

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

## **国内野生ジカにおける病原性寄生虫の疫学的研究**

平成27年度 総括研究報告書

研究代表者 山崎 朗子

岩手大学 農学部

平成28(2016)年 5月

## 目 次

I .	総括研究報告	
	国内野生ジカにおける病原性寄生虫の疫学的研究-----	3
	山崎朗子 (岩手大学 農学部共同獣医学科)	
II .	研究報告	
1.	各地自治体からの野生ニホンジカ採取試料分類-----	14
	山崎朗子 (岩手大学 農学部共同獣医学科)	
2.	野生ニホンジカにおけるクリプトスポリジウムの疫学調査-----	39
	山崎朗子 (岩手大学 農学部共同獣医学科)	
3.	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 -----	52
	山崎朗子 (岩手大学 農学部共同獣医学科)	
4.	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 -----	73
	山崎朗子 (岩手大学 農学部共同獣医学科)	

## 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危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応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  $1 \times 10^5$  /g、多いものは  $1000 \times 10^5$  /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  $10 \times 10^5$  /g であったのに対し、道東では 10 倍量の  $100 \times 10^5$  /g であり、一方道南ではそのどちらでもなく  $1 \times 10^5$  /g から  $1000 \times 10^5$  /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。

## 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

#### 各地自治体からの野生ニホンジカ採取試料分類

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

近年、増え続ける野生鳥獣による獣害対策として捕獲された野生動物を新たな資源として活用し、地方財源となり得る郷土色豊かな資源、ひいては6次産業化を念頭に国産ジビエ産業が始まろうとしている。特に獣害被害を多大に受けている地方自治体では、個体数管理が活発に行われているため、同時に資源活用に対しても非常に積極的であるが、野生動物は家畜動物と異なり、肥育を衛生管理されていないため、数々の病原性微生物を含む環境由来生物に暴露されている可能性が高い。ところが、法律が定めるところの家畜でない野生動物は、と畜場法の対象外であるためと畜場法に沿った衛生検査が行われないため、食肉としての安全性を保障するには至っていない。

本研究ではこのような現状を受け、今後のジビエ衛生管理関連法規の制定に貢献すべく、野生ニホンジカの疫学調査を行うため、国内各所のジビエ産業に積極的な自治体からの試料提供協力を募った。これにより、北海道から宮崎県までの計10都道府県、6地方から、エゾシカ、ホンシュウジカ、キュウシュウジカの3種類の試料が採集された。試料分類は、クリプトスポリジウム、ジアルジア調査に用いる直腸内容便、住肉孢子虫調査に用いる横隔膜または骨格筋の3種類であった。

我が国のジビエ産業は、獣害被害が増えるにつれ、ますます振興が望まれる方向にあるが、実際に全国的な流通を可能にするために衛生管理の段階になると様々な法規の関係で、生産自治体の中には検査に二の足を踏む自治体も存在していた。また、行政と現場である捕獲狩猟者、解体施設管理者、加工業者との連携や、信頼関係が薄弱である自治体では、経済的問題や狩猟者の年齢をはじめ、様々な要因において温度差が生じ、いかに行政がジビエ産業に積極的でも、現場の協力が得られず、産業として成立するのが困難であることが分かった。

家畜のように生産段階での規定、衛生管理法が確立されているものについては、衛生検査の結果から風評被害を受けることは少ないが、生産、解体、加工の段階で全ての規定が定められていない野生獣肉は、衛生面についての情報が一般社会に深く浸透していない事もあり、小さな情報が大きな風評被害を呼ぶ可能性が拭いきれない。このような不安を取り除くためにも、本研究の成果は、これからの我が国のジビエ産業振興のために不可欠である数々のジビエ衛生管理関連法規の制定に関して非常に重要な情報となり得る物である。

## A. 研究目的

近年、増え続ける野生鳥獣による獣害への対策として我が国の各地方自治体では個体数管理を目的とした狩猟や捕獲が行われている。このように捕獲された野生動物を新たな資源として活用し、地方財源となり得る郷土色豊かな資源、ひいては6次産業化を念頭に国産ジビエ産業が始まろうとしている。特に獣害被害を多大に受けている地方自治体では、個体数管理が活発に行われているため、同時に資源活用に対しても非常に積極的であるが、野生動物は家畜動物と異なり、肥育を衛生管理されていないため、数々の病原性微生物を含む環境由来生物に暴露されている可能性が高い。ところが、法律が定めるところの家畜でない野生動物は、と畜場法の対象外であるためと畜場法に沿った衛生検査が行われない。さらに、と畜場での解体も許可されていない。前述のとおり、野生動物は自然環境で成育するため、家畜動物より多くの細菌、

