらのことから、形態学的、遺伝子学的、およびプレパテントピリオドの違いから兵庫県から検出された *Sarcocystis* は既知種とは異なった新種であることが示唆され、さらに本種の終宿主がイヌ科動物—中間宿主がシカで生活環が維持されていることが

判明した。

本研究の結果から兵庫県に生息するニホンジカの *Sarcocystis* は 80% を超える感染率を示し、多くのニホンジカが感染していることが判明した。またわが国の他の地域から検出される種とは異なる種が主に生息していることが判明した。その生活環はイヌ科動物を終宿主に、シカが中間宿主になることが明らかになり、飼育犬や狩猟における狩猟犬のあり方やジビエとして食用肉としてのシカ肉の活用には、解体から製品化されるまで、それぞれの過程の要所で、獣医師の検査と管理が実施される体制の下に十分な注意が払われる必要性を示すものであった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始懇切にご指導、御助言を賜った本学獣医寄生虫学研究室 故・今井壮一名誉教授ならびに池 和憲教授に心より感謝の意を表します。透過型電子顕微鏡標本作製にあたりご指導頂いた本学比較細胞生物学研究室 畠山 仁助教ならびに本学獣医解剖学研究室 添田 聡准教授、本研究を実施するにあたり様々な御助言を頂いた本学獣医寄生虫学研究室 森田 達志准教授ならびに常盤俊大講師、そして光学顕微鏡標本作製にあたりご援助頂いた本学獣医病理学研究室 菊田 基氏に心から感謝致します。

鹿肉の病理鑑定を依頼したところ、サルコシスティスの寄生を御指摘頂いたことにより最初にこの研究に入るきっかけを作ってくれた東京農工大学 獣医臨床腫瘍学研究室の町田 登教授に感謝申し上げます。

最後に、検体確保や検体の提供を 10 年以上に亘り、現場で活動し、支えてくれた一般社団法人 兵庫県猟友会宍粟支部下三方班の大畑、小林、前田、木下、高崎、岡本、日下各氏に対して心より御礼申し上げます。

参考文献

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhnag, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Abe, N., Matsuo, K., Moribe, J., Takashima, Y., Baba, T., Gjerde, B. 2019. Molecular differences of five *Sarcocystis* species in sika deer (*Cervus nippon centralis*) in Japan based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (*cox1*) sequences. *Parasitol. Res.* 118: 1975–1979.

Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

新井陽子、田中成幸、斉藤守弘. 2010. 野生のホンシュウジカにみられた *Sarcocystis sybillensis* と *S. wapiti*. *動物の原虫病* 25: 13-16.

青木佳代、石川和彦、林 賢一、斉藤守弘、小西良子、渡辺麻衣子、鎌田洋一. 2013. シカ肉中の *Sarcosystis* が原因として疑われた有症苦情. *日本食品微生物学会雑誌* 30: 28-32.

青木佳代、林 正宗、河野智美、梅原成子、坂口初美、鷲田 淳、石川和彦. 2017. シカ肉のあぶりが原因と推定された有症事例. *日本食品微生物学会雑誌* 34: 166-169.

Crum, J. M., Fayer, R., Prestwood, A. K. 1981. *Sarcocystis* spp. In white-tailed deer. 1. Definitive and intermediate host spectrum with a description of *Sarcocystis odocoileocanis* n. sp. *J. Wild. Dis.* 17: 567-579.

Crum, J. M. and Prestwood, A. K. 1982. Prevalence and distribution of *Sarcocystis* spp. among white-tailed deer of the Southeastern United States. J. Wildl. Dis., 18, 195-203.

Dahlgren, S. S. and Gjerde, B. 2007. Generic characterization of six *Sarcocystis* species from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway based on the small subunit rRNA gene. Vet. Parasitol. 146: 204-213.

Dahlgren, S. S. and Gjerde, B. 2008. *Sarcocystis* in moose (*Alces alces*): molecular identification and phylogeny of six *Sarcocystis* species in moose, and a morphological description of three new species. Parasitol. Res. 103: 93-110.

Dahlgren, S. S. and Gjerde, B. 2009. *Sarcocystis* in Norwegian roe deer (*Capreolus capreolus*): molecular and morphological identification of *Sarcocystis oviformis* n. sp. and *Sarcocystis gracilis* and their phylogenetic relationship with other *Sarcocystis* species. Parasitol. Res. 104: 993-1003.

