

201327006A (CD-R1枚有) <別冊有>

厚生労働省科学研究費補助金  
食品の安全確保推進研究事業

「野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究」

平成25年度 研究報告書

研究代表者 高 井 伸 二  
北里大学獣医学部獣医学科

# 目 次

## I. 総括研究報告

野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究 「研究総括とデータベースの構築、野生動物の生態学的調査」 (資料)	高井 伸二… 1
--	----------

## II. 分担研究報告

1. 野生動物サーベイランス方法の開発と行政調査及び 野生動物の生態と捕獲利用に関する調査	門平 睦代… 21
2. シカ等における豚丹毒及び牛ウイルス性疾病の血清疫学調査	青木 博史… 33
3. 野生鳥類の生態と捕獲利用に関する調査	村田 浩一… 41
4. イノシシの生態と捕獲利用に関する調査 「イノシシにおけるウイルス感染症の疫学調査」	前田 健… 45
5. 野生動物の病原体診断及び抗体測定法の開発	小野 文子… 149
6. 食中毒、食品由来感染症に関する調査 「海外の野生鳥獣由来食肉の衛生管理規制等に関する調査／(株)三菱総合研究所」	山本 茂貴… 159

## III. 国内委託

「野生鳥獣由来肉に関する資料集作成の支援」東レリサーチセンター	…………… 163
---------------------------------	-----------

## IV. その他「参考となる各自治体等のガイドライン」…………… 169

自治体等	市町村	ガイドライン名称	制定年	ページ
石川 県		野生獣肉の衛生管理及び品質確保に関するガイドライン (イノシシ・ニホンジカ)	2012年 3 月	169
富山 県		富山県獣肉の衛生管理及び品質確保に関するガイドライン	2012年 4 月	187
三重 県		「みえジビエ」品質・衛生管理マニュアル	2012年 3 月	225
香川 県		香川県野生鳥獣肉衛生管理ガイドライン	2012年 4 月	269
		狩猟者のための野生鳥獣肉衛生管理ガイドライン	2012年 4 月	290
		野生鳥獣肉や加工品の製造・販売者のための野生鳥獣肉衛生管理ガイドライン	2012年 4 月	293
	高松 市	高松市野生鳥獣肉衛生管理ガイドライン	2012年 4 月	295
鹿児島 県		鹿児島県イノシシ・シカ肉衛生管理ガイドライン	2013年 3 月	309
岐阜 県		ぎふジビエ衛生ガイドライン		339

# I. 総括研究報告

「研究総括とデータベースの構築、野生動物の生態学的調査」

北里大学：高井 伸二

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

平成 25 年度 総括研究報告書  
野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究  
研究代表者  
高井 伸二 (北里大学獣医学部)

研究要旨

平成 25 年度は実態調査を主目的として、7つの項目について事業を展開し、以下の成果を得た。「1. 野生動物サーベイランス方法の開発と行政調査及び野生動物捕獲利用に関する調査研究(門平 睦代)」では、シカ(153頭)とイノシシ(137頭)の年齢推定結果に基づき、サンプルの代表性が確認できた。また、昨年行ったウェブ調査の結果と糞便細菌診断結果を活用し、野生動物由来食肉のリスク評価を実施した。STEC(志賀毒素産生大腸菌)の保有率が高く、野生動物由来食肉を食べて病気になった人々の大部分が生食をしていたことから、人へのリスクは大きく、捕獲、処理方法および調理方法について関係者すべて、とくにハンターと喫食者への普及教育が重要であることが示唆された。さらに、野生鳥獣の主たる捕獲者である狩猟者についてその現状を整理し、保護管理(ワイルドライフマネージメント)を進めるための課題についても明らかにした。

「2. シカの生態と捕獲に関する調査研究(青木 博史)」では、食肉利用され得る野生のシカ及びイノシシにおける豚丹毒菌の感染状況把握を目的として、*Erysipelothrix* 属菌の血清抗体調査を実施した。また、野生動物と生産動物間の病原微生物伝播リスク評価に資することを目的として、シカにおける牛ウイルス性疾病の血清抗体調査を実施した。その結果、1) イノシシのみならずシカにおいても豚丹毒生菌発育凝集(GA)抗体が高率に検出され(シカ 96%、イノシシ 94%)、野生のシカ及びイノシシが *Erysipelothrix* 属菌に感染している、または過去に感染した可能性があることが判明したことから、食肉利用の際には豚丹毒の肉眼病変の発見と廃棄などの留意が必要であると考えられた。2) 同一検体について市販の豚丹毒菌ラテックス吸着凝集抗原を用いて求めたラテックス(LA)抗体価はGA抗体価よりも高い傾向にあったが、イノシシでGA抗体価との相関が確認され、*Erysipelothrix* 属菌抗体の簡便なスクリーニング法としてLA反応が有用である可能性が示唆された。3) 伝播様式の異なる3種類の牛ウイルス性疾病に対する抗体の検出率は非常に低いことから、牛-シカ間の病原微生物の伝播よりもシカ群あるいは野生動物群で固有に蔓延する疾病を重点的に注視する必要があると考えられた。

「3. 野生鳥類の生態と捕獲利用に関する調査(村田 浩一)」では、野生カモ類の一部は、狩猟対象とされ食肉(ジビエ)としても一般流通している。しかし、国内での流通および販売に対する規制は未だ整っていない。これまでの研究から、市販の野生カモ類が病原性細菌のカンピロバクターを保菌していることが分かっている。国内の野生カモ類からは、人獣共通病原体であるトキソプラズマの抗体検出が報告されているが、食用にされている野生カモ類のトキソプラズマ感染実態については、これまで調査研究が行われていなかった。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて市販野生カモ類からトキソプラズマ原虫遺伝子の検出を試みた。本原虫の遺伝子は、市販カモ類の4羽(10.5%)から検出された。狩猟鳥からは検出されず、全体では4.7%(4/86)の検出率となった。インターネットを通じて市場流通している野生カモ類の約10%から人獣共通病原体であるトキソプラズマ原虫の遺伝子が検出され、とくに鳥刺しとして生

食されることもある胸筋からと本原虫遺伝子が検出されたことには留意すべきである。野生カモ肉の食用には、公衆衛生および食品安全確保の観点から法的規制が必要であると考えた。

「4. イノシシの生態と捕獲利用に関する調査（前田 健）」では、イノシシを中心とした野生動物における感染症の疫学調査・食肉処理の際に認められる異常例の収集・検査法の確立を実施した。その結果、①人獣共通感染症・食品媒介感染症として注目されている E 型肝炎ウイルスに対する抗体を日本全国 3 か所のイノシシが高率に保有していることが判明した。また、一部のイノシシからは血清中からウイルスが検出された。②イノシシおよびシカの食肉処理の際に参考となるべき、イノシシおよびシカの外貌および内臓臓器の肉眼病変を収集した。③イノシシおよびシカのブルセラ菌・日本脳炎ウイルス・レプトスピラに対する調査を行った。④日本脳炎ウイルスに対する種々の野生動物からの抗体検出系を作製し、多くの感染症に応用できることが示された。⑤ブタや猟犬など様々な動物に感染するオーエスキー病ウイルスが、ブタでは撲滅に成功した地域で未だにイノシシに感染していることが示された。これらの結果により、イノシシやシカの処理の際、喫食の際、家畜を飼育の際には、細心の注意を払う必要があることが再確認された。また、多くの点で困難があった野生動物の感染症の診断に ProteinA/G と発現細胞を用いることにより大きな進歩を与えた。

「5. 野生動物の病原体診断および抗体測定法の開発（小野 文子）」では、野生動物の病原体の保有状況について、日本全国広範な地域から採取した材料を用いて、病原微生物保有状況の調査を行った。昨年度までに行った病原体検索により、糞便中の微生物検査では、寄生虫感染については糞便より検出された虫卵検出率は 50% と高率を示しており、原則全例に感染しているとの認識で対応を進めていく必要があると考えられた。サルモネラおよび病原性大腸菌が検出され、動物本来が保有している食中毒起因となる病原体を保有していることが明らかとなった。また、病理検索において多くの病変は寄生虫感染に起因する病変であり、ゲームミートとしての主体である筋肉組織については骨格筋のみならず、横隔膜、心筋まで、獣肉孢子虫の寄生が認められていた。また、野生動物解体処理施設における処理屠体からのふき取り検査により、処理過程における可食部分への糞便汚染の可能性および、施設内で人から持ち込まれると考えられる汚染は認められたが家畜屠畜場の調査結果と同等のレベルであることがわかった。今年度は、野生動物の小規模解体処理施設で実践できる衛生管理方法を提言するために、モデル施設における実践とその検証を行い、より安全なゲームミートを提供できるシステムを構築について検討した。