ウイルス、寄生虫といった微生物に感染し、中には病原性を保有する微生物も含まれている可能性が高いにも関わらず、法的規制によって家畜と同様の検査を受けないため、食肉としての安全性を保障するには至っていない。本研究の成果は、これからの我が国のジビエ産業振興のために不可欠である数々のジビエ衛生管理関連法規の制定に関して非常に重要な情報となり得る物である。我が国のジビエ産業は、鳥獣被害対策の一環である面が強いと、本研究成果も多少なり関連する衛生管理法規に及ぼされる影響は、現在鳥獣被害を多く受け、その害獣を資源活用化することを強く望む各自治体にこそ大きく現れる。そこで、本研究ではこれまでに鳥獣被害を多大に受け、未来のジビエ産業に積極的に取り組んでいる各自治体から試料提供を募り、国内の広い地域から野生ニホンジカの試料を得た。

## B. 研究方法

## 1 . 試料提供自治体の選出

試料採取提供は主にこれまで野生鳥獣被害を多く受けている自治体を選出した。我が国では全国的にニホンジカによる獣害被害を受けているが、その被害は森林、および農地に分けられる。森林での被害は主に日本アルプスをはじめ全国の山地に起こっており、食害による自然景観破壊、植林被害が多くを占めるが、そのようなケースは、森の深い場所に少数の群れで生息するため、狩猟自体が困難であり、一度の捕獲では確保できる数が限られる。そのため、本研究の試料採取では、遊牧地や牧草地、田畑など、狩猟のしやすさと、群れの個体数が大きい地域・自治体での試料採取を行った。試料採集協力については、各自治体行政、猟友会に依頼し、試料提供、及び採取協力を得た。

## 2 . 採取方法

研究代表者が各自治体行政機関と猟友会を訪れ、研究内容を説明すると共に試

料採取協力を得た。次に、研究で使用する試料の部位、その目的、採取方法を説明した。各自治体について、提供可能試料を詳細に決定し、試料採取が出来てから48時間以内に岩手大学農学部へ冷蔵での送付を依頼した。個体識別については、各自治体ともに、捕獲日、捕獲場所、性別、年齢、体長、体重を出来る限り記載した。採取は主に狩猟者が狩猟をした際の解体時に行う。随時の試料採取および送付が困難な自治体では、全国一斉捕獲の際、研究代表者が捕獲に参加させて頂き、現場での試料採取を行った。その試料についても、捕獲日に冷蔵で岩手大学農学部へ送付した。

## 3 . 採取試料部位

本研究で用いた試料は研究対象に合わせて3種類を採取した。クリプトスポリジウム、ジアルジア等水系感染性原虫の調査試料は直腸内容物として糞便、住肉胞子虫の調査試料には横隔膜または骨格筋



を採取した。糞便試料については外環境由来のコンタミネーションを防ぐため、20 cm程度の長さを直腸ごと採取した。直腸の両端は結紮することで完全に外気から遮断した。横隔膜については、腹腔内臓器を摘出した際に露出した部分を15 cm<sup>2</sup>程度採取した。横隔膜の採取が困難であった場合は、大腿部の骨格筋を100 g程度採取した。

## C. 研究結果

### 1. 試料提供自治体

本研究の依頼により、北海道、千葉県、静岡県、山梨県、三重県、滋賀県、京都府、長崎県、熊本県、宮崎県の計10都道府県から試料提供を頂けた。地方としては、北海道、関東、東海、甲信越、近畿、九州の6地方である。(図1.)

### 2. 採取試料数

平成27年度に本研究で採取できた試料数は北海道から89検体、千葉県から13

検体、静岡県から45検体、三重県から25検体、山梨県から42検体、滋賀県から23検体、京都府から29検体、長崎県から51検体、熊本県から19検体、宮崎県から5検体の計341検体である。地方別の検体数は、北海道89検体、関東地方13検体、東海地方70検体、甲信越地方42検体、近畿地方52検体、九州地方75検体であった(表1)。

### 3. 採取試料分類

本研究で採取した試料は、季節、性別、採取時期等がそれぞれ異なっている。採取時期が判明しているものについては、主には狩猟期である11月から3月に採取したものが多く確認される(表2)が、千葉県では6月から11月、静岡県では5月、10月、12月の一斉捕獲時期、山梨県では7、8月を除く全ての月、三重県では3月、10月の一斉捕獲期、滋賀県では3月、10月、11月、12月、京都府では1月と12月、長崎県では5月を除くほぼ年間、熊本県は

11月から3月、宮崎県は12月と各自治体によって異なっている。また、夏季の狩猟については、F S T S V等を含むダニ刺咬の問題もあり、狩猟を控える狩猟者が多く、試料採取の頻度が低下している。北海道については、狩猟のみでなく、養鹿場での肥育の後のと殺解体の際の試料も多く含まれるため、生息環境が大きく変化しないことを考慮すると、試料採取時期の影響は大きくないと推察されたことから、試料採取時期の明記を不要とした。