Dahlgren, S. S. and Gjerde, B. 2010a. Molecular characterization of five *Sarcocystis* species in red deer (*Cervus elaphus*), including *Sarcocystis hjorti* n. sp., reveals that these species are not intermediate host specific. Parasitology 137: 815-840.

Dahlgren, S. S. and Gjerde, B. 2010b. The red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Vulpes lagopus*) are definitive hosts of *Sarcocystis alces* and *Sarcocystis hjorti* from moose (*Alces alces*). Parasitology 137: 1547-1557.

Dubey, J. P. 1980. *Sarcocystis* species in moose (*Alces alces*), bison (*Bison bison*), and Pronghorn (*Antilocapra americana*) in Montana. Am. J. Vet. Res. 41: 2063-2065.

Dubey, J. P. and Speer, C. A. 1985. Prevalence and ultrastructure of three types of *Sarcocystis* in mule deer, *Odocoileus hemionus* (Rafinesque), in Montana. J. Wildl. Dis. 21: 219-228.

Dubey, J. P., Speer, C. A. and Fayer, R. 1989. *Sarcocystis* of Animals and Man. CRC Press, Boca Raton, Florida. 215 pp.

Emnett, C. W. and Huggins, E. J. 1982. *Sarcocystis* of deer in South Dakota. J. Wildl. Dis. 18: 187-193.

Emnett, C. W. 1986. Prevalence of *Sarcocystis* in wolves and white-tailed deer in Northeastern Minnesota. J. Wildl. Dis. 22: 193-196.

Fayer, R. 2004. *Sarcocystis* spp. in human infections. Clin.Microbiol.Rev. 2004 17: 894-902.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Fischer, S. and Odening, K. 1998. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18s ribosomal DNA sequences. J. Parasitol. 84: 50-54.

Gjerde, B. 1984a. A light microscopic comparison of the cysts of four species of *Sarcocystis* infecting the domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) in northern Norway. Acta. Vet. Scand. 25: 195-204.

Gjerde, B. 1984b. *Sarcocystis* infection in wild reindeer (*Rangifer tarandus*) from Hardangervidda in southern Norway: with a description of the cysts of *Sarcocystis hardangeri* n. sp. Acta. Vet. Scand. 25: 205-212.

Gjerde, B. 1984c. *Sarcocystis hardangeri* and *Sarcocystis rangi* n. sp. from the domestic reindeer (*Rangifer tarandus*) in northern Norway. Acta. Vet. Scand. 25: 411-418.

Gjerde, B. 1985a. The fox as a definitive host for *Sarcocystis rangi*. Acta. Vet. Scand. 26: 140-142.

Gjerde, B. 1985b. Ultrastructure of the cysts of *Sarcocystis rangi* from skeletal muscle of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Rangifer 5: 43-52.

Gjerde, B. 1985c. Ultrastructure of the cysts of *Sarcocystis gurueneri* from cardiac muscle of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). Z. Parasitenkd. 71: 189-198.

Gjerde, B., Giacomelli, S., Bianchi, A., Bertoletti, I., Mondani, H., Gibelli, L.R. 2017a. Morphological and molecular characterization of four *Sarcocystis* spp., including *Sarcocystis linearis* n. sp., from roe deer (*Capreolus capreolus*) in Italy. Parasitol. Res. 116, 1317–1338.

Gjerde, B., Luzón, M., Alunda, J. M., de la Fuente, C. 2017b. Morphological and molecular characteristics of six *Sarcocystis* spp. from red deer (*Cervus elaphus*) in Spain, including *Sarcocystis cervicanis* and three new species. Parasitol. Res. 116, 2795-2811.

Hernández-Rodríguez, S., Navarrete, I., Martínez-Gómez, F. 1981a. *Sarcocystis cervicanis*, nueva especie parásita del ciervo (*Cervus elaphus*). Rev. Ibér. Parasitol. 41: 43-51.

Hernández-Rodríguez, S., Martínez-Gómez, F., Navarrete, I., Acosta-García, I. 1981b. Estudio al microscopio óptico y electrónico del quiste de *Sarcocystis cervicanis*. Rev. Ibér. Parasitol. 41: 351-361.

Holmdahl, O. J., Morrison, D. A., Ellis, J. T. and Huong, L. T. 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small subunit rDNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 11: 27-37.

兵庫県農政環境部 環境創造局 鳥獣対策課. 2020. 第2期ニホンジヤ管理計画 令和2年度事業実施計画 資料編. 1-18.

