

truncata, *S. silva*, sp.HM050622、
*S. hjorti*の6種が検出されたことから、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫の種多様性が示された。先に研究されていたウマとの大きな違いは、ウマからは *S. fayeri* のみが検出された事に対して、シカからは一個体かた6種もの住肉胞子虫が検出されたことである。これは、ウマとシカという動物種の相違によるものと考えられるが、ウマ以外の宿主動物を考慮すると、ウシに寄生する *S. cruiz*, *S. hominis*, ブタに寄生する *S. sui hominis*, ヒツジに寄生する *S. tenella* などが例に挙げられるとおり、これらの動物では優先種が決まっており、多くとも2種類程度であることから、本研究結果は、シカとそれ以外の草食動物という違いより、野生動物と家畜動物における相違という事が考えられる。住肉胞

子虫は、草食動物と肉食動物を宿主に持つ二宿主の原虫であるため、中間宿主である草食動物の感染は終宿主動物との接触無しには成立しない。この感染経路を考慮すると、生息区域を管理された家畜動物に比べ、自然下で成育している野生動物には他の動物種との接触機会が非常に多いため、それぞれの動物が異なる住肉胞子虫の終宿主であったとすれば相当数の種類の住肉胞子虫に混合感染する可能性が推察される。このように、本研究結果から、我が国の野生ニホンジカには家畜で見られない種の住肉胞子虫が感染している事が確認された。しかも同様の食中毒を発症させるウマ寄生の *S. fayeri* とも異なっているため、これまでに提案されている *S. fayeri* の検出法を転用するのではなく、ニホンジカに特化した検出法

が必要であることは明白である。本研究では、エゾシカを試料として定量的リアルタイム PCR 法を考案した。ニホンジカの混合感染を確認した結果から、定量するためには、これらの混合感染種を全て検出する必要があったため、定性検査にて明らかにされた6種の住肉胞子虫の18SrRNA 遺伝子配列に共通する領域を標的とした。リアルタイム PCR はコンベンショナル PCR と異なり、標的領域を 100~200 bp 程度の短い領域に設定する必要がある。住肉胞子虫の他の遺伝子を非特異的に増幅させることなく、アニーリング温度が適切なプライマーを設計できる部位は 18srRNA 遺伝子領域の 1135 番 bp から 1205 番 bp までの 71 bp という短い領域に限定されたことで、リアルタイム PCR 法による増幅条件も短い伸張時間に設

定することが出来た。このことは、定量検査に掛かる時間を短縮できる事を意味しており、実際の検査現場では非常に効率的な検査法となる事が期待できる。Primer3 ソフトウェアを用いたプライマー設計では、同じ領域に対して3種類のプライマーペア候補があったが、その中にも僅かながら Ct 値に誤差が生じ、比較した結果として最も安定性・信頼性・特異性の高いプライマーを選出する事が出来た。陽性対照を用いて作成した検量線も決定係数 R^2 値が 0,998 と非常に 1 に近いことから、精度の高い定量方法であることが示される。実際にニホンジカの試料から抽出したゲノム核酸を用いて本研究で国立舌定量的リアルタイム PCR 法を行ったところ、全てのピークが揃った融解曲線を得られたことから、プライマーが標的領域

に特異的に結合し、非特異増幅することなく、PCR 反応が完了した事が確認できる。また、同時に得られた Ct 値と用いたゲノム核酸の濃度との関係がきれいな一次関数を示す直線で示されたことから、本試験法の正確な定量性と安定性が認められる。

E. 結論

以上のように、本研究では、これまで確立されていなかった、野生ニホンジカに寄生する住肉胞子虫を特異的に定量するリアルタイム PCR 法を確立した。今後、食肉として利用される機会の増えるニホンジカの食肉衛生管理の観点からは、食中毒危害性が想定される住肉胞子虫の検査は不可避であるため、精度が高く迅速に定量が出来る本検査法は今後のジビエの検査段階で非常に大きな役割を果たす事が考えられる。また、いまだに未知

の部分が多い国内野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の疫学調査についても、個体に感染している寄生虫密度の相違は興味深い因子であるため、本検査法は学術的な面にも多大な貢献が期待できる。