また、試料を採取した個体の雌雄差については各自治体で異なるが、北海道で雄：雌32：57、千葉県では9：4、静岡県では26：19、三重県では4：21、山梨県では14：24、京都府では18：11、滋賀県では15：8、宮崎県では1：4、長崎県では27：24、熊本県では10：9（図2）であった。雌雄の偏りについては、各自治体が個体数管理の手段として捕獲を推奨しているため、より効率的な管理のため、

積極的に雌個体の捕獲を推奨していることが原因の一つと考えられる。

#### 4．部位別採取試料

本研究で使用する試料の部位は、標的病原微生物により異なっている。クリプトスポリジウムおよびジアルジア等水系感染性原虫の疫学調査については、直腸内容中の糞便を試料とした。また、住肉胞子虫の試料としては、筋肉組織を用いた。住肉胞子虫については、寄生分布に偏りがあるとの報告がある。光学顕微鏡での組織切片検査によると、舌での寄生が最も多く、次いで横隔膜および骨格筋、最後に心筋組織の順でシスト数が減少することが確認されているが、本研究では、人への危害性を考慮し、主要な可食部位を試料とすることを決定し、横隔膜または骨格筋の筋肉組織を採取した。

その結果、糞便試料は千葉県から11検体、静岡県天城地域から39検体、同じく静岡県富士宮地域から6検体、山梨県から

42検体、滋賀県から23検体、京都府から29検体、三重県から25検体、熊本県から19検体、宮崎県から5検体、長崎県から51検体、合計250検体が採取された。また、横隔膜または骨格筋試料は、北海道から89検体、千葉県から11検体、三重県から25検体、長崎県から51検体の合計176検体が採取された。以上に述べた各自治体からの採取試料および個体情報については北海道・道東（表3）、北海道道北(表4)、北海道道南(表5)、千葉県(表6)、静岡県(表7)、山梨県(表8)、三重県(表9)、滋賀県(表10)、京都府(表11)、長崎県(表12)、熊本県(表13)、宮崎県(表14)、に示す。

#### D. 考察

本研究では、合計述べ数341検体の試料を採取することが出来た。北海道、本州、九州の3つの島から採取できたことから、それぞれの島を生息域とするエゾシカ、ホンシュウジカ、キュウシュウジカの三

種の鹿からの試料を得られたということになる。採取分布としては図1に示したとおり、全国のなかでも被害を大きく受けている地方自治体から積極的な試料提供を得られた。しかし、今回の研究協力が得られた背景には、自治体行政と猟友会の密な信頼関係が強く反映されていることが分かった。自治体行政が害獣対策に頭を悩ませ、ジビエ産業に踏み切る意欲はあるものの、現場が整わない自治体が数多くある。家畜用のと殺施設が使用できないため、野生動物の解体には独立した施設を利用する必要があるが、この施設の建設費用は全てが自治体行政で賄われるわけではない。また、関係省庁からの費用も補助にとどまり、大部分は事業者の負担となるため、よほどの経済的余裕のある自治体でなければ十分な数の施設を建設することが出来ない現状であった。特にジビエ産業が害獣被害対策の一つであることから推測すれば、現在この問題に直面している自治体は害獣被害

により多大な経済的損害を被っているため、野生動物を多く捕獲できる自治体がジビエ産業で経済利益を上げるという結果には安易に至らないため、現在でも野生動物の捕獲後は廃棄というケースが非常に多くを占めている。このような現状においても自治体行政と狩猟者の関わりが非常に密であり、相互に良い関係を保っている自治体のみで、今回のような研究協力が達成された。自治体を通じての依頼が猟友会等の狩猟者へと届けられるため、猟友会と自治体行政の関係がうまく成立していない自治体では、たとえ自治体行政が非常に協力的かつ研究結果を求めている、猟友会の同意が得られず協力を得られなかった自治体も数多かった。また、野生動物からの病原微生物の検出に付随するジビエの風評被害を恐れ、調査協力を拒否する自治体もまた少なくなかった。結果的に協力が得られた自治体は、既にある程度のジビエ産業を進めており、加えて、行政の取り組み、狩猟

者との協力体制がうまく連携されているところばかりであった。また、狩猟者の年齢が大きく影響しており、高齢化の進行している猟友会では協力を得られなかった。このような背景から、我が国におけるジビエ産業の振興については経済的な問題が想定するより大きな課題であることが分かった。