「6. 食中毒、食品由来感染症に関する調査（山本 茂貴）」では、過去 2 年間の海外の野生鳥獣由来食肉に係る衛生管理規制、法令、ガイドラインの有無等の調査結果について、法令・ガイドラインが確認された機関・国については、わが国で発行されているガイドラインを参考に、対象野生鳥獣、と畜場の有無、衛生管理規制の内容（狩猟から食肉処理段階までの処理・衛生管理方法、判定基準、トレーサビリティ、ハンターの衛生教育等）に関する情報を収集、整理することで、ガイドラインの作成の為の基礎資料とした。

「7. 野生鳥獣由来肉に関する基礎データ収集と解析（東レリサーチ）」では、①野生鳥獣由来食肉の利用と感染症に関する検討、②野生鳥獣食肉利用等のガイドライン（案）の作成に向けた検討支援、③会議等および報告書等における資料作成支援を実施した。

## 研究組織

研究代表者 高井 伸二 北里大学  
研究分担者 門平 睦代 帯広畜産大学  
青木 博史 日本獣医生命科学大学  
村田 浩一 日本大学  
前田 健 山口大学  
小野 文子 千葉科学大危機管理学部（前：予防衛生協会）  
山本 茂貴 東海大学海洋学部（前：国立医薬品食品研究所）

## 研究協力者

徳田 裕之 環境庁関東地方環境事務所 野生生物課長  
原田 和記 鳥取大学農学部獣医学科准教授  
若本 裕晶 JNC株式会社化学品事業部ライフケミカル部  
平田 玲子 JNC株式会社横浜研究所事業開発G  
清水 孝恵 日本獣医生命科学大学 獣医学科 獣医微生物学教室  
岡元 千明 日本獣医生命科学大学 獣医学科 獣医微生物学教室  
西根 薫 日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科  
佐藤 宏 山口大学共同獣医学部獣医寄生虫病学教室)  
下田 宙 山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)  
米満 研三 山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室)  
鈴木 和男 田辺市ふるさと自然公園センター  
濱野 正敬 社団法人予防衛生協会  
原 正幸 北里環境研究センター  
宇根 有美 麻布大学  
岡谷 友三アレシヤンドレ 麻布大学  
小寺 祐二 宇都宮大学農学部附属里山科学センター  
竹田 努 宇都宮大学農学部生物生産科学機能形態学研究室  
都丸 成示 株式会社パルス  
成松 浩志 大分県衛生環境研究センター  
柿沼 美智留 三菱総合研究所  
片桐 豪志 三菱総合研究所  
長谷川 専 三菱総合研究所  
佐田 和也 大分県食肉衛生検査所  
横山 隆 動物衛生研究所  
進藤 順治 北里大学  
岡田あゆみ 北里大学  
太田 周二 東レリサーチセンター  
吉崎 理華 東レリサーチセンター

## A . 研究の目的

本研究は、「野生鳥獣由来食肉の安全性確保」のために、野生動物の生態学者、各野生動物の専門家、行政経験者、疫学者、疾病診断の専門家を組織とし、現地調査やアンケート調査を通じて「野生鳥獣由来食肉」に関する全体像を把握し、さらに、行政のネットワークを利用して野生動物の採材、病原体保有状況の調査、疫学的背景に基づく科学的な野生動物由来肉のリスク評価を行い、「安全性確

保のためのガイドライン」を作成し、適正なリスク管理措置を提言することを目的としている。平成 25 年度における、それぞれのチームの研究目的の概要は以下の通りである。  
1-1. サンプルの代表性について確認する。  
1-2. シカとイノシシの糞便中の食中毒由来菌保有率に関連する野生動物側のリスク要因を推定する。  
1-3. 生食などのリスク要因の頻度を量的に推定し、リスク評価を実施する。

1-4. 狩猟者が関係する保護管理にかかる課題を明らかにする。

2. 野生のシカ及びイノシシにおける人獣共通感染症である豚丹毒菌の感染状況の把握及び野生獣由来食肉の安全性確保に利用可能な基礎情報の提供を目的として、国内で狩猟・捕獲されたシカ及びイノシシにおける *Erysipelothrix* 属菌の血清抗体調査を実施する。また、野生動物と生産動物間の病原微生物伝播リスク評価に資することを目的として、野生のシカにおける牛ウイルス性疾病の血清疫学調査を実施する。これら調査により、豚丹毒菌及びウイルス性疾病に係る野生獣肉の喫食に起因する健康被害の評価又は危害回避措置の立案等に資することを目的とする。

3. 食肉利用される野生鳥類のうち、カモ類については、捕獲数が狩猟対象鳥獣の中でも最も多く、年間約 24 万羽と報告されている（環境省、2010）。また、野生のカモ類はカンピロバクターやサルモネラを保菌しており（川森ら、2004；農研機構、2006）、衛生上の危険性があることが示唆されている。さらに、国内の野生カモ類からはトキソプラズマ抗体が高率（22%）に検出されている（Murao et al., 2008）。しかし、我が国において食用にされる野生カモ類のトキソプラズマ原虫保有実態については、これまで詳細な研究調査が行われていない。

そこで本研究では、食用に狩猟されたカモ類およびネット販売されている野生カモ類からトキソプラズマ遺伝子の検出を試みた。

本研究目的は、国内で食用に供されている野生鳥類の病原体保有実態を明らかにし、野生動物の食肉利用に対するリスク評価およびリスク回避に役立てることである。

4-1. 本研究はイノシシが保有する感染症の疫学調査を実施することを目的としている。

①家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定され、豚での撲滅に成功しつつあるオーエスキー病ウイルスのイノシシにおける感染状況を調査した。（図 1・2） ②人獣共通感染症・食品媒

介感染症として注目されている E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス保有状況並びに抗体保有率を調査した。③人獣共通感染症・食品媒介感染症を引き起こすブルセラ菌に対する抗体保有状況を調査した。④人獣共通感染症で様々な動物が感染に関与している日本脳炎ウイルスのイノシシや他の野生動物における感染状況を調査した。⑤野生動物由来で人獣共通感染症を引き起こすレプトスピラ菌の腎臓における感染状況の調査を行った。⑥日本脳炎ウイルスをモデルとして野生動物を含む全ての動物種での抗体検出系の作出を試みた。⑦イノシシおよびシカの解体処理時の参考にするため、肉眼的に認められる病変部位の写真記録を行った。

5-1. 野生動物の病原体の保有状況について、日本全国広範な地域から季節変動を鑑み採取した材料を用いて、病原体保有状況についてモニタリングを行うとともに、野生鳥獣に関する検査システムの構築とバンク機能の確立を行う。

5-2. 野生鳥獣解体現場における、処理及び保管過程での病原体汚染状況についての調査を実施する。検査体制構築により、病原体保有状況の調査、疫学的背景に基づく科学的な野生動物由来肉のリスク評価を行い、ガイドラインを作成し、適正なリスク管理措置を提言することを目的とする

6. わが国での野生鳥獣由来食肉の衛生管理規制を検討するための基礎資料とするために、海外での法令・ガイドライン等による衛生管理規制等の情報を収集、整理することを目的とした。

7-1. 野生鳥獣食肉利用等のガイドライン(案)の作成に向けた検討支援する。

7-2. 会議等および報告書等における資料作成支援する。

## B . 研究方法

1-1. エゾシカとイノシシの年齢分布に関する文献を参考に、採取されたサンプルの年齢分布と文献データを比較した。

1-2. 北海道、千葉、山口と大分の 4 都道府県



で捕獲されたシカ（153 頭）とイノシシ（137 頭）より採取された糞便の診断結果にもとづき、野生動物側のリスク要因を推定した。

1-3. 昨年度の柵によるアンケート調査結果を使い、@RISK を使い、生食などのリスク要因を量的に推定した。

1-4. 環境庁が所有する狩猟者に関する情報を使い、分析した。

2-1. 検査血清：本事業において 2011 年から 2012 年に北海道東部で捕獲されたエゾシカの血清 26 検体及び九州北東部で狩猟されたニホンジカの血清 26 検体を被検シカ血清（計 52 検体）とした。また、九州北部で狩猟されたイノシシの血清 48 検体を被検イノシシ血清とした。いずれの血清も各試験に使用するまで  $-20^{\circ}\text{C}$  以下に保存し、必要に応じて試験前に  $56^{\circ}\text{C}$ ・30 分加温し、非働化した。

2-2. 豚丹毒の血清疫学調査：豚丹毒生菌発育凝集（GA）試験：微量のシカ血清の検査が可能なマイクロプレートを用いる GA 試験を実施した（平成 23 年度本研究報告書）。非働化した被検血清（シカ血清 52 検体、イノシシ血清 48 検体） $50\ \mu\text{L}$  を 0.1% Tween80 添加 Tryptose Phosphate Broth（TPB）で 2 倍階段希釈し、各希釈血清と TPB で 24 時間培養した GA 試験用国際標準株（*Erysipelothrix rhusiopathiae* Marienfelde 株；血清型 1a） $5\ \mu\text{L}$  を U 字型 96 穴マイクロプレートのウェルに添加混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  で培養した。培養 24 時間後に、管底に膜状の沈殿物を生じたウェルを GA 反応陽性とし、陽性を示す最高希釈倍数を GA 抗体価とした。また、GA 抗体価 4 倍以上を豚丹毒菌抗体陽性とした。