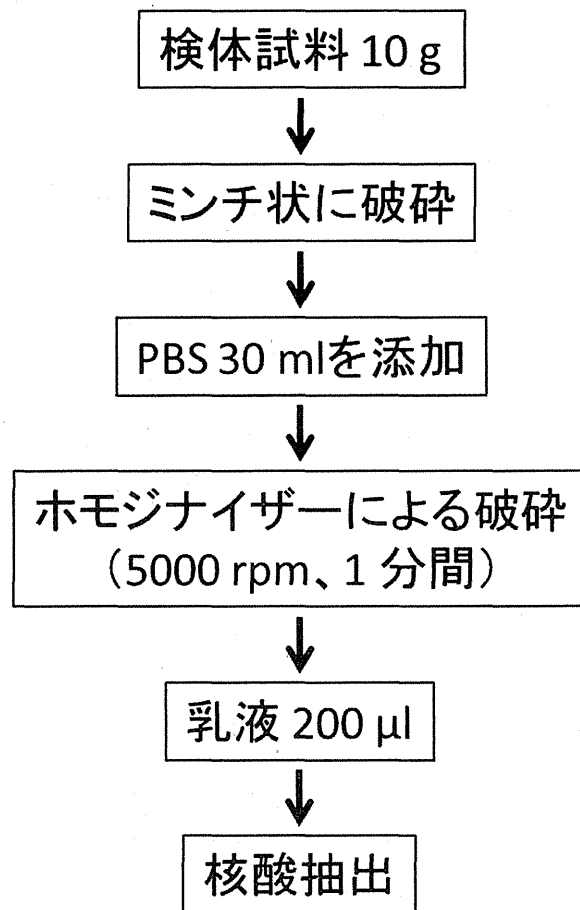


図5. 試料からの住肉胞子虫ゲノム抽出法

表 1 8. 住肉胞子虫 1 8 SrRNA 検出用プライマー配列

primer	sequence
18S1F	GGATAACCGTGGTAATTCTATG
18S11R	TCCTATGTCTGGACCTGGTGAG

表 1 9. 住肉胞子虫 1 8 SrRNA 検出用定性 PCR 反応液構成

GeneAce SYBR qPCR Mix α	12.5 μl
Primer Forward	0.25 μl
Primer Reverse	0.25 μl
サンプル核酸溶液	2.5 μl
RNase Free dH ₂ O	9.5 μl
Total	25 μl

表 2 0. 住肉胞子虫 1 8 SrRNA 検出用定性 PCR 条件

condition	temperature	Time
Initial denaturation	94°C	3分間
Denaturation	94°C	30秒間
Annealing	60°C	60秒間
Extention	72°C	60秒間
Final extention	72°C	5分間
Cooling	4°C	保持

