

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）

総括研究報告書

野生鳥獣保有微生物種の網羅的解析による喫食リスク低減化に関する研究

研究代表者 福本 晋也 帯広畜産大学准教授

研究要旨

微生物学的リスク要因を明確にすることで、野生鳥獣肉の食品衛生管理向上に資することを目的として、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施した。平成 28 年度においては、エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施しデータの集積をした。これらのデータ解析は平成 29 年度に実施予定である。現在までの食中毒関連病原微生物の疫学調査の結果、住肉胞子虫：95%以上、肝蛭：約 10%、腸管出血性大腸菌：約 15%の陽性率であった。本年度における研究結果を踏まえ、次年度における、更なる詳細な解析が必要であることが示唆された。

A．研究目的

近年の野生鳥獣被害と捕獲必要性の増加を受け、野生鳥獣肉の食利用への期待が高まっている。しかしながら、その安全性の担保については理想的状態とは言えず、公衆衛生上のリスク要因であると懸念される。本研究課題は、微生物学的リスク要因を明確にすることで、野生鳥獣肉の食品衛生管理向上に資することを目的とするものである。

野生動物による農林水産業被害の爆発的増大が懸念されているが、狩猟者減少による捕獲圧低下、生息密度上昇による感染症リスク上昇など、厳しい実態がある。野生鳥獣を食肉として有効利用し、付加価値によりその需要を高めることで、結果的に野生動物の生態管理を目指す動向がある。そこで問題となるのが、野生動物という特殊性に起因する食品衛生リスクである。自治体による野生鳥獣肉衛生管理ガイドラインの策定と周知・徹底などの安全性確保への努力が払われている。結果、条例等に基づき適切な処理を経た野生

鳥獣肉の流通が拡大してきてはいるが、依然として捕獲鳥獣の一割程度を占めるにすぎず、その利用は限定的である。その遠因として処理場への運び込み時間・着弾部位制限など、狩猟者への負担が大きいことがあげられる。

結果として、正規の処理経路を経ない野生鳥獣肉が、レストラン等で商業利用されている実態が散見される。このような安易な取り扱いが喫食リスクに対する知識浸透が不十分な事が原因の一つと考えられる。ガイドライン等の「どのような病原体を保有しているか不明であること等から生食はすべきでなく」の文言から理解されるように、具体的なリスク要因が不明なため明確な注意喚起が出来ないことが、一般消費者・飲食業者・狩猟者のリスク意識向上への妨げとなっていると考えられる。

そこで本申請では、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を

調査モデル地域として研究を実施する。平成28年度では、エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施しデータの集積を行う。平成29年度では、次世代シーケンサーデータ解析により食品衛生リスク要因病原微生物種の同定、新興感染症発生病因候補微生物種候補の同定、微生物種毎に疫学情報の解析を実施する。以上の研究の実施により、基礎データ集積によりリスク要因と施策提言根拠を明確化し、野生鳥獣肉食品衛生行政に資することを目的とする。

B. 研究方法

(1) エゾシカサンプルの収集

十勝地方において100個体以上の狩猟捕獲エゾシカ由来サンプルの採集を目標としてサンプリングを実施した。採集サンプルは、血液を主体として、主たる喫食部位である筋肉・肝臓、さらに糞便を採集した。採集時期は、捕獲個体の食肉流通利用が最も盛んな猟期前半（10月から12月）を主体として、狩猟期間後期（1月から3月）、有害鳥獣捕獲が実施される夏期捕獲サンプル（4月から9月）の収集にも努めた。エゾシカ処理事業者に協力を依頼することで大分部のサンプルを確保した。エゾシカ由来サンプルについては、採集地域・性別・年齢等の個体情報をトレーサブルサンプルな形で収集することを目指した。得られたサンプルについては解析まで冷凍保存した。

(2) 次世代シーケンサーによるデータ集積
核分画粗除去筋肉・肝臓または非分画筋肉・肝臓（約40検体使用）および血清（約60検体使用）から核酸を抽出し、RNA-Seq・DNA-Seq解析を受託解析により実施した。また糞便サンプルからDNAを抽出し16Sメタゲノム解析に供し、糞便内細菌叢の解析を実施した。また、筋肉・肝臓・脾臓由来DNAを抽出し、16Sメタゲノム解析に供した。さらに、エゾシカプロッキングプライマーを設計し、18Sメタゲノム解析に供し、糞便内寄生虫叢（パラサイトーム）の解析に供した。

(3) 食中毒関連病原体の疫学的解析

次世代シーケンサーによるデータ解析に先立ち、一部の食中毒関連病原体について疫学調査を実施した。住肉孢子虫については岩手大学山崎朗子助教との共同研究によりPCR法を用いて感染率の調査を実施した。肝蛭につ

いては肝臓内虫体直接検出法により感染率の調査を実施した。また、糞便由来DNAについて、TAKARA 腸管系病原細菌遺伝子検出キットを用いて、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、赤痢菌の陽性率を検証した。また、TAKARA O-157（ベロ毒素1型、2型遺伝子）PCR Typing Set を用いてVT 遺伝子のタイピングを行った。