豚丹毒菌ラテックス吸着凝集抗原を用いたラテックス凝集（LA）試験：市販の「日生研アグテック SE（製造販売：日生研株式会社）」を用いて、被検血清（シカ血清 52 検体、イノシシ血清 48 検体）の LA 試験を実施した。試験手順及び判定は当該使用説明書の用法及び用量に従うこととし、LA 反応が認められた最高希釈倍数を LA 抗体価とした。また、LA 抗体価 4 倍以上を豚丹毒菌抗体陽性とした。同一検体における GA 抗体価及び LA 抗体価を

比較し、対応のある t 検定による両検査結果の差の評価、相関性及び一致性評価（ $\kappa$  検定）を行った。

2-3. 牛ウイルス性疾病の血清疫学調査：牛白血病ウイルス（BLV）抗体エライザ試験：市販の「牛白血病エライザキット（製造販売：JNC 株式会社）」（以下、BLV エライザ）を用いて、被検血清（シカ血清 52 検体）の牛白血病抗体検査を実施した。検査手順は当該使用説明書の用法及び用量に従った。ただし、HRP 標識プロテイン G（ProG-HRP）とシカ血清抗体の結合性をもとに設定した S/P 値 0.23 以上（BLV エライザ陽性基準値  $0.3 \times$  牛血清抗体の反応性を基準とした ProG-HRP とシカ血清抗体の反応率 0.778）を BLV エライザ陽性とした（平成 24 年度本研究報告書）。

伝染性鼻気管炎ウイルス（IBRV）中和試験：被検血清（シカ血清 52 検体）について、96 穴マイクロプレートを用いた IBRV 中和試験を実施した（平成 23 年度本研究報告書）。指示ウイルスに IBRV No. 758-43 株を用いた。非働化したシカ血清を 2 倍階段希釈し、各希釈血清に 100TCID<sub>50</sub>/ $50\ \mu\text{L}$  の指示ウイルスを等量混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ ・90 分のウイルス中和反応を行った。各反応液を予めマイクロプレートに培養した MDBK 細胞に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ ・5%炭酸ガス下で培養した。培養 5 日目に細胞変性効果（CPE）の有無を観察し、各血清について CPE を阻止した最高希釈倍数を IBRV 中和抗体価とした。また、IBRV 中和抗体価 2 倍以上を IBRV 抗体陽性とした。

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）中和試験：被検血清（シカ血清 52 検体）について、96 穴マイクロプレートを用いた BVDV 中和試験を実施した（平成 23 年度本研究報告書）。指示ウイルスに BVDV Nose 株（BVDV-1 型）及び BVDV KZ91CP 株（BVDV-2 型）を用いた。各希釈血清に 100TCID<sub>50</sub>/ $50\ \mu\text{L}$  の指示ウイルスを等量混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ ・90 分のウイルス中和反応を行った。各反応液を予めマイクロプレートに培養した牛精巣細胞に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ ・5%炭酸ガス下で培養した。培養 5 日目に細胞変性効果（CPE）の有無を観察し、各血清につい

て CPE を阻止した最高希釈倍数を中和抗体価とし、さらに BVDV-1 試験と BVDV-2 試験で高い値を BVDV 中和抗体価とした。

3-1. 北海道内で狩猟された野生カモ類の肝臓の提供を受けた。検体の内訳は、コガモ (*A. crecca*) 13 羽、キンクロハジロ (*Aythya fuligula*) 6 羽、ズズガモ (*Ayt. marila*) 6 羽、オナガガモ (*A. acuta*) 4 羽、マガモ (*A. platyrhynchos*) 14 羽、ヒドリガモ (*A. penelope*) 5 羽の計 6 種 48 羽であった。

インターネットによる食用販売を通じてカモ類の死体を入手した。検体の内訳は、カルガモ 14 羽 42 検体 (各羽の脳、肝臓、胸筋：以下同)、ヒドリガモ 10 羽 30 検体、マガモ 14 羽 42 検体の計 3 種 38 羽 114 検体であった。野生カモ類が捕獲された地域は、茨城県、滋賀県、徳島県および鹿児島県の 4 県であった。各県のカモ類の種と羽数は、茨城県がカルガモ 5 羽とマガモ 5 羽、滋賀県がマガモ 9 羽、徳島県がカルガモ 9 羽、鹿児島県がヒドリガモ 10 羽であった。

狩猟鳥 48 羽および市販鳥 38 羽の検体試料を用いて、nested-PCR 法によりトキソプラズマ原虫の ITS1~5.8S rRNA 遺伝子 (334bp) の増幅を試みた (Gondim et al. 2010)。

4-1. イノシシにおけるオーエスキューウイルスの感染状況の調査

血清：ブタでのオーエスキュー病の清浄化に成功している 3 都道府県で捕獲されたイノシシ 173 頭から回収された血清を 56°C 30 分非働化後、実験に供試。

ウイルスと細胞：ウイルスは Indiana 株、細胞はブタ由来 CPK 細胞 (動物衛生研究所より分与)

80% プラーク減数中和試験：Indiana 株と 1 : 10 希釈血清を用いて 80% プラーク減数試験を実施した。陽性個体に関しては、血清を二倍階段希釈して抗体価を求めた。

gE 抗体の検出：野生株感染個体にのみ出現する gE 抗体の検出のために IDEXX 社の gI Antibody ELISA を実施した。

4-2. HEV のイノシシおよびシカにおける疫学調査

HEV 検出用血清：中国地方で 2009 年から 2013 年にかけて捕獲されたイノシシの血清 (180 検体)。関東地方で 2011 年と 2012 年に捕獲されたイノシシの血清 (152 検体)。九州地方で 2011 年と 2012 年に捕獲されたイノシシの血清 (46 検体)。中国地方で 2009 年から 2013 年に捕獲されたシカの血清 (209 検体) 近畿地方で 2007 年から 2010 年に捕獲されたイノシシの血清 (71 検体)。

HEV 遺伝子検出：血清から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出し、HEV-F1 プライマーと HEV-R2 プライマーを用いて RT-PCR を実施、更に RT-PCR 産物を、HEV-F2 プライマーと HEV-R1 プライマーを用いて Nested PCR を行い、遺伝子の検出を試みた。陽性が疑われるサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判定した。

HEV 抗体の検出：HEV のウイルス様粒子 (VLP) を大阪大学微生物学研究所の松浦善治先生より分与していただき、それを抗原として ELISA を行った。血清は 1 : 100 に希釈し、二次抗体には抗ブタ IgG 抗体を 1 : 1000 希釈で用いた。発色には Bio-Rad のパーオキシダーゼ基質キットを用いた。

HEV カプシドタンパクの発現：下関で HEV 患者の遺伝子 (JTF-Yamagu11 株) を下に ORF2 遺伝子全長 (1-660 アミノ酸) をコードする遺伝子はプライマー Yamagu11 ORF2 1F (ClaI) ver2 (5' -GTA TCG ATC ACC ATG CGC TCT CGG GCT TT-3' ) と Yamagu11 ORF2 660R-His (5' -GTA GAT CTT CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TAC TCC CGG GTT TTA CCC A-3' ) で増幅した。N 末端領域を欠損した ORF2 をコードする遺伝子はプライマー Yamagu11 ORF2 112F (ClaI) (5' -GTA TCG ATC ACC ATG GCT GTG GCT CCG GCC CCT-3' ) と Yamagu11 ORF2 660R-His (5' -GTA GAT CTT CAG TGA TGG TGA TGG TGA TGG TAC TCC CGG GTT TTA CCC A-3' ) で増幅した。増幅した遺伝子は ClaI と BglIII で切断した後、pCAGGS/MCS の ClaI と BglIII サイトに挿入した。得られた発現プラスミドを 293T 細胞にポリエチレンイミンを用いてトランスフェクションした。発現の確認は抗 His-Tag 抗体で行った。トランスフェ

クシオン細胞は RIPA によって 4°C1 時間処理した後、15000 回転 4°C30 分間遠心して上清を回収して、ELISA 抗原として用いた。

HEV 抗体の検出：トランスフェクション細胞の抽出抗原を 5 $\mu$ g/ml に希釈した後、100 $\mu$ l を各ウェルに接種して ELISA を行った。ブロッキング液および抗原希釈液にはブロックエースを用いた。血清は 1:100 に希釈し、二次抗体にはペロキシターゼ標識 ProteinA/G を 1:10000 希釈して用いた。発色には Bio-Rad のパーオキシダーゼ基質キットを用いた。