} 30 サイクル

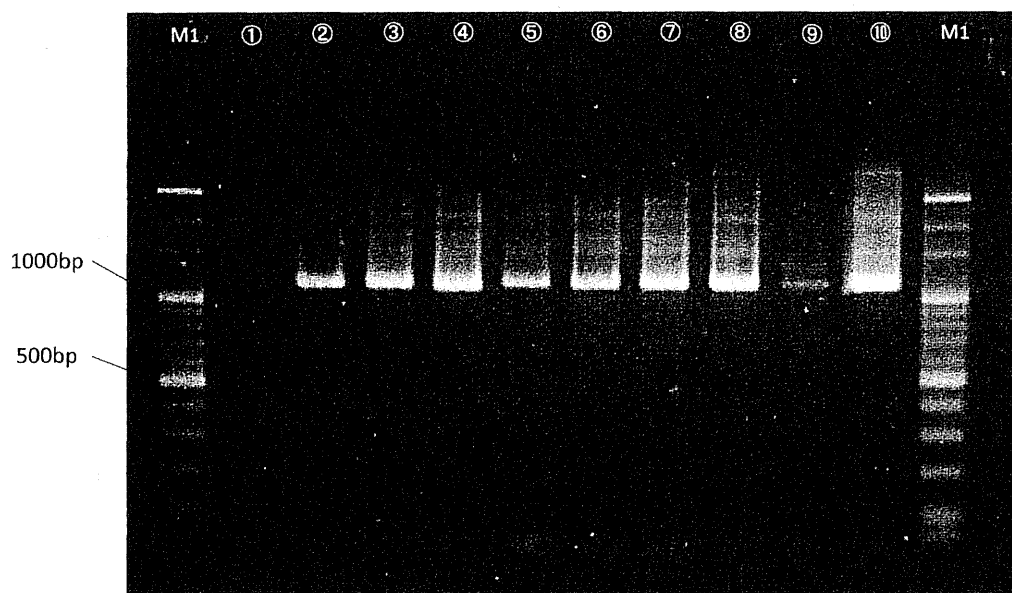


図6. エゾシカ試料からの住肉胞子虫 18 SrRNA 検出用定

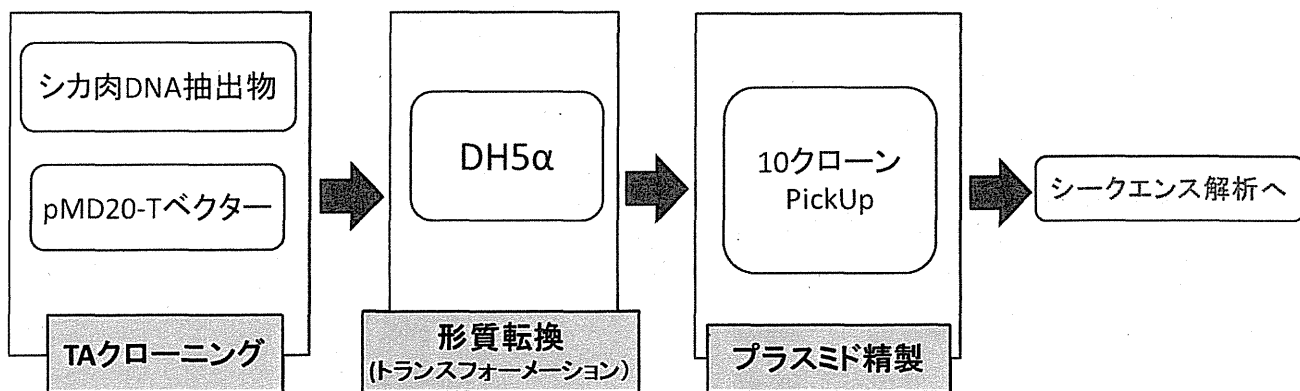


図7. エゾシカ由来住肉胞子虫 18 SrRNA 遺伝子塩基配列

DM-1-1 Consensus 配列

1 60
AATGATGGGAATCTAAACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA
GTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGATGAATT
CTGGCATCTAGTATCCCTAATATGGTCACGATTTTCAGTAATCGTGACTTCTTATTAGGG
ATAATACAGTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTGAAGCAGGCTTGTTGCCTTGAATACT
GCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAAAT

DM-1-2 Consensus 配列

1 60
GTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTTATTTCTAGTGATTGGAATGATGGGAATCCA
AACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
GCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCTGCTG
GAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTTCACCTTGATGAATTCTGGCATTTACGATC
CCTAATATGGTCACGATTTTCAGTAATCGTGACTTCTTATTAGGGATAATACAGTTACTT
TGAGAAAATTAGAGTGTTTGAAGCAGGCTTTTTGTGGCCTTGAATACTGCAGCATGGAAT
AACAAATATAGGATTTTCGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAAATAATGATTAATAG
GGACAGTTGGGGG

DM-1-5 Consensus 配列

1 60
AATGATGGGAATCTAAACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA
GTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGATGAATT
CTGGCATCTAGTATCCCTAATATGGTC*CGATTTTCAGTAATCGTGACTTC*TATTAGGG
ATAATACAGTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTGAAGCAGGCTTGTTGCCTTGAATACT
GCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTTCATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAAAT
A

図8. エゾシカ由来住肉胞子虫 1 8 SrRNA 遺伝子塩基配列

DM-1-6 Consensus 配列

1 60
 TGGCGATAGATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTAGTGTATTGGACTAC
 CCGTGGCAG*GACGGGTAACGGGGG*ATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAA
 ACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGA
 GGTAGTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTTATTTCTAGTGATTGGAATGATGGGAA
 TC*AAACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
 TCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCT
 GCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGATGAATTCTGGCATCTAC
 GATCCCTAATATGGTC*CGRTTTTCAGTAATCGTGACTTCTTATTAGGGATAATACAGTT
 ACTTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTGTTCCTTGAATACTGCAGCATGGAA
 TAACAATATAGGATTTCCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAA*TAATGATTAATA
 GGGACAGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTGTTAAAG
 ACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG
 GGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATA
 GGAAAATGTCACTGTTTCGACTTCTCC

DM-1-9 Consensus 配列

1 60
 CGATAGATCATTCAAGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTAGTGTATTGGACTACCG
 TGGCAGTGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG
 CTACCACAT*TAAGGAAGGCAGCAGGCCGCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGAGGTA
 GTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTTATTTCTAGTGATTGGAATGATGGGAATTTA
 AACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA
 GCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATGTCTGCTG
 GAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTGTAGGGTGTGCACTTGATGAATTCTGGCATCTATGTC
 **AATGTAATACGGCGACGGTGTATATGGGTTAATCCTATATACCCGTTTTTGTATATTA
 TATTGGGATAATACCGTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTAATTGCCTT
 GAATACTGCAGCATGGAATAACAATACAGGATTTCCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGA
 CTGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAA
 TTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCATTA
 TCA

図8. エゾシカ由来住肉胞子虫 18 SrRNA 遺伝子塩基配列

DM-1-10 Consensus 配列

1 60
 CAATCCTGACTCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTTATTTCTAGT
 GATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTTAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTG
 CCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG
 CTCGTAGTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTGA
 TGAATTCTGGCATCTATGATCCCTAGTACGGTCACGATTTTCAGTAATCGTGACTTCTTA
 TTAGGGATAATACAGTTACFTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTGTGCTTG
 AATACTGCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGAC
 TGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTC**AGGTGAAAT
 TCTTAGATTTGTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTTCATTAAT
 CAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
 TATGCCGACTAGAGATAGG

図8. エゾシカ由来住肉胞子虫 18 SrRNA 遺伝子塩基配列

Clone	<i>Sarcocystis</i>					
	<i>tarandi</i>	<i>elongata</i>	<i>truncata</i>	<i>hjorti</i>	<i>silva</i>	etc.
DM-1-1	12	9	6			
DM-1-2	11	10				
DM-1-5	12	9				
DM-1-6	12	10	9		3	5(sp.HM050622)
DM-1-9				4		
DM-1-10	12	10	6			2(sp.HM050622)

