

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)

代表研究報告書

国内野生シカにおける病原性寄生虫の疫学的研究

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)

要旨

昨今、害畜駆除目的で捕獲された野生動物の肉を食用活用する動きが盛んに行われている。しかし、衛生管理下で肥育されている家畜に比して、衛生環境が大きく異なる野生動物は、家畜が感染する食中毒病原微生物以外にも食中毒の有害物質となりうる有害細菌や、ウイルス、寄生虫など多くの有害微生物が含まれている可能性が高い。事実、野生獣肉喫食による事例が報告されているが、家畜と異なり、寄生虫での危害が目立つ。これは、他の動物とも接触する可能性が大きい自然環境での生育に大きく寄与するものと考えられ、野生動物の大きな特徴である。野生動物はその広い生息環境により各家畜では特異性のある寄生虫が一個体に多重感染している可能性があり、喫食時の危害ばかりでなく、放牧場への侵入等により家畜への感染源となる可能性も考えられるが、これまでに行われた疫学研究は調査地域にはばらつきがあり、地域差も鑑みると十分とは言えない。

本研究では国内各所の野生シカを対象にして、クリプトスポリジウム、住肉胞子虫等の保有率、寄生虫密度を遺伝子検出にて算出した。住肉胞子虫についてはこれまでニホンシカに適應した定量試験法がなかったことを受け、リアルタイムPCR法にて定量する試験法を新規に確立した。これらの手法を用い、全国各地の自治体の協力を得て採集した資料を地域、性別、年齢、季節などの各分類において陽性率、寄生虫密度を遺伝子コピー数として比較検討した。その結果、国内野生ニホンシカにクリプトスポリジウム、および住肉胞子虫が感染していることが明らかになった。さらに住肉胞子虫については、前述の定量的試験法にて寄生虫密度を算出した結果、地域要因による密度の差が認められた。

本研究の成果は、新たな情報として消費者のための食肉汚染回避だけでなく解体、加工従事者の感染防止に関する注意喚起をも観点に入れ、更に安全なガイドラインへ改定する際に大きく貢献でき、また、放牧等の家畜肥育において、家畜の感染防御策のための基盤情報として利用が期待できる。

用いられる実験手法は、既に国立感染症研究所等から通知されている各種病原体検出方法と同様であるため、将来的には各自治体管轄内の病原性寄生虫検出を各自で行うことが可能であると考えられる。また、本研究で新たに確立された定量的試験法についても、原理はリアルタイムPCR法であるため、汎用性があることから、これまでの衛生検査同様に各自治体の検査機関で行うことが出来る。得られた結果については、学術発表やシンポジウムでの発表、論文投稿により国内だけでなく海外へも情報を発信し、周知と活発な情報交換による深い相互理解を期待する。

A. 研究目的

近年、多くの地域で野生鳥獣が個体数調整されており、これらの肉を有効活用する地域振興事業が行われている。野生鳥獣はと畜場法の対象外であることから、個々に作成したガイドラインに従って検査されてきたが、衛生環境管理下にある家畜に比べ、野生鳥獣は衛生面で大きく異なるため、家畜では見られない病原微生物や危害物質に暴露される可能性が大きい。国内ではこれまでも野生獣肉の喫食による食中毒例が既に報告されており、その病原体も、細菌、ウイルス、寄生虫と広範囲にわたっている。これらの事例を基とした野生鳥獣の病原体保有状況の報告から、家畜とは異なる病原微生物保有が認められた。また、馬肉で事例を出した住肉胞子虫も、ニホンジカでの保有が報告されている。本研究代表者はこれまで野生ジカにおけるクリプトスポリジウムの調査を行っており、国

内の数カ所で 0% ~ 18% という陽性率を確認している。このように、家畜では特異性のある寄生虫が野生動物では多重感染している可能性があり、喫食時の危害に加え、家畜への感染源となる可能性も考えられる。しかしこれまでに行われた疫学研究は、調査地域のばらつき、検体数の数などの点からも十分でない。そこで本研究では、更に広い範囲での野生ジカにおける病原寄生虫の保有率を明らかにすることを目的とした。本研究代表者は、これまでの調査でシカ試料採取ネットワークが既に構築されているため、効率的な進行が見込めることから本研究の発案に至った。

まず、本研究においては、野生シカが保有している感染性危害性寄生虫の保有状況を調査する。地域差や家畜との感染伝播等についても調査を進め、二四季を通して調査を行うことにより、季節性の有無や妊娠個体や幼獣も対象

として垂直感染動態や若齢による感染性の相違を確認する。

・本研究の特色・独創的な点

食肉の危害性微生物というと細菌とウイルスに注目しがちだが、野生動物では寄生虫での危害が目立つ。これは、他の動物と接触する自然環境での生育によるものと考えられ、大きな特徴である。その広域な生息行動は、一方の家畜施設で発生した病原微生物を他方へと伝播する可能性も孕む。危害性微生物の中でも寄生虫に焦点を当てた本研究は、野生動物の特徴を捉えており、ジビエの安全性確保には不可欠な情報となる点でも非常に重要である。