#### 4-3. イノシシおよびシカの腎臓からレプトスピラ遺伝子検出

サンプル：2013 年に中国地方で捕獲されたイノシシ 52 頭、シカ 61 頭の腎臓を供試した。

レプトスピラ遺伝子検出：マルチビーズショッカーを用いて粉碎した腎臓から DNeasy Blood & Tissue Kit を使用し DNA 抽出した。得られた DNA をもとにプライマー OmpL1-Pr. 1 と OmpL1-Pr. 2 で First PCR を実施し、プライマー OmpL1-IN-F1 と OmpL1-IN-R1 で Second PCR を実施した。陽性が疑われるサンプルは塩基配列を決定し、最終的に判定した。また得られた塩基配列をもとに系統樹を作成した。

#### 4-4. ブルセラに対する急速凝集反応

血清：中国地方で 2009 年から 2012 年にかけて捕獲されたイノシシ 109 頭とシカ 115 頭の血清を用いた。

急速平板凝集試験：家畜伝染病予防法に則り、ブルセラ・メリテンシスを抗原とした急速平板凝集試験を実施した（ブルセラ急速診断用菌液、化血研）。国際単位 30 単位以上を陽性と判定した。

#### 4-5. 日本脳炎に対する抗体保有状況の調査

血清：中国地方で 2009 年から 2011 年にかけて捕獲されたイノシシ 63 頭と近畿地方で 2008 年から 2011 年にかけて捕獲されたイノシシ 33 頭とシカ 25 頭の血清を用いた。

#### 80% プラーク減数中和試験：

JEV/sw/Chiba/88/2002 株を用いて 80% プラーク減数試験により中和抗体価を測定した。10 倍以上の抗体価を暫定的に陽性と判定した。

#### 4-6. 日本脳炎ウイルスをモデルとして全て

の動物種での抗原検出および抗体検出系の作出

血清：JEV JaOH 株実験感染犬 3 頭の経過血清。中部地方の施設で飼育されているニホンザル 332 頭の血清。近畿地方で捕獲されたユビナガコウモリ 155 頭の血清。フィリピンで捕獲されたフルーツコウモリ 381 頭の血清。

JEV 抗体の検出：不活化ワクチン抗原 (Beijing01、遺伝子型 III) を抗原として ELISA を行った。ブロッキング液および抗原希釈液にはブロックエースを用いた。二次抗体にはペロキシターゼ標識 ProteinA/G、HRP 標識 Anti-dog IgG、HRP 標識 Anti-dog IgM を用いた。発色には Bio-Rad のパーオキシダーゼ基質キットを用いた。

#### 4-7. 解体処理の際に認められたイノシシおよびシカの肉眼所見の収集

2012-2013 年度に中国地方で捕獲されたイノシシおよびシカの解体処理に伴い、正常および異常所見を全て写真撮影し収集した。

5-1. ふき取り検査：解体処理施設において、従来の処理工程でのふき取り検査及び、今回施設へ試験的に導入した、微酸性電解水処理後のふき取り検査について検討をおこなった。導入した微酸性電解水処理装置はセリウスソフト水生成装置 (OSG コーポレーション) である。サンプリングは、解体直後および、洗浄後の野生動物屠体の胸部、臀部および骨盤腔内 100cm<sup>2</sup> を滅菌希釈液入り拭き取り検査キット (Pro-media ST-25) で拭き取った。菌液を適宜 10 倍段階希釈したものを試料とした。この試料をコンパクトドライ (ニッスイ) (生菌数測定用、大腸菌群数測定用および黄色ブドウ球菌測定用) に接種し、培養を行った。培養後は培地上のコロニー数を測定し、枝肉 1cm<sup>2</sup> あたりの菌数を算出した。処理施設内についても同様に検索を実施した。

5-2. 病理組織検査：処理担当者が肉眼的に異常を判断できるアトラス作成を目的として、北海道地域のエゾシカおよび、九州地域のイノシシの全身臓器の肉眼写真撮影および、各臓器における病理組織学的検索を実施した。病理組織用サンプルは各臓器から一部を切り

出し、ホルマリン固定し、薄切、HE 染色後に検鏡し病理組織検索を行った。

6-1. 野生鳥獣由来食肉に係る衛生管理規制等について、新聞検索、文献検索、インターネットによる検索を実施した。調査キーワードは野生動物と食中毒、野生動物と食と感染、野生動物と生食、野生動物と食とウイルス、野生動物と食と菌、野生動物と食と寄生虫、野生動物と食と動物由来感染症など(別添参照)を用いてヒットした中から135件について解析した。

6-2. 法令・ガイドライン等を収集するにあたっては、調査対象機関・国の法令集や所管官庁のホームページ(以下、HP)の検索により行った。

6-3. 法令・ガイドラインが確認された機関・国については、わが国で発行されているガイドラインを参考に、対象野生鳥獣、と畜場の有無、衛生管理規制の内容(狩猟から食肉処理段階までの処理・衛生管理方法、判定基準、トレーサビリティ、ハンターの衛生教育等)に関する情報を収集、整理した。

7-1. 野生鳥獣食肉利用等のガイドライン(案)の作成に向けた検討を支援した。

7-2. 会議等および報告書等における資料作成を支援した。

#### 倫理面への配慮

イノシシ・シカに関しては、狩猟期に捕獲あるいは有害鳥獣として捕獲されたものについて調べた。コウモリに関しては、都道府県知事の許可およびフィリピン政府の許可を得ている。

検出された微生物の中には、野生動物が自然感染しており、ヒトへの病原性が認められる可能性がある場合があるが、その微生物の最終同定を行い、その不活化方法もしくは安全な可食部分の採取方法について適切なマニュアルを確立するまでは、情報の取扱いに留意し、協力機関において、風評被害等の影響が出ないように配慮した。

#### C . 研究成果

#### 1.野生動物サーベイランス方法の開発と行政調査及び野生動物捕獲利用に関する調査研究

1-1. シカ、イノシシとも体重は正規分布するが、年齢は、若い動物が多く、分布に偏りがみられた(門平・図1-4)。そこで、代表サンプルであるかどうかを確かめるために、文献に記載されていた生存分布データと比較してみると、それぞれの年齢グループからサンプルが採取されていることが確認できた(門平・図5,6)。このことより、本研究で使われたサンプルは代表サンプルであることが確認できた。

1-2. 糞便サンプルからはサルモネラ(1例あり、大分のイノシシ1頭のみ)、キャンピロバクター、赤痢菌は見つからなかったが、0抗原陽性の病原性大腸菌(以降、志賀毒素産生大腸菌:STECと呼ぶ)陽性の検体が複数存在した。よって、ハザード(対象病原体)をSTECに絞り、どの要因(地域、年齢、体重、性別)がSTECの存在と関連しているのか統計分析した。まず、データを記述的にまとめた(門平・表1)。ロジステック重回帰分析を行った結果、関連する要因としては、北海道での飼育方法の違い、つまり、養鹿場(50%)のほうが狩猟(17%)より有病率が有意に高いこと、また、シカに関しては有病率に地域差があった(北海道41%、大分37%、山口18%;門平・表2)。しかしながら、北海道のハンティングで捕獲されたエゾシカの有病率(17%)は、山口の有病率とほぼ同じであった。一方、イノシシの有病率に有意差はみられなかった(山口県でゼロ、大分と栃木はほぼ同じ値で約18%(門平・表2))。これらの結果を、スペインで報告された類似の研究結果(Díaz-Sánchez et al., *Veterinary Microbiology*, 163:274-281, 2013)と比較すると、有病率の高さや地域の差では異なっていた。本研究では、スペインで収集された家畜との距離など生息状況や野生動物の密度に関する情報を収集していないので、単純な比較は難しい。しかしながら、今後は、サンプルが取られた周辺的环境状況や動物の密度なども分析に含むべきであると考えられる。

1-3. アンケート調査結果から野生動物由来食肉を食べたことにより健康被害を訴えた方々が5%ほどいた。病院で治療を受けた人もいる。5%の健康被害を受けた人々にとって生食が一番重要な要因であることがわかった（門平・表3）。また、喫食する人々の半分以上が、常に、生食や加熱不十分な野生動物由来肉を食べないと有病率が5%に達しないこともモデル構築作業過程で推定できた（門平・表3）。よって、国民全体としては3-15%と喫食人口は少ないが、喫食する人の5割から8割は、生や半生（たたきなど）の食肉を喫食する傾向があると推測できた。とくにハンターでは、動物に直接接触、生肉の処理をするなどのリスクも追加されるので、ハンターへは十分な注意喚起と予防教育が必要であろう。