C. 研究結果

(1) エゾシカサンプルの収集

十勝地方を中心として平成28年4月よりエゾシカサンプル（筋肉・肝臓・血液）の採集を開始した。主に有害鳥獣駆除期間である4月から9月については、4月1検体・5月9検体・6月7検体・7月3検体・8月19検体・9月25検体の合計64検体を収集した。食味が高いことから最も食利用が盛んな猟期前半の10月から12月については、10月53検体・11月17検体・12月25検体の合計95検体、猟期後半の1月から3月については、1月8検体・2月10検体・3月12検体の合計30検体を収集した。28年度に採集したエゾシカサンプルは合計189検体であった。捕獲は研究代表者所属機関が位置する十勝地方帯広市、そして、芽室町、幕別町、清水町、大樹町、足寄町、豊頃町、忠類町、広尾町、浦幌町、池田町、更別村また、隣接地域である釧路市音別町、えりも町などエゾシカが高密度に生息する十勝地方内の日高山脈沿い自治体および十勝地方から釧路地方にまたがる太平洋沿岸自治体においてなされた。捕獲エゾシカ個体の年齢については外貌推定法により、当歳から5歳までの個体であり、その内訳は一歳34頭・二歳42頭・三歳79頭・四歳14頭・五歳10頭、年齢不明が10頭であった。性別はオス86個体、メス99個体、4個体については性別情報を得られなかった。また9月末から翌3月までについては直腸内糞便についても個体トレーサブルな形で採集し、当該期間内において130個体分の糞便サンプルを収集した。糞便サンプルについてはDNA抽出に供したほか、腸管内細菌分離のため20%グリセロール溶液懸濁液としても凍結保存した。

(2) 次世代シーケンサーによるデータ集積
筋肉・肝臓については捕獲地・捕獲時期・年齢・性別の項目について無作為に40検体を抽出しDNAおよびRNAを抽出後、次世代シーケンサーによる解析に供した。肝臓、筋肉由来DNA、RNAそれぞれについてイルミナHiSeqを用い

た解析により100bpペアエンドで4Gb(2000万リードペア/検体)のデータを取得した。また、60個体分のサンプルより血清由来DNA・RNAを抽出した。これらについても肝臓・筋肉由来核酸と同様にイルミナHiSeqを用いた解析により100bpペアエンドで4Gb(2000万リードペア/検体)のデータを取得した。また糞便由来DNAでの16Sメタゲノム解析については48個体分のサンプルをプールしイルミナMiSeqを用いて300bpペアエンドで37.5万リードペアのデータ取得を行い、得られた配列についてTaxonomy解析を実施した。また、一部個体の肝臓・筋肉・脾臓よりDNAを抽出し糞便由来DNAと同様に16Sメタゲノム解析を実施し各臓器毎に7.5万リードペアのデータ取得を行い、得られた配列についてTaxonomy解析を実施した。また、24個体分の糞便由来DNAを用いて18Sメタゲノム解析を実施した。250bpペアエンドで総計約120万リードペアのデータを取得し、得られた配列についてTaxonomy解析を実施した。以上の様に平成28年度において取得した次世代シーケンサーデータについて平成29年度に詳細に解析を実施する予定である。

- (3) 食中毒関連病原体に関する疫学調査
次世代シーケンサーによる解析に先立ち、食中毒関連病原体に関する疫学調査を実施した。平成28年度に対象とした病原体は肝蛭、住肉孢子虫、腸管出血性大腸菌、赤痢菌、サルモネラである。肝蛭については肝臓からの直接虫体検出法により解析した。外観の肉眼的観察による一次スクリーニングにより異常が確認された肝臓について、切開肝臓直接虫体検出法により肝蛭の検出を実施することにより、肝蛭の感染の検出を実施した。平成28年度に採集した189個体のうち、17個体から肝蛭虫体が検出された。1個体から分離された肝蛭虫体数は1から20虫体であった。肝蛭陽性個体は幕別町・豊頃町・広尾町・大樹町・浦幌町・釧路市で捕獲された個体であった。肝蛭分離個体の性別はオス4頭、メス13頭であった。年齢は一歳から四歳であった。また、岩手大学関まどか助教との共同研究により本研究課題開始前から継続的に収集を行っている肝蛭の遺伝子型解析を実施した(岩手大学・関まどか助教との共同研究、平成29年4月掲載決定)。住肉孢子虫についてはPCR法による遺伝子検査の結果95%以上の陽性率であった(岩手大学・山崎朗子助教の協力による)。糞便よりDNAを抽

出し、TAKARA 腸管系病原細菌遺伝子検出キットを用いたリアルタイム法による解析の結果、赤痢菌、サルモネラ菌については現在のところ全個体において陰性を示した。腸管出血性大腸菌については130検体中18検体が明確な陽性のピークを示した。陽性個体は5自治体由来であった。明確に陽性を示した個体についてTAKARA O-157(ペロ毒素1型、2型遺伝子)PCR Typing Setを用いてVT遺伝子のタイピングを行った結果、1型に1検体、2型に8検体で明瞭なバンドが検出された。その他のサンプルについては弱いバンドが検出された、もしくはバンドが検出されなかった。

