

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 29 年度においては、昨年度に得られた次世代シーケンサーによるデータ解析により微生物核酸由来配列の検出を行った。得られた核酸配列について人への病原性の観点から詳細な解析を行った。解析対象とした原虫・ウイルスについては人への病原性が高い種ではないものが多いことが示唆されたが、病原性が不明かつ高度に感染しているものもあり注意が必要である。腸管出血性大腸菌については 15 種の 0 抗原型が検出されエゾシカジビエ利用における懸念材料であることが確認された。

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るべきでなく」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、新興感染症発生要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

本研究は研究代表者所属機関が位置する北海道東部地方において高密度に生息するエゾシカを対象とし、どのような微生物種が保有されているのか、網羅的に解析を行い、野生鳥獣肉の喫食利用における食品衛生リスクを明らかにすることで、公衆衛生に資することを目的として研究を実施した。研究計画の骨子は主として以下の 4 点により構成される。平成 28 年度：(1)エゾシカサンプルの収集、(2)次世代シーケンサーによるデータ集積、平成 29 年度：(3)データ解析によるエゾシカ保有微生物種の網羅的同定、(4)同定微生物種毎の疫学調査。

本年度は、平成 28 年度において得られた次世代シーケンスによる配列データの解析を主として実施した。平成 28 年度において脾臓・筋肉・糞便より DNA を抽出しメタゲノム解析を実施した。また脾臓、筋肉、血清より核酸を抽出し、RNA-Seq および DNA-Seq 解析に供した。

メタゲノム解析においては、得られたデータに対して OTU 解析を行った。その結果、クリプトスポリジウム、プラストシスティスに対する個別疫学解析を実施した。また、プラストシスティスについては、奈良女子大学・吉川尚男准教授との共同研究により分離培養を試みた。

RNA-Seq および DNA-Seq 解析については、得られたリードデータをトリミング後、De Novo 解析により Contig の生成を行った。得られた Contig について、宿主由来 contig 除去作業を実施した。DNA-Seq 由来 contig については、エゾシカのゲノム情報等は存在しないため、ゲノム情報の解析が比較的進んでいる近縁の生物種の配列情報を参照配列として、contig のマッピングを行った。参照配列の解像度が高い近縁の反芻類として、ウシ、ヒツジの情報を利用した。また、白尾ジカ、アカジカの配列情報も利用した。RNA-Seq 由来 contig については、さらに、ヤギおよびウマの Transcript データも使用した。マッピングされなかった contig を収集し、これを非宿主由来 contig 群と仮定し、どのような生物種由来の核酸が含まれているのかを BLAST 配列により解析した。以上の解析によりどのような微生物種をエゾシカが保有しているのか、その推定を行った。

糞便中の腸管出血性大腸菌 (EHEC) については昨年度より継続的に解析を実施した。解析検体数を更に増やし、合計約 350 検体とした。TAKARA 腸管系病原細菌遺伝子検出キットによるリアルタイム PCR 法陽性サンプルについて、STX 遺伝子のサブタイピングを PCR 法 (TAKARA O-157 (ペロ毒素 1 型、2 型遺伝子) PCR Typing Set) により実施した。また、糞便サンプルより EHEC の分離培養をクロモアガー-STEC もしくは BHI 培地により帯広畜産大学・山崎栄樹准教授との共同研究により実施した。また、分離株の 0 抗原型について 0 genotyping PCR 法により推定した。

また、DNA-Seq および RNA-Seq 解析により感染が確認された、住血性原虫に対する新規検出法の開発および疫学調査を帯広畜産大学・横山直明教授との共同研究により実施した。

C. 研究結果

(1) エゾシカ血液・肝臓・筋肉由来核酸の RNA-Seq および DNA-Seq 解析による病原体由来核酸の検出

エゾシカの血液、筋肉、肝臓由来核酸を用いた、RNA-Seq・DNA-Seq により網羅的な感染微生物の検出を行った。De novo assembly の結果得られた contig 数は血清