1-4. 狩猟制度：我が国では狩猟と許可捕獲を除き、野生鳥獣の捕獲は原則禁止されている。狩猟を行うためには、都道府県知事が交付する狩猟免許を取得した上で、狩猟をしようとする都道府県に狩猟者登録し、所定の狩猟税を納付することが必要である。狩猟免許には、猟法に応じた4種類（門平・表4）がある。また狩猟にあたっては、猟ができる区域・期間・猟法など、法令で定められた制限を遵守しなければならない（門平・表5）。さらに、狩猟対象としての価値や農林水産業等に対する害性及び狩猟の対象とすることによる当該鳥獣の生息状況への影響を考慮し、狩猟により捕獲できる鳥獣49種が「狩猟鳥獣」として定められている（門平・表6）。

狩猟者（狩猟免許所持者数）の現状：狩猟者数は、年々減少しており、1970年から2010年の40年間で53万人から19万人と約36%まで減少した（図7）。ただし、狩猟免許の種類別では、わな猟免許所持者の割合が年々増加している。また、年齢別では年々高齢者の占める割合が高くなって、2010年には60才以上が約12万人と、6割を占めることになる。このような背景には、野生鳥獣の肉や毛皮の需要の低下、趣味の多様化、生活様式の変化に伴う狩猟に対する理解と共感の欠乏等があると考えられる。

2. シカの生態と捕獲に関する調査研究 2-1. 豚丹毒の血清疫学調査：野生のシカ血清及びイノシシ血清における *Erysipelothrix* 属菌に対する抗体検出数等を表1に、抗体分布を青木・図1に示した。GA抗体価は100検体中95検体が4倍以上を示し、幾何平均（GM）は、全体11.6（最高値128、中央値8）、シカ7.6（最高値16、中央値8）、イノシシ18.7（最高値128、中央値16）であった。一方、LA抗体価は100検体中98検体が4倍以上を示し、GMは、全体25.88（最高値128、中央値32）、シカ20.0（最高値16、中央値8）、イノシシ33.9（最高値128、中央値16）であった。GM抗体価と、シカの年齢、性別または体重との間に関連は見られなかった。

両抗体価を比較した結果、LA抗体価が有意に高い傾向を示した（対応のある  $t$  検定、有意水準1%）。同一検体の両抗体価の相関係数は、全体0.42、シカ0.15、イノシシ0.53であり、全体およびイノシシにおいて両検査の結果が有意に関連していた（有意水準1%）（青木・図2）。

GA試験及びLA試験のいずれにおいても4倍以上を *Erysipelothrix* 属菌に対する抗体陽性とした場合の両検査間の  $\kappa$  係数は、全体で0.26（やや一致）及びシカ0.48（中等度に一致）であったが、イノシシでは0（わずかに一致）となり、判定が困難であった（青木・表2）。

2-2. 牛ウイルス性疾病の血清疫学調査（青木・表3）：BLV エライザ：被検血清（シカ血清52検体）についてBLV エライザを実施した結果、いずれの検体もS/P値=0.02以下であり、BLV抗体は検出されなかった。

IBRV及びBVDV中和試験：被検血清（シカ血清52検体）についてIBRV中和試験を実施した結果、いずれの検体も2倍未満を示し、IBRV抗体は検出されなかった。一方、BVDV中和試験では、52検体中1検体に中和抗体が検出され（1.9%）、その抗体価は4倍であった。

### 3. 野生鳥類の生態と捕獲利用に関する調査

3-1. 野生カモ類からのトキソプラズマ遺伝子の検出：トキソプラズマ原虫の遺伝子は、市販カモ類の4羽（10.5%）から検出された。

トキソプラズマ遺伝子が増幅された検体の内訳は、徳島産カルガモ 1 羽の胸筋と肝臓、鹿児島県産ヒドリガモ 2 羽の胸筋であった。狩猟鳥からは検出されず、全体では 4.7% (4/86) の検出率となった。

#### 4. イノシシの生態と捕獲利用に関する調査

##### 4-1. イノシシにおけるオーエスキーウイルスの感染状況の調査

3 都道府県中 2 都道府県で捕獲された計 6 頭のイノシシにオーエスキー病に対するウイルス中和抗体が存在した。一方、陽性個体が存在しない都道府県も存在した (前田・表 1)。

ELISA によりウイルス中和抗体保有のイノシシ 6 頭はすべて gE に対する抗体を保有していた。このことは、イノシシがワクチン株ではなく野外株に感染していることを示している (前田・表 2)。

##### 4-2-1. E 型肝炎ウイルスのイノシシにおける疫学調査

近畿地方のイノシシ 71 頭はすべて陰性であると考えられた (前田・図 3)。吸光度の平均値は 0.099 で標準偏差は 0.075 であった。そのため、平均値 + 3x 標準偏差である 0.324 を Cut-off 値とした。近畿地方のイノシシはすべて陰性になった。一方、中国地方のイノシシは 0.324 を超える多くの個体が認められた (前田・図 3)。113 頭中 47 頭 (42%) が陽性となった (前田・表 3)。性別や体重別には有意差は認められなかったが、体重が軽い個体の陽性率は低い傾向が認められた (前田・表 3)。

血清からの遺伝子検出を試みた結果、112 頭中 4 頭 (4%) から HEV の遺伝子が検出された (前田・表 3)。性別には有意差が認められなかったが、体重別では逆に体重が軽い個体から遺伝子が検出される経口があった (前田・表 3)。得られた 5 検体の遺伝子から系統樹解析を行ったところ、中国地方のイノシシから検出された遺伝子は 2011 年に下関で発生した E 型肝炎患者から検出された遺伝子とともに新たなクラスターを形成した (前田・図 4)。

##### 4-2-2. 簡便ですべての哺乳動物から HEV 抗体検出法の確立

これまで用いていた HEV 抗体検出用の ELISA 抗原は昆虫細胞で大量発現させたウイルス様粒子 (VLP) を精製したものであった。我々の実験の段階で精製度の低い VLP を用いると、非特異反応が高くなった。そこで、より簡便に、ロット差のない抗原の作製を試みた。HEV のカプシドタンパク (ORF2) 発現細胞を

作出するために、全長の 1-660 アミノ酸と N 末端領域を欠損させた 112-660 アミノ酸を発現する発現プラスミドを作製し、293T 細胞にトランスフェクションして、抗原の調整を試みた。C 末端領域に結合させた His-Tag に対する抗体を指標にウェスタンブロット解析を行った結果、全長と N 末端領域を欠損させた ORF2 タンパクともに発現が確認され前田・た (前田・図 5)。しかし、これまでの報告と同様で、全長の発現量が極端に少ないことから、N 末端を欠損した ORF2 タンパク (11-660aa) を以下の実験に用いることとした。

まず、高度精製 VLP と我々が調整した発現タンパクの反応性を中国地方のイノシシの血清を用いて比較した結果、完全に検査結果が相関していた (前田・図 6)。これは、我々が調整した発現タンパクは高度に精製された VLP と同等の抗原性を有していることが示された。この結果、非常に簡便に HEV 抗原が調整できるようになった。以下の実験では、発現細胞抽出物を ELISA 抗原として用いることとした。

次に、野生動物用の二次抗体は市販されていないものも多い。そこですべての哺乳動物の抗体に結合すると考えられる HRP 標識 ProteinA/G を二次抗体として用いた。イノシシの抗体を検出するために使用していた抗ブタ IgG 抗体やシカのための抗シカ IgG 抗体と比較した結果、ProteinA/G を用いた結果は、これまで使用していた二次抗体との反応性に違いが認められなかった (前田・図 7)。以上の結果から、今後の哺乳動物由来抗体の検出には ProteinA/G を用いることとした。

##### 4-2-3. 発現タンパクと ProteinA/G を用いた ELISA による HEV 抗体保有率の調査

中国地方のイノシシ 76 頭中 23 頭 (30%)、九州地方のイノシシ 46 頭中 10 頭 (22%)、関東地方のイノシシ 152 頭中 12 頭 (8%) に HEV 陽性が認められた (前田・表 4)。一方、中国地方のシカは 209 頭中 1 頭 (0.5%) であった (前田・図 7、前田・表 4)。

中国地方のイノシシの、HEV 抗体保有率を月別に比較した結果、11-1 月にかけての陽性率が高い傾向が認められた (前田・表 5)。

HEV 遺伝子の検出を行った結果、中国地方のイノシシ 167 頭中 6 頭 (3.6%) から HEV 遺伝子が検出された (前田・表 6)。九州地方や関東地方のイノシシの血清からは HEV 遺伝子は検出されなかった。中国地方のイノシシの肝臓 51 頭からも HEV 遺伝子の検出を試みているが、