図9. BLASTによる98%以上を示した相同性検索結果

TTGCCTTGAATACTGCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTTCTATTTTG
 TTGGTTTCTAGGACTGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTAT
 TTAAGTGTGAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAG
 CATTTGCCAAGGATGTTTTTATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGAC
 GATCAGATAACCGTCGCTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATAGGAAA
 ATGTCACTGTTT**CGACTTCTCCTGCACCTTATGA**GAAATCAAAGTCTTTGGGTT
 CTGGGGG**GAGTATGGTCGCAAGGCTGAA**ACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAC
 CACCAGGCGTGGAGCCTGCGG

Forward

Reverse

図 1 0. 全てのクローンに共通する *Sarcocystis* sp. 18srRNA 共通配列

Primer Pair	Sequence	
DMScommon 1	Sarco.deermeat 1-F	CGACTTCTCCTGCACCTTATGA
	Sarco.deermeat 1-R	TTCAGCCTTGCGACCATACTC
DMScommon 2	Sarco.deermeat 2-F	CGACTTCTCCTGCACCTTATG
	Sarco.deermeat 1-R	TTCAGCCTTGCGACCATACTC
DMScommon 3	Sarco.deermeat 3-F	TTTCGACTTCTCCTGCACC
	Sarco.deermeat 1-R	TTCAGCCTTGCGACCATACTC

図 1 1. 共通配列を標的としたリアルタイム PCR 用プライマー候補

表 2 1. 定量的リアルタイム PCR 法反応条件

Initial denaturation	95 °C	10 分間
Denaturation	95 °C	30 秒間
Annealing	60 °C	60 秒間
Extention	72 °C	60 秒間