RNA:3,156、血清 DNA:322,753、肝臓 RNA:225,100、肝臓 DNA:581,567、筋肉 RNA:72,968、筋肉 DNA:601,973 であった。参照配列へのマッピングの結果、非マップ contig 数は血清 RNA:263、血清 DNA:891、肝臓 RNA:291、肝臓 DNA:1,245、筋肉 RNA:9,693、筋肉 DNA:1,520 であった。RNA-Seq において非マップ contig 割合が筋肉 RNA で著しく高いことが特徴的な結果であった。これらの全 contig について nr データベースを用いて BLAST 解析を実施した (E-value を 1.0E-3 以下で設定)。その結果、サンプルに毎に割合は異なるが、30~60%程度の contig について BLAST 結果を得ることができた。その内の約半数程度がエゾシカに起因すると思われる哺乳動物に対する結果であった。これらを除外すると、寄生虫・細菌・ウイルスに対する配列へのヒットが確認された。非マップ contig 数が著しく多かった筋肉由来 RNA においては、ハモンディア・トキソプラズマなどのコクシジウム属の原虫とされたが、個別に配列を相同性の解析を行った結果、データベースが整備されていない住肉胞子虫由来配列が、データベースの整備されている上記の原虫 DNA に高い相同性を示していることが示唆された。すなわち住肉胞子虫由来 Contig がエゾシカ筋肉からは多数検出された。BLAST 検索でヒットしたウイルスでヒトへの病原性が示唆されるものとして、肝臓 RNA サンプルより検出された A 型肝炎ウイルスがあった。

(2) 各種病原体の個別疫学調査

血液由来核酸を用いた解析では、住血原虫と相同性を示す Contig が得られた。これはタイレリア原虫のものと考えられ、この原虫を検出する新規等温遺伝子増幅法の開発を行った (投稿準備中)。また、疫学調査を行い、100%に近いエゾシカがタイレリア原虫を持つこと、ヤマトマダニよりこの原虫の核酸が検出されることを確認した。また、家畜生産上問題となるウシのタイレリア原虫とは別種であることが確認された。

各個体より 個別に精製した肝臓 RNA をテンプレートとし、食品衛生検査指針微生物編記載方法による PCR 法により A 型肝炎ウイルスの検出を試みたが陽性サン

プルは得られなかった。

筋肉由来核酸について住肉胞子虫が多く検出されたが、昨年度までの調査において 100%に近い感染率であることが岩手大学助教・山崎朗子との共同研究によって既に明らかとなっていたため、更なる解析は実施しなかったものの、筋肉サンプル採取時に肉眼的サーベイは継続的に実施していた。その結果、100 シスト/10 平方センチメートル程度と、高密度に感染しているエゾシカが存在していることが確認された。

18S メタゲノム解析の結果、常在性の生物を除くと、ヒトの下痢症および過敏性腸症候群で検出されることが知られている、*Blastocystis* が高頻度にエゾシカ糞便より検出されることが明らかとなった。また、*Blastocystis* と生物学的に近く、エゾシカからは未だ分離の報告がない、ヒトでの下痢症の原因となる *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) の OTU が散見された。そこで、この 2 種の病原体に着目し、より詳細な解析をおこなった。*Cryptosporidium* ユニバーサル PCR を実施、塩基配列の解析を行うことで、本当に *C. parvum* がエゾシカに感染しているのか解析した。その結果、エゾシカから検出される *Cryptosporidium* は *parvum* 以外の種であった。また、*Blastocystis* の陽性率を PCR 法により解析したところ、47% (62/132) であり、遺伝子型を解析したところ、全検体とも ST14 であることが明らかとなった (第 160 回日本獣医学会にて発表)。現在、病原性等の性状について、より詳細に解明するため、奈良女子大学との共同研究により、5 株の分離培養に成功している。

前年度から継続している EHEC の解析については、現時点において、約 350 検体中 54 検体が糞便由来 DNA を対象としたリアルタイム PCR 法により陽性を示した。陽性検体については、stx 遺伝子のサブタイピングを PCR 法により実施した結果、stx1 および stx2 遺伝子の双方が確認された。また、陽性個体について、関東科学クロモアガー-STEC を用いて、糞便より EHEC の分離培養を試みた結果、一部の PCR 陽性サンプルより stx 遺伝子陽性コロニーを分離することに成功した。分離株について PCR 法により O 抗原型の同定を試みた結果、そ