現在のところ、検出されていない(前田・表 6)。201 頭のシカの血清を調べた結果、1 頭(0.5%)だけが遺伝子陽性となった(前田・表 7)。シカの肝臓からは今のところ遺伝子は検出されていない(前田・表 7)。中国地方のイノシシとシカから検出された計 7 サンプルの遺伝子を用いて系統解析を実施した結果、すべてが下関の患者から検出された遺伝子とともに一つのクラスターを形成した(前田・図 8)。このことは、イノシシ、シカ、ヒトに感染した HEV はすべて同一の由来であることが証明された。

#### 4-3. イノシシおよびシカの腎臓からレプトスピラ遺伝子検出

腎臓から抽出された DNA からレプトスピラの OmpL1 遺伝子を nested PCR を実施した結果、イノシシ 52 頭中 12 頭(23%)およびシカ 61 頭中 2 頭(3%)からレプトスピラ遺伝子が検出された(表 8)。得られた PCR 産物から 3 個の遺伝子を検出した結果、イノシシから取れた遺伝子は *Ichterohaemorrhagiae* と *Australis*, *Hardjo* などに近い 2 タイプの遺伝子が検出された。シカから検出された遺伝子は *Canicola*, *Hardjo*, *Hebdomadis* などに近い遺伝子であった(前田・図 8)。

#### 4-4. イノシシとシカのブルセラ菌感染状況の調査

2007 年に広島県で乳牛にブルセラ菌が感染していることが報告されている。そこで、同じ中国地方のイノシシとシカにおけるブルセラ菌の感染状況の調査を実施した。スクリーニングとして、*Brucella Melitensis* を抗原として用いたブルセラ急速平板凝集試験を実施した。その結果、イノシシ 109 頭、シカ 115 頭全てが国際単位 30 単位未満であり、陰性と判定された(前田・表 9 左)。

#### 4-5. 日本脳炎ウイルスの疫学調査

国内における人での日本脳炎患者の発生は減少しているものの、2010 年愛知県で 2011 年宮崎県の牛での報告が報告されている。また、隣国の韓国では 2010 年に 26 名の患者と 7 名の死者を出している。最近の JEV の感染状況を調査する目的でシカとイノシシにおける感染状況の調査を実施した。その結果、近畿地方のイノシシは 67%、シカは 92%が陽性であり、中国地方のイノシシは何と 98%が陽性となった(前田・表 9 右)。

#### 4-6. 日本脳炎ウイルスをモデルとして全ての動物種での抗原検出および抗体検出系の作出

##### 4-6-1. 犬での検出系の確立

ヒトと同じ生活空間を共有しており、ヒトへの感染リスクを調べる上で有用な犬での日本脳炎ウイルスに対する抗体検出系を抗イヌ IgG 抗体と抗イヌ IgM 抗体を用いた場合と ProteinA/G を用いた場合を比較した。JEV Ja0H 株を実験感染したビーグル犬 3 頭の経過血清を調べた結果、抗イヌ IgG 抗体と同等以上の検出感度であった(前田・図 9)。

##### 4-6-2. サルでの検出系の確立

ヒトと同様に霊長類であるサルでの日本脳炎ウイルス検出系の有用性を検討した結果、中和抗体と有意に相関していた。そのため、中部地方のサルでの抗体陽性率を調べた結果、332 頭中 146 頭(44%)が抗体陽性であることが判明した(前田・図 10)。雌雄差は認められなかったが、年齢別では年齢が上がるにつれて陽性率が有意に上昇した(前田・図 10)。この飼育施設には、国内の様々な場所からサルが導入されてきているため、純粋の中部地方のサルの陽性率が判明しないことから、本施設で生まれ育ったサルに焦点を絞って解析した。その結果、131 頭中 35 頭(27%)が陽性で、年齢別に分けた結果、0-3 歳は 14%、4-7 歳は 44%、8 歳以上は 74%が陽性であった(前田・表 10)。年平均感染率は、一度感染したら一生抗体が持続すると仮定して算出した。その結果、中部地方のサルは、年平均 13%が感染していることが判明した(前田・表 10)。

##### 4-6-3. コウモリでの検出系の確立

コウモリは日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性が示唆されている。コウモリの日本脳炎ウイルス抗体保有率を調査した結果、和歌山県で捕獲されたユビナガコウモリ 155 頭中 142 頭(92%)に日本脳炎の陽性が認められ、フィリピンの食果コウモリ 381 頭中 136 頭(36%)に陽性個体が存在した(前田・表 11)。フィリピンのオオコウモリを種別に分類した結果、ジョフロアルーセットオオコウモリの 90%が日本脳炎ウイルスに対する抗体要請であった(前田・表 12)。地域別で分類した結果、ミンダナオ島のオオコウモリの 77%が日本脳炎ウイルスに陽性であった(前田・図 11)。

#### 4-7. 肉眼病変の収集

解体処理時に見出される異常所見の収集を目的として、中国地方でイノシシおよびシカが解体される際に同伴し、正常および異常所見を含めて肉眼所見の収集を行った(別途添付)。豚胃虫、肝蛭、白斑、出血斑、水疱、肝の寄生虫、ドロレス顎甲虫などの病変部を記録した。

## 5. 野生動物の病原体診断および抗体測定法の開発

5-1. ふき取り検査：導入した微酸性電解水は100ppm で用いたところ、かなりの塩素臭が残存したため、有効域内である 50ppm に下げ、pH を有効濃度域の 6.0~7.5 に調整して使用した。今回試験的検索を実施した施設では、消毒操作はカラシ抽出成分入りアルコール製材（ハイパー 2 4 西日本イシダ株式会社）を用いていた。作業は素手でハイパー 2 4 噴霧後に実施し、まな板等作業に使用した器材は、洗浄後および、作業前にハイパー 2 4 噴霧を実施していた。まな板の洗浄および、剥皮後の施設内の衛生状況を確認するために、処理工程に接触すると思われる各所についてサンプリングを実施した。前回報告と同様、解体時に頻繁に利用するクレーンボタン、肉用フック、解体室と処理室の間の扉ノブ等で多く一般細菌が検出された。また、肉処理最終段階に用いるスライサーは使用後洗浄して再セットされているが、スライサーの刃やガイドでも一般細菌が検出された。これら器材については微酸性電解水による腐食性が危惧されるため、処理操作は行わなかった。微酸性電解水を用いた包丁の刃については、有効性は認められたが、まな板および、包丁の柄については、乾燥後細菌の増加が認められた。表面を洗い流すだけでは、深部にまで、浸透している細菌に対して十分な効果を得ることができず、ラッピング等の処置が必要と考えられた。乾燥前の洗浄直後については、ハイパー24 噴霧でも同様の効果が認められていた。解体肉のふき取り検査は、解体個体を変えて検査を実施した。検査期間中に捕獲検体が 2 例のみで十分な検体数を確保できなかったことから参考値としてデータを示す。剥皮後の洗浄過程で、水道水、または微酸性電解水処理後についてサンプリングを行った。洗浄後の屠体の汚染レベルは低く、良好な状態であったが、前回の検査結果同様、骨盤腔内からは洗浄後においても一般細菌、大腸菌とも検出された。微酸性電解水で処理した後のサンプルの方が大腸菌数は減少する傾向は認めら

れた（小野・図 1 と 2、小野・表 1）。

5-2. 病理組織検査：アトラス作成用に正常臓器の撮影を実施した。イノシシにおいてはほとんどの動物で肺に病変を持っているため、異常所見としての画像のみとなった。今回全身臓器を採取したイノシシでは、肺は、肺虫感染と酵母様真菌の感染が認められた。その他の臓器では、イノシシ、エゾシカとも、肉眼的および病理組織学的に正常な正常と思われる組織においても正常な像を示すことができた（小野・図 3 と 4）

6-1. 新聞検索、文献検索、インターネットによる検索を実施したところ、137 件がヒットした。その内訳は、ウイルス感染症が 35 件、細菌感染症が 26 件、寄生虫感染症が 74 件、その他が 2 件であった。

135 件中、新聞調査結果から E 型肝炎ウイルスはシカとイノシシで報告され、腸管出血性大腸菌はシカで、肺吸虫はイノシシで、トリヒナが熊肉で報告されていた。

GIDEON の検索結果では、ほとんどがクマ肉やイノシシ肉によるトリヒナ感染に関するアウトブレイクだった。それ以外には、日本におけるシカ肉およびイノシシ肉による E 型肝炎ウイルスによるアウトブレイク（2 件）、スウェーデンにおける野鳥からのサルモネラ菌の感染事例（1 件）のみであった。

PubMed の検索結果では、寄生虫感染（虫やトキソプラズマ）に関する文献が多くみられた。細菌ではマイコバクテリウムやカンピロバクター等に関する文献がみられた。ウイルスについては E 型肝炎ウイルスに関する文献のみ抽出された。

CDC のサイトで検索した結果、年代別トリヒナ症疫学調査 "Trichinellosis Surveillance" 以外の個別事例に関する文献は、PubMed による検索でヒットしたものと重複していた。従って、CDC のサイトでは "Trichinellosis Surveillance" のみを検索対象とした。