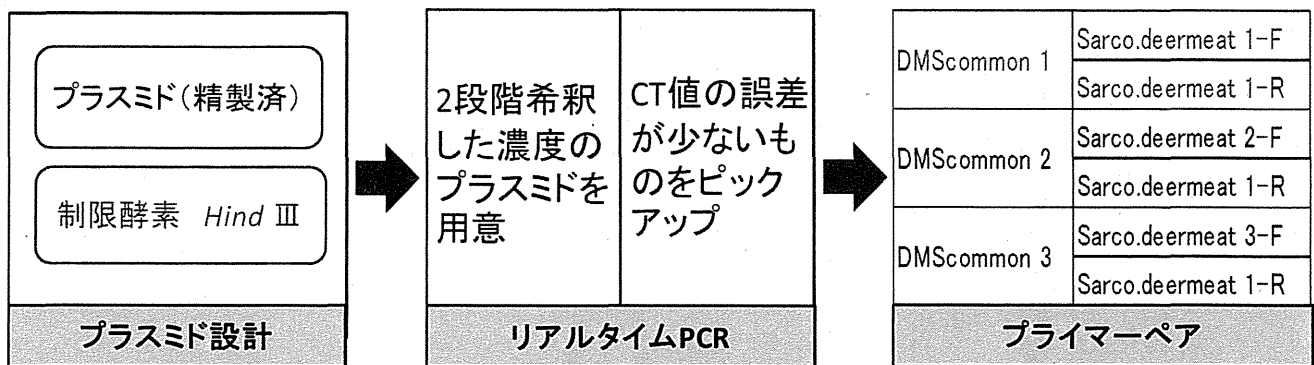


図 1 2. 定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照の選定方法チャート

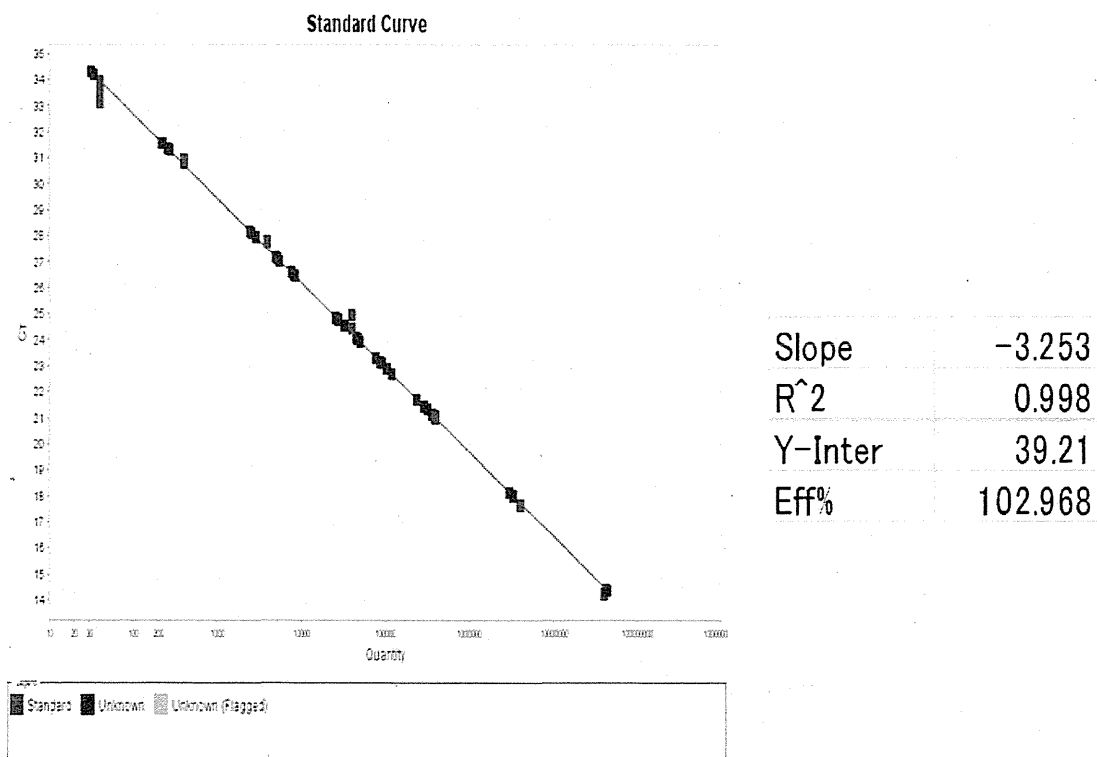


図 1 3. 定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照による検量線

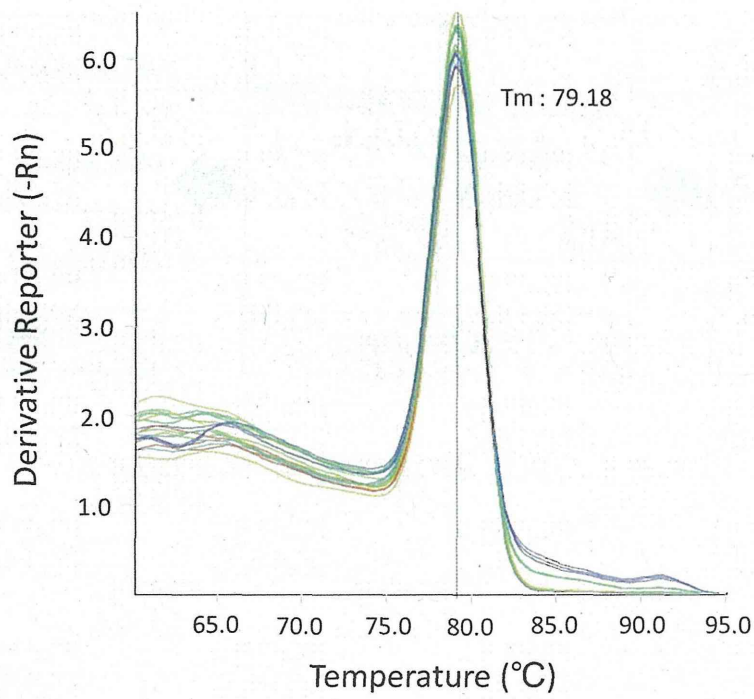


図 1 4. 定量的リアルタイム PCR 法による融解曲線

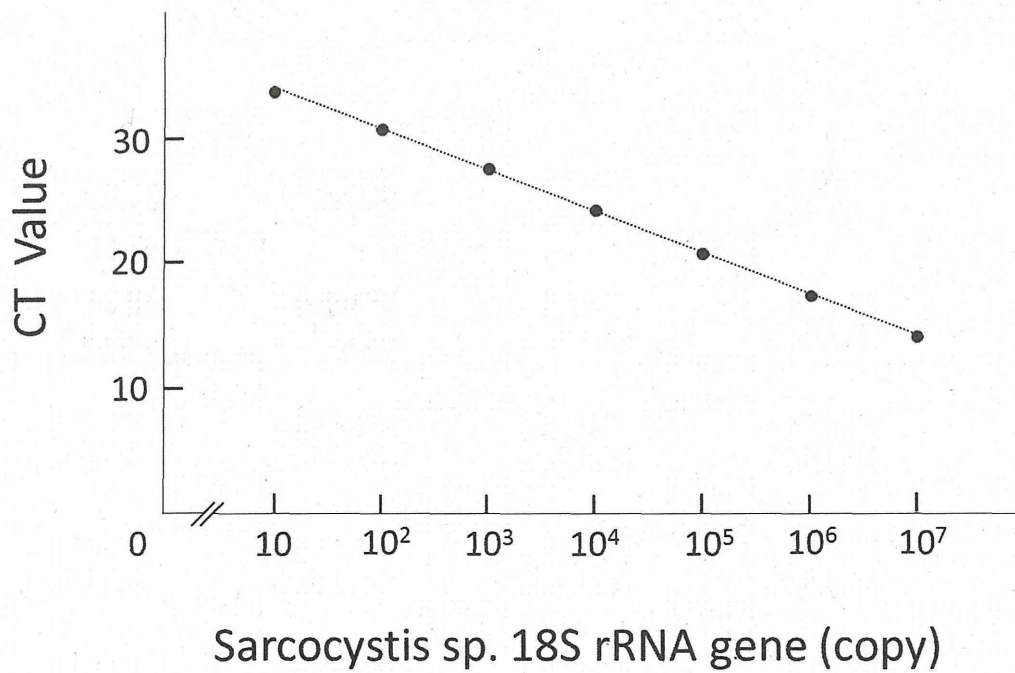


図 1 5. 定量的リアルタイム PCR 法による試料コピー数と Ct 値の相関

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)

研究報告書

代表研究者 山崎朗子 (岩手大学 農学部獣医公衆衛生学研究室)