石井俊雄. 2007. 改訂 獣医寄生虫学・寄生虫病学1 総論／原虫. 講談社, 東京: pp.12.

Kutkiene, L. 2001. The species composition of European roe deer (*Capreolus capreolus*) *Sarcocystis* in Lithuania. *Acta Zool. Lithuania* 11: 97-101.

Kutkiene, L. 2003. Investigations of red deer (*Cervus elaphus*) *Sarcocystis* species composition in Lithuania. *Acta Zool. Lithuania* 13: 390-395.

Lindsay, D.S. *et al.* 1988. Prevalence of *Sarcocystis odocoileocanis* from white-tailed deer in Alabama and its attempted transmission to goats. J. Wildl. Dis. 24: 154-156.

Lopez. C. *et al.* 2003. *Sarcocystis* spp. infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the north-west of Spain. Z. Jagdwiss. 49: 211-218.

松尾加代子、上津ひろな、高島康弘、阿部仁一郎. 2016. ホンシュウジカ *Cervus Nippon centralis* およびニホンイノシシ *Sus scrofa leucomystax* における住肉胞子虫の高寄生率とそれらの筋肉より分離された *Sarcocystis* spp. と *Hepatozoon* sp. の遺伝子解析. 2016. 日本野生動物医学会誌 21: 35-40.

中本有美、海野友梨、深谷節子. 2017. 鹿肉が原因食品と疑われた有症事例について. 茨城衛生研究年報 55: 33-36.

成澤昭徳、横井 智、河合和枝、作井睦子、菅原憲治. 2008. 野生エゾシカにみられた *Sarcocystis*. 日獣会誌 61: 321-323.

Rodríguez, H. *et al.* 1981. *Sarcocystis cervicanis*, nueva especie parasite del ciervo (*Cervus elaphus*). Rev. Ibér. Parasitol. 41: 43-51.

斉藤守弘. 2012. *Sarcocystis fayeri* 感染馬肉による食中毒. 獣医疫学雑誌 16: 114—125.

斉藤守弘、鉢須圭一、岩崎一弥、中島 薫、渡辺昭宣、守屋英樹、板垣 博. 1984. 住肉胞子虫シストの新簡易直接検査法の検討と応用. 日獣会誌 37: 158-162.

斉藤守弘、柴田 穰、東 久、板垣 博. 1998. *Sarcocystis cruzi* シストの牛筋肉における寄生分布. 日獣会誌 51: 453-455.

斉藤守弘、柴田 穰、久保正法、板垣 博. 1998. 野生ホンシュウジカおよびエゾシカにみられた住肉胞子虫. 日獣会誌 51: 683-686.

斉藤守弘、柴田 穰、久保正法、板垣博. 1998. *Sarcocystis arieticanis* ス
ポロシストのめん羊に対する病原性. 日獣会誌 51: 752-755.

斉藤守弘、橋本夏美、板垣 博、中島 董、渡辺照宣. 1988. 豚体内における
Sarcocystis miescheriana の発育. 日獣会誌 41: 183-187.

Speer, C. A. and Dubey, J. P. 1982. *Sarcocystis wapiti* sp. nov. from the
North American wapiti (*Cervus elaphus*). Can. J. Zool. 60: 881-888.

Santini, S. *et al.* 1997. Ultrastructure of the cyst wall of *Sarcocystis* sp.
in roe deer. J. Wildl. Dis. 33: 853-859.

高野敬志、濱田恵子、荻原弥生、八木欣平. 2006. 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胞子虫の系統解析. 道衛研所
報 56: 41-44.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar,
S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using
maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony
methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W:
improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment
through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight
matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.

上田剛平. 2015. 銃猟に関する人材育成 ―鳥獣害対策マイスター育成スク
ール 5 年間の成果―. 兵庫ワイルドライスモノグラフ 7: 27-38.

山本 薫、前島 圭、中田純子、奥田祐亮、和田安彦、寺杣文男、工藤由起

子、大西貴弘．2020. *Sarcocystis* 属が寄生していた鹿肉を生で喫食したことによる食中毒事例．日獣会誌 73: 111-115.

Yang, Z. Q., Zuo, Y. X., Yao, Y. G., Chen, X. W., Yang, G. C. and Zhang, Y. P. 2001. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. Mol. Biochem. Parasitol. 115: 283-288.