れぞれ 022、026、089、098 であった。さらに分離株の stx 遺伝子のサブタイピングを実施した結果、026 は stx1/2 陽性、022・089 は stx2 陽性、098 は stx1 陽性であった（5.図2参照、第38回日本食品微生物学会および第160回日本獣医学会にて発表）。クロモアガー-STE C では分離不可能な EHEC も存在するため、さらに BHI 培地を用いた単離培養を試みた結果、クロモアガー-STE C により単離したのもも含め、15種のO抗原型がエゾシカ由来 EHEC より検出された。検出されたO抗原型は以下のとおりである。07、010、021、022、026、075、076、083、098、0117、0149、0156、0159、0181。

D. 考察

本年度における当初の研究計画の骨子は、次世代シーケンサーデータの解析による病原体由来核酸の検出と検出された病原体のエゾシカ個体レベルでの疫学調査であった。

第一の骨子である次世代シーケンサーのデータ解析による微生物DNAの検出について特徴が大きかった点は、主たる喫食部位の核酸の解析、特にRNA-Seq解析において、住肉胞子虫由来と考えられるContigが数千得られたことである。一般的に次世代シーケンサーによる病原体等の検出については、大量に存在する宿主由来核酸によるマスクのため、微量にしか存在しない微生物核酸を検出するのは非効率的なため、病原体を含む確立が高い分画の使用等、なんらかのサンプル調整が必要な場合が多い。本研究課題についてはウイルス・細菌・寄生虫など特に微生物種を指定せず広範に検出するとの目的を達成するため、筋肉・血清・肝臓由来核酸を特に分画・調整すること無く次世代シーケンス解析に供した。その結果、全サンプルとも微生物由来核酸を検出することができたことから、本研究で用いた方法を用いてもリード数を最低限担保することで、あるていど有意な解析データが得られることが明らかとなった。しかしながら、筋肉由来RNAの解析では住肉胞子虫由来Contigが極めて多く検出されており、なんらかの分画操作を行ったかのような高い検出率であった。すなわちこの結果は、極めて大量に住肉胞子

虫がエゾシカ筋肉に含まれていることを示唆する結果であった。また、エゾシカ筋肉サンプルの肉眼的サーベイにより高度住肉胞子虫感染サンプルが発見されたことは、次世代シーケンサーによる解析から得られた知見を裏付けるものでもあった。住肉胞子虫については近年、馬刺しでの食中毒事例が問題となっている。エゾシカから検出される住肉胞子虫の人への病原性はまだ良くわかっておらず、その検証の必要性があると考えられる。

人への病原性が危惧される病原体として肝臓から検出されたのが、A型肝炎ウイルス様のcontigであった。A型肝炎は近年日本においては検出されていないが、過去には報告があり、野生動物種においては保存されている可能性が無いとは言えない。本研究では、このcontigが本当にA型肝炎ウイルス由来であるのか、本当にA型肝炎ウイルスがエゾシカに感染しているのかを明らかにするため、標準PCR法により本ウイルスの検出をエゾシカ肝臓サンプル由来テンプレートを用いて試みたが陽性は検出されなかった。したがってA型肝炎ウイルスでは無いことが示唆されるが、その本態は何なのか、より詳細な解析を行うことが望ましいと考えられる。

真核生物メタゲノム解析においては人での下痢症等で検出されることが知られるプラストシスティスとクリプトスポリジウムの存在が明らかとなっているため、詳細な解析を行った。クリプトスポリジウムについてはOTU解析の結果、人での病原性が問題となる*Cryptosporidium parvum*と推定されたが、コンベンショナルPCR法とサンガーシーケンス法による解析の結果、エゾシカからは*C. parvum*は検出されず、*Cryptosporidium deer genotype*等が主体であり、人への病原性野観点からは問題とされない種であった。したがって、エゾシカのクリプトスポリジウムについては、食品衛生リスク要因としては考慮必要性が低いことが示唆された。プラストシスティスについては現在のところ人の症例からは検出されていないサブタイプ14のみが検出された。また、培養法に本原虫を実際に分離検出可能であったことから、エゾシカがプラストシスティスの宿主として存在していることは確実であると考えられ