野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の疫学調査：北海道エゾシカでの実地調査

要旨

住肉胞子虫属は種が非常に多く、世界中に分布しており、それぞれの種についての感染宿主も異なっている。中間宿主となるのは概ね草食動物であるが、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギなどの家畜動物にもシカなどの野生動物にも広く感染する。基本的には住肉胞子虫は種ごとに優先宿主が決まっているが、我が国の野生ニホンジカでは住肉胞子虫が混合感染している事が明らかにされた。野生ニホンジカについては、獣害被害対策の一環としてジビエとしての食肉利用が推進されているが、生食により食中毒事例を過去に起こしている。この食中毒は、以前に生食用馬肉で発生した事例と同様に住肉胞子虫を原因としていたが、生食用馬肉では危害性基準が食肉 1 g あたり 10^6 遺伝子コピーと算出されたのに対し、シカ肉では同様の基準は提言されなかった。

そこで、本研究では、国内で採取した野生ニホンジカの疫学調査を目的とし、野生ニホンジカ肉における住肉胞子虫の定量的検査法を用いて、ニホンジカにおける住肉胞子虫の陽性率および寄生密度について、様々な要因との関連解析を行った。

その結果、北海道由来のエゾシカ 89 検体には全て住肉胞子虫が感染していることが分かった。その遺伝子コピー数は試料 1 g あたり、 1×10^5 から 1000×10^5 と検体によって非常に大きな幅がある事がわかった。この結果は、生食用馬肉で有症事例を起こした試料の $\sim 60 \times 10^5$ /g というコピー数と比較しても決して少なくない。これらの検体ごとの差について、地域、性別、年齢の各要因について解析したところ、地域、年齢で 1 個体あたりの遺伝子コピー数が異なっていたのに対し、性別は大きな差は認められなかった。

本研究は、野生ニホンジカ由来住肉胞子虫の詳細な疫学解析を遺伝子情報に基づいて行い、その結果から、ヒトへの危害性について検討した。ニホンジカに存在する住肉胞子虫を定量的に示した本研究結果は国内野生ニホンジカにおける初の疫学研究報告として学術的に非常に大きな意義があるだけでなく、ジビエ産業の振興が望まれる現状において、特に主要な部分を占めるシカ肉に関するものであるため、ジビエの安全な食肉利用を目的とする今後の食用野生獣肉衛生管理策を講ずるにあたって、多大な貢献が期待できる。

A. 研究目的

住肉胞子虫属は種が非常に多くまた、世界中に分布しており、それぞれの種についての感染宿主も異なっている。中間宿主となるのは概ね草食動物であるが、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギなどの家畜動物にもシカなどの野生動物にも広く感染する。基本的には住肉胞子虫は種ごとに優先宿主が決まっているが、本研究の前項にて、我が国の野生ニホンジカでは住肉胞子虫が混合感染している事が明らかにされた。野生ニホンジカについては、獣害被害対策の一環としてジビエとしての食肉利用が推進されているが、生食により食中毒事例を過去に起こしている。この食中毒は、以前に生食用馬肉で発生した事例と同様に住肉胞子虫を原因としていた。しかし、生食用馬肉では危害性基準が食肉 1 g あたり 10^6 遺伝子コピーと算出されたのに対し、シカ肉では同様の基準は提言されなかった。その理由は、ニホンジカに寄生する住肉胞

子虫の定量的試験法が存在しなかった事に尽きる。生食用馬肉における住肉胞子虫については、感染している住肉胞子虫が *S. fayeri* であることが明確にされたため、*S. fayeri* を標的にした定性的、および定量的試験を行うことで解決できたが、ニホンジカ肉については感染種が明らかになっていなかったため、*S. fayeri* 検査法を転用するほかなく、定性試験を行うにとどまっていた。本研究者は本研究前項にて野生ニホンジカ肉における住肉胞子虫の定量的検査法を確立した。野生シカ肉では未だ住肉胞子虫の食中毒危害性基準が明らかにされる以前に、一頭における感染密度すら分かっていない。そこで、本研究では、国内で採取した野生ニホンジカの疫学調査を目的として、前項で確立した定量的試験法を用い、ニホンジカにおける住肉胞子虫の陽性率および寄生密度について、様々な要因との関連解析を行った。

B. 研究方法

本研究では我が国で採取された野生ニホンジカから、北海道内の道北、道東、道南の3地域由来のエゾシカ試料 89 検体を供試した。試料からの核酸抽出は、厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法に準拠して行った。定量的検査法は、前項「野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の疫学調査：18SrRNA を標的にした定量的リアルタイム PCR 法の確立」で確立したリアルタイム PCR 法を用いて同様に行った。

各検体試料について試料中の住肉胞子虫を定量し、検量線を元に遺伝子コピー数を算出した。得られた遺伝子コピー数について、数値の高低に関わる因子の解析を行った。本研究試料については、試料の由来する地域、性別、年齢の3要因について各群における遺伝子コピー数を LOG 値で示し、比較解析した。