・期待される成果

本研究の成果は、これまでに各所で作成されたガイドラインに新たな情報として組み込み、消費者のための食肉汚染回避だけでなく解体、加工従事者の感染防止に関する注意喚起をも観点に入れ、更に安全なガイドラインへ改

定する際に大きく貢献できると考えられる。また、今後のさらなる安全な野生獣肉の食肉利用とその拡大に寄与し、地域産業の振興を促すことで農林被害の補填となるだけでなく各自治体の新たな財源ともなりうる。家畜動物への病原体伝播に関して野生動物が感染源もしくはベクターとして関与する可能性が明らかになれば、放牧等の家畜肥育において、家畜の感染防御策のための基盤情報として利用が期待できる。

本研究で用いられる実験手法は、各自治体で行っている既存の各種病原体検出方法と同様であり、既に国立感染症研究所等から通知されているため、将来的には各自治体管轄内で捕獲された野生動物の病原性寄生虫検出を各自で行うことが出来、より早く情報を得ることが出来ると考えられる。本研究で得られた結果については、学術発表やシンポジウムで発表の機会を持ち、直接の周知と注意喚起に努め、また、

論文投稿により海外へも情報を発信することで、より広く貢献出来るものと考えられる。

B. 研究方法

野生動物として本研究ではシカを用いる。

研究試料は、糞便、横隔膜、季節によっては妊娠個体の胎盤、胎仔を採取する。試料採取は各県の処理施設や猟師の協力のもと行う。

1. 試料採取地域の決定

1) 場所

調査場所は、積極的に野生ジカの駆除と食肉利用を行っている地域にサンプリング協力を依頼する。保有個体の統計的比較解析に用いるため、一地域あたり 40~50 頭分の試料を採取し、雌雄の偏りが無いよう配慮する。また、これまで調査を行ってきた地域については、更に細かい地域での比較の為、

サンプリングを続ける。

2) 季節

調査地域の決定と共に、各地において年間を通して試料を採集し、季節変動を確認する。とくに、雌個体については、住肉胞子虫の垂直感染の確認の為、繁殖期の妊娠個体は胎盤および胎仔も採集する。また、クリプトスポリジウムについても、感染感受性または抵抗性の確認の為、5~7 月の幼獣期の試料採集を配慮する。

2. 遺伝子検出法と種同定

1) クリプトスポリジウムの検出法

国立感染症研究所による「クリプトスポリジウム症・ジアルジア症等の原虫性下痢症」に準拠して糞便中のクリプトスポリジウム原虫を濃縮する。濃縮原虫から QIAGEN mini stool kit を用いて核酸を抽出し、18S リボソーム RNA を標的とした市販のクリプトスポリジウム検出キット（例 .

Cycleave®RT-PCR Cryptosporidium (18S rRNA)Detection kit) に従い、RNA 逆転写の後リアルタイム PCR を行う。Ct 値から、検量線を基にオーシスト数を算出する。陽性検体については、18S リボソーム RNA の塩基配列から、BLAST を用いて相同性検索を行い、種同定を行う。また、免疫染色した後、顕微鏡検査によって虫体を確認する。

2) 住肉胞子虫の検出法

厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法に準拠し、陽性検体を検出する。種同定については、18S リボソーム RNA の塩基配列を解析し、BLAST による相同性検索により決定する。また、18S リボソーム RNA を標的とした定量的 PCR 法によって検量線をもとにブラディゾイド数を測定する。顕微鏡検査によりシストとブラディゾイドを確認する。

家畜動物を自然宿主に持つ種が検出された場合、可能であれば生息域近隣の

家畜施設の調査を検討し、野生ジカが病原性寄生虫の感染源およびベクターとなる可能性を検討する。

全ての危害性評価に関する実験は申請者の所属機関である国立医薬品食品衛生研究所内で行い、実験で使用した消耗品や廃棄物はオートクレーブにて滅菌消毒の後に廃棄する。申請者の所属部署である衛生微生物部は特定病原微生物取り扱い区域および P 2 実験室を備え、原虫をはじめとする各種病原微生物の遺伝子検出設備、培養設備、また、分子生物学的・形態学的手法において必要な実験器具・機器等を備えている。

3. 統計的解析による比較検討

上記の調査結果から、全国に分布するニホンジカでのクリプトスポリジウム、住肉胞子虫の保有率、特に人や家畜に対して毒性の強い種に関する比較解析を行う。主には、地域差、雌雄差、シ

