

氏名（本（国）籍）	土 井 り え（埼玉県）
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 水 谷 哲 也
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第605号
学位授与年月日	令和5年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	ウシに寄生する <i>Sarcocystis cruzi</i> ブラディゾイトの トランスクリプトーム解析及び定量検査法に関する研究
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 古 谷 哲 也 副査 帯広畜産大学 教授 河 津 信 一 郎 副査 岩 手 大 学 教 授 古 市 達 哉 副査 東京農工大学 教 授 水 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 准教授 高 島 康 弘 副査 岐 阜 大 学 准教授 福 士 秀 悦

### 学位論文の内容の要旨

*Sarcocystis* 属は哺乳類，鳥類，爬虫類及び魚類などの様々な脊椎動物に感染し，その生活環を完了するため中間宿主及びこれを食する終宿主の2種類の動物を必要とする原虫である。*Sarcocystis* 種は終宿主に腸管サルコシスティス症を発症させ，中間宿主に筋サルコシスティス症，脳脊髄サルコシスティス症を発症させる。さらに，近年，ウマを中間宿主とする *S. fayeri* 及びシカを中間宿主とする複数の *Sarcocystis* 種が非特異宿主であるヒトの食中毒の原因となることが報告された。ウマやシカにおける *Sarcocystis* 属の感染率は高いことが報告されており，*Sarcocystis* 属の寄生数が多い食肉は食中毒のリスクになると考えられている。*S. cruzi* もウシにおける感染率が高く，食中毒の原因物質である 15kDa タンパク質の抗血清に交差反応を示し，ウサギ腸管ループ試験で腸管毒性を示すため，*Sarcocystis* 食中毒のリスクがあると考えられている。また，*S. cruzi* はウシに好酸球性筋炎や流産，増体効率の低下を引き起こしていると考えられているが，その病原性との関連については不明である。*S. cruzi* に感染した牛肉の食品リスクの推定やのウシにおける病原性は，虫体数により異なると考えられる。しかし腸管毒性を示すブラディゾイトを確実に定量するための *S. cruzi* の定量的な検査法はない。このため，食中毒や病原性との関連を推測するためには，ブラディゾイトを正確に定量できる検査法が必要と考えられた。

また，2015 年に *S. neurona* の全ゲノム解析が報告されたが，*S. neurona* 以外の *Sarcocystis* 種では，種別同定に用いられているミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼ（cox1）遺伝子や 18S リボソーム遺伝子など，一部の遺伝子配列だけが報告されてお

り、他に報告がない。*S. neurona* では代謝に関連する遺伝子、宿主細胞への接着や侵入など感染に関連する遺伝子など、様々な遺伝子が報告されているが、*S. cruzi* におけるこれらの遺伝子は未だ不明である。

これらのことから、第一章では *S. cruzi* 感染率が高いことが報告されているウシ心臓及び食中毒の原因食品として報告されているシカ肉について、肉眼的な *S. cruzi* 定量検査法の構築を目的として、シストを検出する検査法及びブラディゾイトを検出する消化法により *Sarcocystis* 属の定量的な感染実態調査を実施した。その結果、感染シスト数ではシカ肉に比べウシ心臓では明らかに少なかった。しかし、食中毒の原因となるブラディゾイトについては、ウシ心臓の約 30 %の検体がシカ肉と同等のブラディゾイト数であることが確認され、食中毒発生のリスクがあることが明らかとなった。

第二章では、*S. cruzi* が保有する遺伝子を検出することを目的に、*S. cruzi* のブラディゾイトのトランスクリプトームについてハイスループットシーケンスにより解析を行った。その結果、感染や代謝に関連するタンパク質の遺伝子が複数検出され、*S. cruzi* ブラディゾイトでは嫌氣的解糖により代謝を行っていることが推定された。また、ブラディゾイトにおいてはストレス刺激に関連するタンパク質及びリボソームに関連するタンパク質の遺伝子の発現が高いことが明らかとなり、シスト形成やブラディゾイトの維持へ寄与していることが推察された。

第三章では、トランスクリプトーム解析から得られた Acetyl co-A synthetase (ACS) の遺伝子配列を用い、*S. cruzi* ACS 遺伝子 (*ScACS*) のゲノム配列を初めて特定した。また、*ScACS* の配列を用いたリアルタイム PCR による *S. cruzi* の定量検査法を構築した。その結果、*ScACS* はゲノム DNA においてシングルコピー遺伝子である可能性が高く、*S. neurona* と類似したエクソン/イントロン構造を持ち、2,175 bp のエクソン配列を持つことが初めて明らかとなった。また、新たに構築したリアルタイム PCR による *ScACS* のコピー数は肉眼的に定量したブラディゾイト数と高い相関を示し、定量試験法としての有効性が確認された。

本研究の結果、食品の *Sarcocystis* 食中毒発生リスクの推定には、ブラディゾイト数を消化法により定量することが必要なことが明らかとなった。また、*S. cruzi* の代謝や宿主への感染に関連する遺伝子の他、シスト形成やブラディゾイトの維持に寄与すると考えられる遺伝子を特定した。また、*S. cruzi* の *ScACS* は虫体数の定量に適していることが明らかとなった。今後、本研究で得られた *S. cruzi* の様々な遺伝子についても調査を進め、*S. cruzi* とヒトへの腸管毒性及びウシへの病原性との関連を検討していきたい。

## 審 査 結 果 の 要 旨

*Sarcocystis* 属は哺乳類、アピコンプレクサ (Apicomplexa) 門の Sarcocystidae 科に分類される原虫の 1 種で、哺乳類、鳥類、両生類、魚類など様々な脊椎動物に寄生する。*S. cruzi* はウシを中間宿主とし、ウシに好酸球性筋炎などを発症させ、食肉としての価値を喪失させ、増体効率の低下の原因となることにより、経済的な損失を与える。また、ヒトに *Sarcocystis* 食中毒を発生させるリスクを有する。本論文は、*S. cruzi* の病原性との関連及び食品リスクの推定するための *S. cruzi* の定量検査法の構築を目的とした研究であ

る。

第一章では、顕微鏡観察を用いた既存の *Sarcocystis* 属のシスト検査法と、新たに消化法によるブラディゾイト検査法を用い、食肉における感染状況を定量的に調査した。その結果、食中毒リスク推定のためには、消化法によるブラディゾイト定量検査法が必要であることを明らかにした。

第二章では、ハイスループットアウトシーケンサーによる *S. cruzi* のトランスクリプトーム解析を行い、新たに *S. cruzi* の遺伝子を複数同定した。また、*S. cruzi* のブラディゾイトにおけるこれらの遺伝子の発現状況を初めて明らかにした。その結果、*S. cruzi* のブラディゾイトにおいて、シスト及びブラディゾイトの維持に寄与する複数のタンパク質の遺伝子が同定された。

第三章では、第二章で得られた *S. cruzi* の Acetyl-coA synthetase 遺伝子 (*ScACS*) の CDS 配列を用いて、ハイスループットアウトシーケンサーによるゲノムシーケンスを行い、*ScACS* のエクソン/イントロンの構成及びゲノム DNA 配列を初めて特定した。さらに、この配列を基に新たなリアルタイム PCR 法を構築し、*S. cruzi* のブラディゾイト及び *S. cruzi* 感染食肉を用いて検証をおこない評価した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Development of a new quantification method of *Sarcocystis cruzi* through detection of the acetyl-CoA synthetase gene  
著 者 名 : Doi, R., Oba, M., Furuya, T., Mizutani, T. and Takemae, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : In Press