C. 研究結果

本研究で使用した試料は、北海道内の道北、道東、道南の3地域に由来する。各地域間の距離は道北地域と道東地域が 280 km、道東地域と硬軟地域が 300 km、道南地域と道北地域が 370 km であるため、この距離を一つの群れが往来することは困難であると考えられる事から、3つの独立した地域と考慮した(図16)。得られた試料検体数は、全部で 89 検体であった。性別に分類すると、雄 32 検体、雌 57 検体であり、地域別の分類では道北地域から 15 検体、道東地域から 15 検体、道南地域からは 59 検体であった。試料検体の個体年齢は、0 歳が 9 検体、1 歳が 20 検体、2 歳が 12 検体、3 歳が 17 検体、4 歳が 20 検体、5 歳が 8 検体、6 歳が 1 検体、8 歳が 2 検体であった(表22)。

89 検体すべての検体試料を用いて住肉胞子虫の定性検査を行った結果、全試料に住肉胞子虫 18SrRNA の標的領域 1100 bp の増幅が確認された(陽性率

100% : 89/89)。

続いて、各検体試料について定量的リアルタイムPCR法にて定量したところ、試料1gあたりの遺伝子コピー数は、最小値が 0.6×10^5 、最大値は 6014×10^5 、平均値は 343×10^5 、中央値は 79.3×10^5 であった。地域ごとに分類した群では、道北では最小値が 5.8×10^5 、最大値は 224.7×10^5 、平均値は 76.3×10^5 、中央値は 79.3×10^5 であった。道東では最小値が 52.2×10^5 、最大値は 3700.5×10^5 、平均値は 630.1×10^5 、中央値は 272.3×10^5 で、道南では最小値が 0.6×10^5 、最大値は 6014×10^5 、平均値は 338×10^5 、中央値は 44×10^5 であった(表22)。供試検体全体の遺伝子コピー数の分布は1gあたり 10×10^5 から 500×10^5 にかけて多く、 100×10^5 が最も多かった(図18)。

これらの結果を地域別に比較してみると、道北地域群では比較的コピー数の小さい検体が多く、一方で道東地域群では大きい検体が多い。また、道南地域群で

はそれらのどちらでもなく、小さい検体から大きい検体まで満遍ない分布が認められた(図19)。検体試料由来の性別では雄個体群、雌個体群における遺伝子コピー数の分布は平均値について雄個体群で 334.4×10^5 、雌個体群で 348.4×10^5 、中央値では雄個体群 68.6×10^5 、雌個体群で 79.5×10^5 と、大きな相違は認められなかった(図20)。検体試料由来の年齢については、0歳から8歳までの各年齢群について、1gあたり遺伝子コピー数 10×10^5 から 100×10^5 の間には全ての年齢群に分布するが、最小値および第1四分位数については年齢が上がるにつれ、上昇する傾向が認められた。

D. 考察

ニホンジカは我が国が将来的に強く推進するジビエ産業の中でも特に大きな部分を占める食肉となる。食味、肉質において牛肉や馬肉と類似する点があるため日本人にはなじみやすく、また、脂肪が

非常に少なく赤身で鉄分を多く含むため、健康志向の現代人のニーズにも応えられる価値の高い食肉といえる。このように、質的価値が高く、かつ供給量も十分な主力となり得る食用肉については安全性を担保する衛生管理が不可欠であるが、野生動物であるシカがと畜場法の適用外であることから、現在のところ、食品衛生法でしか規制されていない。そのため、家畜と同等の施設・環境での解体が行われず、衛生検査も受けられないため、食中毒危害性を十分に回避できているとは言いがたい。加えて、前項でも述べたとおり、生活環境の特性により野生動物は家畜動物に比べて非常に多くの微生物に暴露されている。このような背景の中で、野生ニホンジカの食肉による食中毒は発生してしまった。しかも、その病原は、過去に生食用馬肉でも同じ食中毒事例を起こし、最終的には検査法の通知に至らせた住肉胞子虫であった。しかし、シカ肉で起こった食中毒事例では病原体の特

定を行う定性的検出が行われたただけだったため、食中毒を発症させる摂取量などは不明なままであった。このような事例を受け、本研究の前項では、野生ニホンジカ肉の衛生検査の一環として、定量的リアルタイム PCR 法を確立した。そこで本研究では、上記の定量法を用いて疫学的研究の意味合いも含めた実地疫学研究を行った。

対象は北海道内の道北、道東、道南の3地域から採集した野生エゾシカ 89 個体分の試料である。それぞれの採取地は 300 km ほど離れているため、一つの行政区とはいえず、独立した異なる地域由来の群れと考えられる。採取された試料は、雄個体より雌個体が多く、これは、害獣の個体数管理のため、捕獲に当たっては雌個体を優先する事が奨励されているためであると考えられる。また、地域ごとには、道北、道東で 15 検体であるのに対し、道南は 59 検体であることは、獣害の程度と捕獲の必要性は相関してい

るため、同じ期間でも捕獲の頻度が多く、採集試料数も大きくなることに由来する。つまり、人口密度、農地、植林地域等の分布が多いところからの採集数が多かったということになる。捕獲された個体の年齢は、0歳から8歳までと広く分布していたが、6歳、8歳の個体はそれぞれ1検体、2検体と少なく、北海道に分布しているエゾシカの年齢分布を反映している物と考えられた。