その結果、アメリカおよびカナダにおけるトリヒナ症の事例が 11 件抽出された。

CiNii の検索結果から、抽出した文献のうち 13 件がシカ肉あるいはイノシシ肉由来の E 型肝炎に関する文献だった。また、イノシシ肉由来の肺吸虫に関する文献も 8 件あった。

インターネット検索の結果、野生動物肉由来の食中毒事例を 16 件抽出した。E 型肝炎ウ



イルス、旋毛虫、ウエステルマン肺吸虫、腸管出血性大腸菌 O157、野兔病の事例が抽出された。

6-2. 調査したすべての国において公的に規制する法律はなく、ガイドラインにより規制されていた。但し、米国においては、商業目的で野生鳥獣肉を販売する場合に連邦規則が制定されていた。

#### 7-1. 野生鳥獣食肉利用等のガイドライン

(案)の作成に向けた検討支援：地方自治体等が独自に制定・運用している野生鳥獣食肉の処理ガイドライン等や有識者の意見を参考に、野生鳥獣食肉利用等のガイドライン(案)の作成に向けて必要となる検討の支援を行った。自治体のガイドライン等におけるコンテンツについての専門家の意見を収集・整理した。研究班会議等において共有された研究成果、自治体のガイドライン等のコンテンツ、そして野生鳥獣由来食肉利用の安全性確保に役立つ情報の整備についての議論をもとに、研究班がとりまとめるべき情報に関する目次案の検討を行った。

7-2. 会議および報告書等における資料作成支援：開催された会議等および報告書等における資料作成を支援した。

## D. 考察

1-1. 狩猟とは法定猟法により、狩猟鳥獣の捕獲をする事を示すものであり、大日本猟友会によれば「自然資源の管理と持続的な利用を図るといった意味では、林業や漁業等と同じように自然環境を保護管理するための行為であると言える。」としている。このように狩猟には①趣味としての楽しみの他に②自然資源の持続的利用③農林水産業被害の予防④日本の在来種の保護等の意義や役割があり、近年、自然と人間との関係が希薄となる中、狩猟により鳥獣を捕獲し資源として持続的に利用することは、自然と人との関わり方の一つでもあり、肯定されるべきものである。

今後の野生鳥獣の保護管理を進めるためには、狩猟者を増やすことが必要である。狩猟が野生動物における個体群管理機能を持っているという社会的役割について普及啓発を行

うとともに、狩猟登録の手続きの簡素化や経済的負担の軽減が必要であると言われている。また、シカやイノシシなどの特定鳥獣保護管理計画の対象種においては、現在、原則的に捕獲個体については野外放置が禁止されているが、個体の回収が容易ではない。よって、周辺環境への影響が少ない場合には、鉛弾を使用していない事を条件として規制の緩和を行うなど、狩猟者への優遇措置を実施することも必要ではないかと考える。

2-1. 豚丹毒の血清疫学調査：野生のシカ及びイノシシのいずれからでも *Erysipelothrix* 属菌に対する抗体が検出され、GA 抗体価 4 倍以上を示す血清の割合は高く、陽性率は 95% を超えた。すなわち、野生のシカ及びイノシシの多くが *Erysipelothrix* 属菌に感染している、または過去に感染していた可能性が示唆された。特に、GA 抗体価 64~128 倍を示すイノシシが多数存在し、LA 抗体価 64~128 倍を示すシカも検出されたことから、*Erysipelothrix* 属菌の重度の暴露を受けた個体が存在すると推察される。*Erysipelothrix* 属には、*E. rhusiopathiae*、*E. tonsillarum*、*E. inopinata* 及び未命名 1 菌種の計 4 菌種が含まれ、そのうち *E. rhusiopathiae* は豚丹毒の主要な起原菌とされている。また、本菌は豚以外の哺乳類や鳥類にも感染し、人に感染した場合には類丹毒を引き起こす。食肉利用される野生鳥獣における豚丹毒菌の感染状況の情報が不足していたが、今般の調査で明らかになったと思われる。さらに、野生のシカやイノシシの食肉等への利用過程（解体処理や食肉加工を含む）において、*Erysipelothrix* 属菌感染による人の健康危害も考慮すべきことが明らかになったことは、重要である。

野生のシカ及びイノシシにおいて LA 抗体価を測定した。GA 抗体価よりも高い値が出る傾向があるが、特にイノシシでは GA 抗体価との相関が確認された。豚丹毒菌ラテックス吸着凝集抗原は市販されており、生菌を使用しないなどの利便性もあることから、イノシシにおける *Erysipelothrix* 属菌抗体の簡便なスクリーニング法として LA 反応の有用性を今後も

検証していく価値があるものと思われる。

2-2. 牛ウイルス性疾病の血清疫学調査：媒介物感染／機械的媒介動物感染／垂直感染を主とする BLV、垂直感染及び空気感染を主とする IBRV、直接接触／媒介物感染を主とする BVDV の3種を調査対象として、シカ血清における各ウイルス中和試験を実施したが、BLV 及び IBRV は全て陰性、BVDV で1検体のみ陽性を示すに留まった。いずれの疾病も家畜伝染病予防法の監視伝染病に指定され、ウシにおける2011～2012年度の報告数は IBRV が46戸462頭（うち北海道9戸233頭、九州同地域1戸1頭）、BVDV が236戸517頭（うち北海道150戸296頭、九州同地域2戸2頭）、BLV が2,646戸3,855頭（うち北海道368戸578頭、九州同地域4戸86頭）であり、全国的に発生している疾病である。一方、野生のシカの生息頭数は年々増加している傾向にあり、エゾシカの2011年推定生息数64万頭、ニホンジカの2011年度推定個体数は261万頭（中央値）と報告されている（環境省）。また、エゾシカの移動距離が最長100kmに達するとされていることから、シカの行動圏又は交差範囲は広いと推察できる。このような状況を踏まえると、行動地域の交差または接触頻度やウイルス感受性を考慮しなければならないものの、本研究の調査結果から、①直接接触／間接接触／空気伝播／機械的媒介生物伝播などで牛ウイルス性疾病が牛－シカ間で伝播する可能性は低い、②少なくとも調査対象疾病がシカ群内で維持されている可能性は低い、ことが推察される。すなわち、環境中に維持される病原微生物や、既にシカ群で検出される感染症に対して重点的に対策を講じることが効果的であることを支持する結果である。

3-1. インターネットを通じて市場に流通している野生カモ類の約10%から人獣共通病原体であるトキソプラズマ原虫の遺伝子が検出された。国内で捕獲されたカモ類の高率なトキソプラズマ抗体保有の報告もあることから、カモ類におけるトキソプラズマ原虫保有はほぼ確実であると考えられた。とくに鳥刺しとして生食されることもある胸筋からと本原虫

遺伝子が検出されたことに留意すべきである。野生カモ肉の食用には、公衆衛生および食品安全確保の観点から将来的に改善すべき問題が多いと思考した。

#### 4-1. イノシシにおけるオーエスキー病ウイルス感染状況の調査

オーエスキー病ウイルスはブタと同様にイノシシに潜伏感染すると考えられているため、PRV に対する抗体陽性イノシシの体内にはオーエスキー病ウイルス野生株が潜伏感染していると考えられる。このことは、ブタでの清浄化に成功している地域においても、PRV を体内に保持したイノシシが存在していることを意味しており、養豚関係者はイノシシとブタとの接触に関しては特に注意が必要であることを示唆している。更には、狩猟関係者においては、イノシシの生肉を猟犬などに与えないことが重要となる（前田・まとめ-1）。

今後は、生産動物を予防するためにも野生動物の感染症の監視も重要である。

#### 4-2-1. E型肝炎ウイルスの疫学調査

##### 中国地方のイノシシにおけるE型肝炎ウイルス感染状況

中国地方のイノシシに高い抗体保有率が存在し、4%のイノシシが血液中にウイルスを保有していることが判明した（前田・まとめ-2）。また、イノシシから検出された遺伝子は2011年のヒトの患者から検出された遺伝子と非常に似ていた。そのことは、イノシシに感染しているE型肝炎ウイルスにヒトが感染したことを示している。更には、血液にウイルスが検出されるということは、筋肉を含め全身にウイルスが拡がっている可能性がある。

以上のことから、中国地方のイノシシは非常に高率にE型肝炎ウイルスに感染しており、ヒトへの病原性も強いことが判明した。狩猟をしているヒトは血液の取扱に注意すること、イノシシ肉を消費するヒトは生食を厳禁であることが改めて示された。