カの種別（エゾシカ、ニホンジカ等）季節差について、各群の陽性率平均値を fisher の正確確立検定によって検討する。寄生密度については各分類での中央値を用い、雌雄差などは Mann-Whitney の U 検定を、三群以上の比較では Kruskal-Wallis 検定により有意差を検討することで、各群での寄生虫保有率・寄生濃度の傾向を明らかにする。

4 . 垂直感染についての調査

繁殖期の妊娠個体について、胎盤からの住肉胞子虫の検出を試みる。個体間での感染虫密度の確認の為、検量線からブラディゾイド数を同様に算出する。また胎盤での寄生を確認する為、蛍光抗体で免疫染色し、蛍光顕微鏡下で鏡検し、住肉胞子虫の垂直感染の有無を確認する。

以上の結果を全て統合し、寄生虫について、安全なジビエの供給に寄与するとともに、野生ジカの生息域に重複

する家畜施設については、家畜に対する感染症伝播の防疫策を考える。

C. 研究結果

1 . これまでの調査地域の整理と新たな試料採取地域の決定

1) 場所

上記については、害獣対策を精力的に行っている地方自治体に研究協力を申し出た結果、千葉県、静岡県、山梨県、三重県、滋賀県、京都府、長崎県、熊本県、宮崎県と北海道の計 10 道府県から試料提供を受けられた。

2) 季節

上記については、基本的には通年の依頼を行ったが、実際には猟期の関係や、通年狩猟許可の有無、季節柄の気候による狩猟の困難さ等の諸条件により、各県でばらつきが出た。

本年度の結果としては、千葉県 13 頭、静岡県 45 頭、山梨県 42 頭、三重県 25 頭、滋賀県 23 頭、京都府 29 頭、長崎

県 51 頭、熊本県 19 頭、宮崎県 5 頭、北海道 89 頭分の試料を採取できた。現段階で計 341 頭分である。雌雄差は全体で雌 181 頭、雄 156 頭、不明 4 頭であり、おおむね偏りのない比率といえる。

糞便試料としては、北海道を除く本州および九州の 232 頭分、横隔膜・筋肉試料は千葉県、山梨県、三重県および奈良県、長崎県、北海道からの 161 頭分が得られた。

2 . 遺伝子検出と種同定

(1) クリプトスポリジウムの検出

上記については、研究計画書のとおり実験を行い、問題なく糞便中のクリプトスポリジウム原虫の濃縮、核酸抽出、18S リボソーム RNA を標的としたクリプトスポリジウム属原虫の検出ができた。その結果、千葉県 9.1 % (1/11)、静岡県 15.6 % (7/45)、山梨県 2.4 % (1/42)、京都府 17.2 % (5/29)、三重

県 0 %、滋賀県 0 %、宮崎県 20.0 % (1/5) という陽性率が確認された。雌雄間では雄 8.9 % (11/123)、雌 4.1 % (5/122) であった。これらの陽性検体について塩基配列を解析したところ、*Cryptosporidium* sp. deer genotype、*C. ryanae*、*C. bovis* であり、シカ固有種に加え、ウシ由来の種が感染していることが分かった。

これらのことは、野生ニホンジカが家畜であるウシと同種の寄生虫に感染すること、ひいては、家畜に有害な病原体の運び屋になる可能性を示唆する。

以後、残りの試料についても同様に解析を進め、統計解析を行う予定である。

(2) 住肉胞子虫の検出

上記についても、研究計画書のとおり実験を行い、住肉胞子虫の核酸抽出および住肉胞子虫由来の 18S リボソーム RNA を検出、および定量することができた。その結果、北海道の検体で

100 % (89/89) の陽性率が確認された。

(3) 住肉胞子虫の定量法の確立

ニホンジカの住肉胞子虫の検査法については、これまでウマに寄生する *Sarcocystis fayeri* の検査法を転用するにとどまり、適応した定量的試験法は確立されていなかった。そこで本研究では、*Sarcocystis fayeri* の検査法にてニホンジカ試料中の住肉胞子虫 18SrRNA を増幅し、その配列を解析した後に標的領域を特異的に増幅できる定量的検査法を確立した。試料は北海道由来のエゾシカ試料を用い、住肉胞子虫 18SrRNA 領域の塩基配列を解析したところ、1 個体由来の試料から、6 種の住肉胞子虫が検出された。この 6 種に共通して存在する配列を探索したところ、399 bp の共通配列が見つかった。この中で、リアルタイム PCR 法による増幅に適する 100 bp 程度の配列を特異的に増幅できるプライマーを設計

したところ、71 bp の配列を標的とするプライマーペアが設計された。この配列の長さでプライマーペアの GC 含有率を考慮して、伸長反応時間、アニーリング温度を決定した。陽性対象については、住肉胞子虫 18SrRNA 全長をライゲートしたプラスミドを用いた。制限酵素で切断した後、リアルタイム PCR 法にて試験し、検量線を作成し、決定係数 R^2 値を確認した。試験法の安定性と感度を確認するため、濃度の異なる試料を試験し、融解曲線がシングルピークであることと、計測された Ct 値と試料濃度が高い相関性を示すことを確認した。