D. 考察

本年度における当初の研究計画の骨子は、エゾシカサンプルの収集とサンプル由来核酸の次世代シーケンサー(NGS)による解析データ取得であった。

第一の骨子であるサンプリングについては当初計画において100個体分程度を想定していた。猟期開始前の秋期において十勝地方は台風による甚大な被害を受け、山間部の林道崩壊等の被害が多くあり、サンプリングの遂行が危ぶまれた。しかしながら各団体による協力のほか、本年度より北海道よりエゾシカ肉処理施設第一陣として認証を受けたELEZO社の全面的な協力を得ることができたため、3月末の時点で189サンプルの収集を終了、現在も継続中である。当初計画を上回るペースで効率的に推移しており、サンプリングについては計画していた目的を十分に達成することが出来ている。サンプルのトレーサビリティについては、およそ95%がトレーサブルな形で収集がなされた。一般ハンター等に協力を依頼する必要があることから、一定数のサンプルについては個体情報が曖昧になることが当初より想定されていたが、予想に反し95%程度のサンプルがトレーサブルな状態で回収されており、この結果は研究結果の精度に大きく寄与するものであった。

第二の骨子であるエゾシカサンプルのNGS解析については、サンプリングを目的どおりに達成することが出来たため、当初の予定通り、血清・筋肉・肝臓由来核酸の精製・解析を現在実施し、平成28年度内にデータ取得を終了した。平成29年度の研究においてデータ解析を実施予定である。

食中毒で問題となる病原体疫学調査におい

て、住肉孢子虫と肝蛭については既報のとおり、高い感染率であることが認められた。肝蛭については虫体が検出されていない市町村もあるものの、既報および申請者の過去の調査結果（未発表）を鑑みると、肝蛭による汚染がおきていないのでは無く、サンプル数が少ないために、虫体検出率が検出限界以下であった市町村も多かったものと考えられる。今年度の研究結果における肝蛭陽性率はおよそ10%程度であり、肝蛭汚染の有無を市町村単位で正当に評価するには、各市町村につき20個体以上の解析がなされることが望ましいものと推測される。

食中毒で問題となる腸管出血性大腸菌についてはリアルタイムPCR法により約15%が明確に陽性を示し、VT陰電子のサブタイピングの結果、VT1とVT2の両サブタイプが検出された。腸管出血性大腸菌の陽性個体については、研究代表者所属機関である帯広畜産大学の山崎准教授との共同研究により、菌株の分離実験を実施中である。分離後、抗原型の決定や他の病原性関連遺伝子の解析など、エゾシカにおける腸管出血性大腸菌の特性を解析する予定で有り、エゾシカ肉食利用における衛生管理において有用な知見をもたらすものと期待される。エゾシカにおいて比較的高率に腸管出血性大腸菌が陽性となったことは、直接的なエゾシカの食利用以外にも農作物の汚染等についても考慮する必要があることが考えられる。家畜は一般的に管理された特定箇所での飼育されているため、家畜の糞便由来の病原体は家畜飼育場所以外に拡散しないよう、一定のコントロールがなされている。しかしながら、野生動物であるエゾシカはそのような制限を有しないため、糞便を多種多様な場所にまき散らすこととなる。事実、十勝地方においては農作物を荒らすことからエゾシカは有害鳥獣とされており、その姿を繁茂に畑で見ることが出来る。したがって、エゾシカの糞便による農作物への腸管出血性大腸菌の汚染は容易に起こりえると考えられ、特に生食の対象となる野菜等の衛生管理は重要であると考えられる。以上のことから、エゾシカの保有する腸管出血性大腸菌の疫学については、十勝地方だけでなくより広範囲に、その詳細を明らかにすることが重要であると考えられる。陽性個体は5自治体で捕獲されたエゾシカ由来であったが、サンプル数と陽性率を鑑みると、陽性が検出されなかった地域において感染個体が存在しないのではなく、サンプル数が陽性個体検出限界以下であったと推測さ

れ、正確な実態を把握するためには、より高密度でのサンプリングが必要であることが示唆された。

E. 結論

平成29年度においては、エゾシカサンプルの収集および次世代シーケンサーでのデータ収集を予定していたが、当初の研究計画を十分に達成できたものと考えられる。また、研究計画に先立って実施した食中毒関連病原体の疫学調査においては、多くの個体が住肉孢子虫・肝蛭を保有しており、従来の情報どおり生食は危険であることが再確認された。高率で腸管出血性大腸菌がリアルタイムPCR法により陽性となった結果は、エゾシカにおける腸管出血性大腸菌汚染の更なる詳細な解析の必要性を示唆するものであった。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Madoka Ichikawa-Seki, Tomoko Shiroma, Tatsuya Kariya, Ryo Nakao, Yuma Ohari, Kei Hayashi, Shinya Fukumoto.
Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan. *Parasitology International*, 2017, In press.

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し