る。ブラストシスティスについては今後、エゾシカ・人を含む様々な動物種のなかでどの様に維持され、どのような病原性を持つのかその詳細を明らかにすることが望ましいと考えられる。

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350サンプル中、約15%が明確に陽性を示した。この陽性率は全年度までに行ったより少ないサンプル数での結果と変化が無かった。したがって、十勝地方を中心としたエゾシカのEHEC陽性率は15%程度であると指標的な数値として用いて良いものと考えらる。本年度の研究においてはリアルタイムPCR法によるスクリーニングで陽性を示した糞便サンプルのうち、約60%程度から実際にEHECを分離培養することができた。O抗原型解析の結果、極めて多様なO抗原型のEHECが存在することが明らかとなった。宮崎大学・井口准教授らの2016年食品衛生動物学会大会等での報告によると、本州ニホンジカでの同様の解析では、分離されるO抗原型は限定的であることが示されている。この結果と比較すると、北海道十勝地方において多様なO抗原型が検出されることは、際だった特徴であり、今後日本の各地方との比較調査の実施が望まれるところである。

E. 結論

平成29年度においては次世代シーケンサーでのデータ解析による微生物由来核酸の検出と、個別の病原体に対する疫学調査を実施し、当初の研究計画を十分に達成できたものと考えられる。腸管出血性大腸菌については比較的高い陽性率を示すことから、食利用時の処理については適切に行うこと、生食の危険性が再確認された。この点は、住肉胞子虫の高度感染個体も検出されることから、十分に留意すべき点であると考えられる。現在まで、全く感染が知られていなかった高病原性微生物が検出されなかったことは、今後のジビエ利用においては望ましい結果であったと考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibata, S., Sivalumar, T., Igarashi, I., Umemiya-Shirafuji, R., Inokuma, H., Fukumoto, S., Yokoyama, N.: Epidemiological survey of a cervine *Theileria* in wild deer, questing ticks, and cattle in Hokkaido, Japan. *Ticks Tick Borne Dis* 2018, In press.

2. 学会発表

(1) 白水貴大、森下雄貴、纈纈摩美、山崎栄樹、福本晋也、エゾシカ糞便中食中毒細菌の遺伝子検査による解析(第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島県鹿児島市鹿児島大学郡元キャンパス、2017年9月13日-15日)

(2) 森下雄貴、纈纈摩美、関信彰、白水貴大、福本晋也、エゾシカパラサイトームによるBlastocystis感染の解析(第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島県鹿児島市鹿児島大学郡元キャンパス、2017年9月13日-15日)

(3) 田洪敦士、林慶、中尾稔、福本晋也、中尾亮、関まどか、単為生殖型肝蛭のpepck遺伝子型をqPCRにより識別する方法の確立(第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島県鹿児島市鹿児島大学郡元キャンパス、2017年9月13日-15日)

(4) 佐藤浩庸、平谷寛樹、福本晋也、山崎朗子、入江隆夫、松尾加代子、吉田彩子、鎌田洋一、関まどか、リコンビナントCathepsin L1を抗原としたELISAを用いたエゾシカにおける肝蛭症の血清学的調査(第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島県鹿児島市鹿児島大学郡元キャンパス、2017年9月13日-15日)

(5) 北海道十勝地方のエゾシカにおける腸管出血性大腸菌保有状況の調査(第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島県鹿児島市鹿児島大学郡元キャンパス、2017年9月13日-15日)

(6) 森下雄貴、白水貴大、纈纈摩美、山崎栄樹、福本晋也(第38回日本食品微生物学会学術総会、徳島県徳島市あわぎんホール、2017年10月5日-6日)

該当無し

H.知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

3.その他

1.特許取得

該当無し

該当無し

2.実用新案登録