#### 4-2-2. 簡便ですべての哺乳動物からHEV抗体検出法の確立

精製度の高いVLPを準備するのは労力と時間がかかるため、より簡便なELISA抗原抽出方法を試みた結果、E型肝炎ウイルスのORF2の112-660アミノ酸を発現する発現プラスミドpCAGGS-HEVORF2(112-600)をトランスフェクションした293T細胞からの抽出物が、高度精製VLPとほぼ同等であることが示された。更に、野生動物では二次抗体が存在しないことも多いがProteinA/Gを用いることにより、

それぞれの動物種に特異的な二次抗体を準備する必要がなく、すべての哺乳動物に対して有効であることが示された。

#### 4-2-3. 簡便かつ網羅的な HEV 抗体検出法を用いたイノシシとシカの疫学調査

中国地方のイノシシは 30%陽性であったのに対して、九州地方のイノシシは 22%、関東のイノシシは 8%と低かったが、日本全国のイノシシに E 型肝炎のリスクがあることが確認された(前田・まとめ-3)。しかし、HEV 遺伝子の検出率は中国地方が 4%であるのに対して、九州地方と関東地方では未だ HEV 遺伝子は検出されていないことは、やはり、中国地方のイノシシの陽性率は高いのかも知れない。中国地方のイノシシの月別陽性率を比較した結果、11 月以降に抗体陽性率が高くなっていることから、秋頃にイノシシは HEV に感染している可能性が示唆された。今後この季節性についてより詳細に検討する必要がある。

中国地方のイノシシが 30%であったのに対して、シカは 0.5%の抗体保有率であり、遺伝子検出率も 0.5%であった。シカから検出された遺伝子もイノシシから検出された遺伝子と同様にヒトの患者から検出された遺伝子に類似していた。このことは、シカに感染している E 型肝炎ウイルスもヒトに病気を引き起こす可能性を示している。

重要なことは、シカはイノシシほど E 型肝炎のリスクが高くないことを示している(前田・まとめ-3)。しかし、感染していることも事実であるので、注意が必要である。

#### 4-3. イノシシおよびシカの腎臓からレプトスピラ遺伝子検出

イノシシの 4 分の 1 にレプトスピラの遺伝子が検出され、シカの 3%にもレプトスピラの遺伝子が検出された。レプトスピラは傷口から侵入することも多いので、イノシシ・シカの尿に注意する。また、尿からレプトスピラが排出され、生息域の土壌および河川の下流が汚染されている可能性があるため注意を要する(前田・まとめ-4)。

病原性に関しては不明な点も多いが、中国地方の同一生息域に住むイノシシ・シカから様々な遺伝子のレプトスピラが検出されたことは、この地域におけるレプトスピラによる病気に関しても注意が必要である。

#### 4-4. イノシシとシカのブルセラ菌感染状況

中国地方のイノシシとシカにブルセラ菌が蔓延している結果は得られなかった。

#### 4-5. 日本脳炎ウイルスの疫学調査

中国地方の多くのイノシシに JEV が感染していることが示された。このことは、JEV が未だに国内で蔓延していることを示している。また、近畿地方のシカにも感染していること、牛での発症が認められることから反芻獣における感染状況の把握は、感染状況の変化のみならず病原性の変化についても注意が必要であることを意味している。

#### 4-6. 日本脳炎ウイルスをモデルとして全ての動物種での抗原検出および抗体検出系の作出

ProteinA/G はすべての哺乳類のイムノグロブリンに結合するといわれている。ブロッキングと抗体希釈液にはブロックエースを使用した。その結果、イヌ・サル・コウモリで有効であることが証明された。サルからは中部地方で年平均感染率が 13%であることが確認され、未だヒトへの感染のリスクが高いことが証明された。コウモリからはコウモリの感染率が高いことが再確認され、増幅動物である可能性も否定できない。

この研究で重要なことは、すべての哺乳動物で有用な抗体検出系が確立されたことであり、E 型肝炎の検出系でも確認されたように、発現細胞を用いることにより、ありとあらゆる感染症の疫学調査が可能になると信じている。

#### 4-7. 肉眼病変の収集

本研究班の主題である野生動物の食肉利用の際に、可能な限り早期に解体処理、可能な限り低温を維持、食用の際は十分な加熱という絶対条件以外に、解体処理の際、危険部位の除去が必要となる。食肉処理の際参考となる病変の肉眼所見の収集を行った。かなりのデータが集積されたと信じている。

5-1. 前年度まで、全国のイノシシ、シカ約 300 検体について病原体検索を行い、糞便中の微生物検査では、2 検体ではあるが、サルモネラが検出され、また、PCR 検査による確定診断を実施し、病原性大腸菌と同定される菌株も検出されたことから、動物本来が保有している食中毒起因となる病原体を保有していることが明らかとなった。そのため、解体処理過程において、糞便からの枝肉への汚染の予防と殺菌が重要であることが明らかとなった。そこで、今年度は、野生動物処理施設における処理工程について確認するとともに、電解水の導入による有効性について検討を行った。電解水には、強酸性電解水、強アルカリ性電

解水、弱酸性電解水、微酸性電解水、電解次亜水等がある。今回は、主成分が次亜塩素酸と塩酸を用い電気分解を行い高い殺菌力と安全性を持つ微酸性電解水を用いた。

微酸性電解水の効果を検証する期間において、捕獲された動物が2頭と少なく、未処理及び処理後の検体が各1頭となったため、統計的なデータを出すことはできなかった。畜場において、電解次亜水で過去に行われた実験では、劇的な変化ではないが、約2～3オーダー減少が認められている。しかし、今回の処理施設における予備的な適用検証では特に劇的な殺菌効果は認められなかった。枝肉の胸部、大腿部における菌数は、通常の方法で処理したものと微酸性電解水を洗浄に使用したものとを比べて差を認められなかった。胸腔内も同様であった。ただし、骨盤腔内では、大腸菌数の減少が認められた。しかし、今後も、骨盤腔内からの汚染の拡大を防ぐことが重要と考えられた。豚では「尻抜き器」と呼ばれる円筒状のカッターで一気に肛門から直腸を切る方法があるが、畜産動物に比べて、小型のイノシシでは、このような工程を踏むことで、周囲に汚染を広げる可能性も考えられ、今回作業を見せていただいた方のように、熟練した技術での素早い摘出方法が現状では最適であると考えられた。枝肉では、水での洗浄作業により汚染を拡大する可能性もあるため、今後さらに検討が必要である。まな板・包丁の柄などの器具についても、差が認められなかった。これは、器具の材質(木製)や表面の無数の傷(の中に潜む汚れや菌)によって殺菌効果が減殺されること、液体による消毒については、表面張力によってまな板の細かい傷にまで浸透しないためと考えられ、熱湯による浸透効果の利用が一番効果的と考えられた。その場合も、40℃の温湯を用い、洗剤で洗浄し、汚れを除去する工程を先に実施しなければ。タンパクや油脂の凝固により細菌が保護される結果となる。スライサーの刃、ガイドで細菌の繁殖が見られたが、ステンレス製で表面が平滑であることから、アルコール消毒は効果的と考えられる。現状

で、使用されている状況で今回の検出結果であることから、使用後には上記と同じように40℃の温湯で洗浄することが必要と考えられた。そのほか、クレーンボタンのビニールかけや室内の定期的な洗浄消毒により、汚染レベルの減弱に有効と考えられた。

煩雑な作業を伴うことなく、使用できる殺菌水や使用方法によっては有用性を見出すことができるが、基本は適温による洗浄作業により、汚れをよく落とす、作業工程の要所で器具や手指を洗浄消毒などを着実に実行していただくことが肝要であろうと思われた。

6-1. 検索で得られる論文のうち、ヒトの血清学的疫学調査および野生動物の血清学的疫学調査をともに包含する内容を満たす論文は論文は少なかった。その理由として、大きく以下の3つが考えられる。

①感染から発症まで時間が長い条虫症などは、感染源の特定が極めて難しいと考えられる。

②カンピロバクターやサルモネラは症状が軽度、または一般的であるため病院に行かない可能性が考えられる。また、たとえ来院しても、対処療法を行った後原因追究を行わない可能性が高いと考えられる。

③カンピロバクターやサルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 などは食肉検査を通過した食肉にも一般的に付着しているため、たとえ感染したとしても、野生動物由来であるか否かの特定が難しいと考えられる。それに対してトリヒナ等の寄生虫症はと畜場での検査によって全廃棄されるため、感染源の特定が比較的しやすい。

④なお、上記の条件に当てはまらないトリヒナの症例報告は極めて多かった。

6-2. 各国の規制はガイドライン中心であったが、狩猟による鳥獣肉の利用は自家消費の考え方を中心としており、商業目的以外は一律の法規制は困難と考えられた。

## E. 結論

1. 野生動物由来食肉を食べて病気になった人々の大部分が生食をしていたことから、人へのリスクは大きく、捕獲、処理方法および調理方法について関係者すべて、とくにハンターと喫食者への普及教育が重要であることが示唆された。

2-1. *Erysipelothrix* 属菌に感染している、ま