これらの試料を用いて定量的リアルタイムPCR法にて試料1g中の住肉胞子虫の18SrRNA遺伝子コピー数を算出したところ、 1×10^5 から 6000×10^5 となり、1000倍の差が認められた。その分布の中でも個体数が多いものは $10 \sim 100 \times 10^5$ の間であった。生食用馬肉の食中毒発症基準値が $1.2 \times 10^6 \sim 6.6 \times 10^6$ であった事を考慮すると、半数近くに危害性が想定されることになる。このような個体間の数値差を決定した要因を解析するため、地域、性別、年齢について、各検体の遺

伝子コピー数を群に分け、数値の分布を検討した。まず、地域要因についての解析は、北海道道北15検体、道東15検体、道南59検体の3群にわけ、それぞれの郡内における遺伝子コピー数を比較したところ、道北群は $5.8 \times 10^5 \sim 224.7 \times 10^5$ 、道東群は $52.2 \times 10^5 \sim 3700.5 \times 10^5$ と、最小値と最大値に一桁ずつの違いがあった。数値分布を確認すると、郡内での分布はどちらも二桁分の分布であるが、全体の絶対値が一桁違っている事が分かる。その事象は、各群の平均値が道北 76.3×10^5 、道東 630.1×10^5 、中央値が道北 79.3×10^5 、道東 272.3×10^5 であることに反映されている。道北、道東の2群に比べて、道南はまったく異なる分布を示し、最小値は 0.6×10^5 と、全体的に数値の小さい道北群より更に小さく、また、最大値は 6014×10^5 と、数値の大きい道東群よりさらに大きかった。これらの相違は、道南群と道北群および道東群との試料数の差に

よることも考えられるが、道北群と道東群は検体数が同じであるにも関わらず、明らかな相違が認められる事から考慮すると、地域による個体の多様性に起因すると考えられる。同様に、性別の影響について検討したところ、このような差異は、認められなかった。こちらについても、雄個体群 32 検体に対し、雌個体群 57 検体という検体数の差を考慮しても分布様相は非常に類似しており、性別による個体あたりの寄生虫量に差はないと考えられる。年齢別においては、幼齢から年を取るにつれ、個体における遺伝子コピー数が大きくなっていく様子が認められた。特に、各年齢群での最小値と第 1 四分位数に着目すると、上昇傾向が明瞭である。住肉胞子虫が中間宿主の筋肉組織内にサルコシストを形成する感染様式を考えると、一度感染した虫体が排出される事は考えにくいいため、感染期間が長くなるにつれ、体内の寄生虫数が増加していくことがこの分布の様相に反映さ

れていると考えられる。また、0 歳の個体については、生後一年経たないうちに既に感染している状況であったが、住肉胞子虫の中間宿主は終宿主から排出されたスポロシストを経口摂取することにより感染するという感染様式から考えると、離乳前の個体が感染している事実は整合しない部分があり、従来以外の感染様式が存在する可能性を示唆している。

以上のように、本研究では北海道のエゾシカにおける住肉胞子虫の実地疫学調査の結果、各個体における感染数には地域、年齢的に相違が認められた一方、性別では大きな相違が認められなかったため、エゾシカの住肉胞子虫感染密度の高低は、地域、年齢要因に起因すると考えられる。年齢による相違は、経年による住肉胞子虫の蓄積が考えられるが、地域については終宿主をはじめとする住肉胞子虫の感染環を形成する種々の因子が地域によって異なっているためと考えられる。本研究で確立された定量的検査法は、

野生ニホンジカに寄生する住肉胞子虫を漏れなく広範的に検出することを目的として考案されているため、算出された遺伝子コピー数はニホンジカ個体内に存在する全ての住肉胞子虫属を合算した値であり、住肉胞子虫の種の違いは反映されない。そのため本研究で明らかにされた地域、年齢における遺伝子コピー数の違いが、一つの種の住肉胞子虫の数が多いのか、種類が多いのかという部分までは確認できない。これらのことを加味すると、地域差に現れたのは、分布している住肉胞子虫の多様性の差である可能性も考えられる。本研究では北海道のエゾシカについての疫学調査であったが、地域による違いが大きく現れていた事を鑑みると、本州のホンシュウジカ、九州のキュウシュウジカのように、地域、宿主種が違えばまた異なる結果が予想されるため、今後も引き続き研究を遂行し、結果を比較検討することが重要である。

E. 結論

本研究は、野生ニホンジカ由来住肉胞子虫の詳細な疫学解析を遺伝子情報に基づいて行い、ヒトへの危害性について検討した。ニホンジカに存在する住肉胞子虫を定量的に示した本研究結果は国内野生ニホンジカにおける初の疫学研究報告として学術的に非常に大きな意義があるだけでなく、ジビエ産業の振興が望まれる現状において、ジビエの安全な食肉利用を目的とする今後の食用野生獣肉衛生管理策を講ずるにあたって、多大な貢献が期待できる。