(4) 住肉胞子虫の定量法を用いた実地疫学

前述で確立した野生ニホンジカに適応した定量的リアルタイム PCR 法を用いて、北海道由来の試料の疫学解析を行った。その結果、北海道由来の 89 検

体は全て陽性であった。定量的試験法で定量した結果、少ないものは 1×10^5 /g、多いものは 1000×10^5 /g と 1000 倍の差が認められた。これらの数値を、地域、性別、年齢でそれぞれ群に分けて解析したところ、地域間でのシカ肉中の遺伝子コピー数（ブラディゾイド定量値）を比較した結果、道北ではほとんどの個体が 10×10^5 /g であったのに対し、道東では 10 倍量の 100×10^5 /g であり、一方道南ではそのどちらでもなく 1×10^5 /g から 1000×10^5 /g と幅広いことが確認された。雌雄別に比較すると、性別の二群における数値の分布に相違は認められなかった。年齢別での比較は、幼齢から年を経るごとに寄生虫密度は上昇する傾向が認められた。

D. 考察

本研究結果から、国内で野生ニホンジカにおける様々な食中毒危害性寄生虫の疫学情報が得られた。我が国では

害獣対策の一環として、野生獣肉を食肉利用するというジビエ産業は歴史上初の試みであるため、解決すべき種々の課題は山のように残されている現状であるが、なにより、流通に不可欠な衛生管理という点は課題の中でも最も大きいものの一つであり、解決無しにはジビエ産業そのものが成立しない。

これまでの食中毒事例にもあるとおり、野生動物には家畜よりも多数の病原微生物が存在する事は事実であるが、その事実を踏まえ、家畜の衛生管理法をむりに転用するのではなく、野生動物に適応した規制を新たに定めるのが肝要かつ、将来的にも安定した産業の振興をもたらすと考えられる。

本研究では、野生動物に特徴的な病原性寄生虫の疫学調査、ならびに検出法の確立を示した。日本人の考え方として、「自然の物はきれい」という固定観念もあり、自然界で活着している野生動物の衛生面を警戒しない風潮がある。

本研究は、そのような観念を改め、「野生鳥獣肉には衛生面で注意する必要がある。しかし、それは普段食している家畜肉と同様に、解体、調理の段階で危害性をなくす事が出来る食材である」という事を社会一般に示すことを最終的な目標としている。これまで、食用に供す野生鳥獣の衛生管理に焦点を絞った疫学研究は無に等しかった。我が国のジビエ産業が害獣対策の一環として始まったことをうけて、社会にひろく流通させるためには安定した衛生管理規制が何よりも重要である。本研究はそのような規制を構築するに貢献し得る情報の提供を目的とした。

本研究の結果から、国内野生ジカから初めてクリプトスポリジウムが検出された。これは、水源汚染を含めたヒトへの危害性の可能性を示すだけでなく、家畜での流行を引き起こす感染源としての可能性も同時に示唆する。また、生食用馬肉で食中毒を起こした住

肉胞子虫については、これまでになかった野生ニホンジカに適応した定量法を確立した。これまでの検査では、生食用馬肉を対象とした *Sarcocystis fayeri* 検査法を転用する他なかったが、本研究で明らかにされたとおり、ニホンジカに *S. fayeri* は感染しておらず、代わりに別の種が 6 種混合感染していた。そのことを考慮すると、*Sarcocystis fayeri* 検査法でシカ肉の検査を行った場合、多量の取りこぼしによる偽陰性を大量に産出する恐れがある。本研究で確立した定量法により、北海道エゾシカ 89 検体の疫学調査を行ったところ、陽性率は 100 % と、食用ウマを遥かに越える感染率で、今後一層の食肉利用に対する調理法の指導が必要である事がわかった。また、1 個体あたりの寄生虫数を遺伝子コピー数の定量で解析した結果、性別による寄生虫数の影響はないが、地域、年齢については様々な影響があることが分かった。住肉胞子

虫は草食動物を中間宿主とし、肉食動物を主な終宿主とするため、地域に生息する固有な動物によっても大きな影響を受ける事が考えられる。本研究では北海道由来のエゾシカのみを対象にした疫学調査であった。以後、本州および九州のニホンジカ試料についても同様に研究を進め、北海道のエゾシカ

と同様の研究を行い、結果について比較検討することで、今後我が国のジビエ産業で主要な食肉となり得るニホンジカの危害性についてより詳細な情報を得、近い将来に確立されるジビエの衛生管理関連法規に大きく貢献する事を目指す。