今回の試料は全ての自治体について、48時間以内の冷蔵での送付を徹底したこともあり、状態は良いものだった。研究対象がウイルスや細菌である場合は、輸送時間での増殖・減少・死滅などが大きく影響し、結果の信頼性が低下する恐れがあるが、寄生虫を対象とする本研究では、他の微生物に比べて安定性が高いため、信頼性のある結果が得られる試料であった。自治体によっては採集試料の雌雄比が大きく違っているところもあった。これについては、猟銃による捕獲、罠猟、どちらの場合においても雌雄を選んで捕獲することは難しいことと、全国的に個

体数管理の目的から雌個体を優先的に捕獲する旨の通達が出されていることも関係している。特に3月頃に行われる一斉捕獲の際には、雌個体が妊娠している可能性が非常に高いため、出産前に出来る限り捕獲するという傾向が反映されたと考えられる。各個体の年齢については捕獲個体の体長、体重、雄個体であれば角を参考に予想しているが、個体によっては捕獲場所の関係で測定をする余地がなく、試料を採取するのにとどまったため、年齢が分からない個体も多かった。

しかしながら、全国の自治体の協力により、状態の良い試料が採取できたことは、今後においても継続的に試料採取が可能であり、信頼性のある研究成果を得ることが期待できる。また、行政機関と狩猟者との連携が何においても最も重要であるため、研究協力を依頼する際には、現場と行政の状況をよく把握しておくことが肝要であることが分かった。

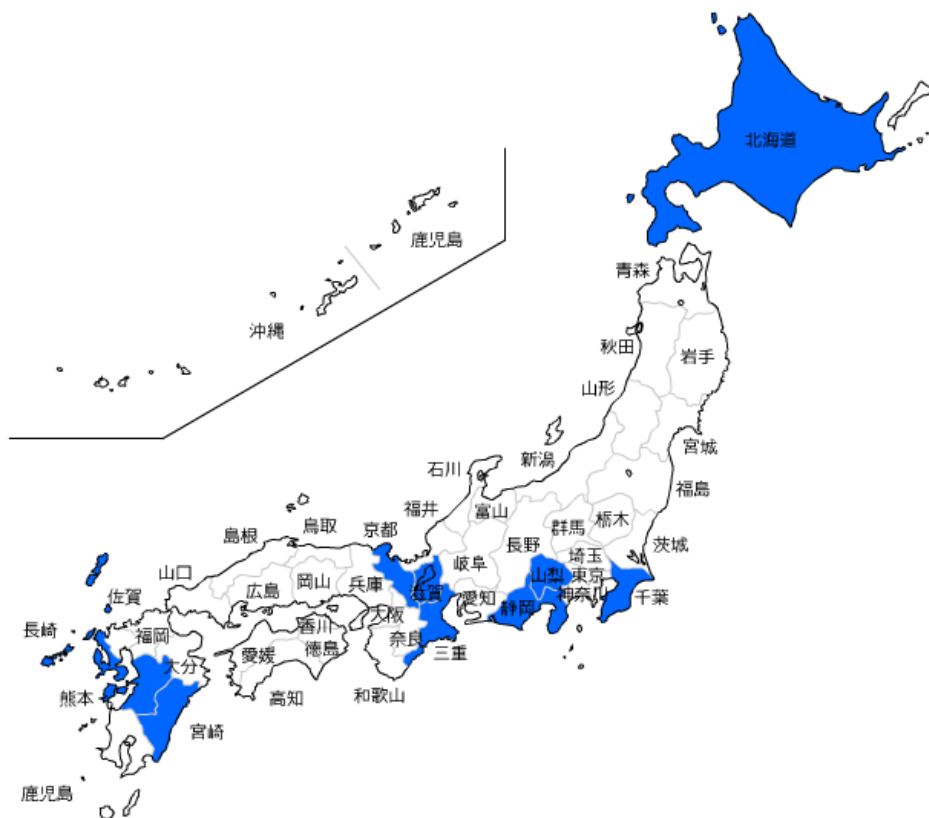


図1 本研究での試料採取地域

表1. 試料採取都道府県と検体数

地方	都道府県	検体数	地方別検体数
北海道	北海道	89	89
関東	千葉	13	13
東海	静岡	45	70
	三重	25	
甲信越	山梨	42	42
近畿	滋賀	23	52
	京都	29	
九州	長崎	51	75
	熊本	19	
	宮崎	5	
合計		341	

表 2 . 試料採取時期

月	都道府県								
	千葉	静岡	山梨	三重	滋賀	京都	長崎	熊本	宮崎
1			5			16	6	3	
2			3				7	3	
3			3	19	8		3	3	
4			4						
5		11	4						
6	4		4				2		
7	1						3		
8	1						3		
9	1		4				6		
10	3	17	4	6	1		7		
11	1		2		11		6	5	
12	2	17	9		3	13	8	5	5
合計	13	45	42	25	23	29	51	19	5

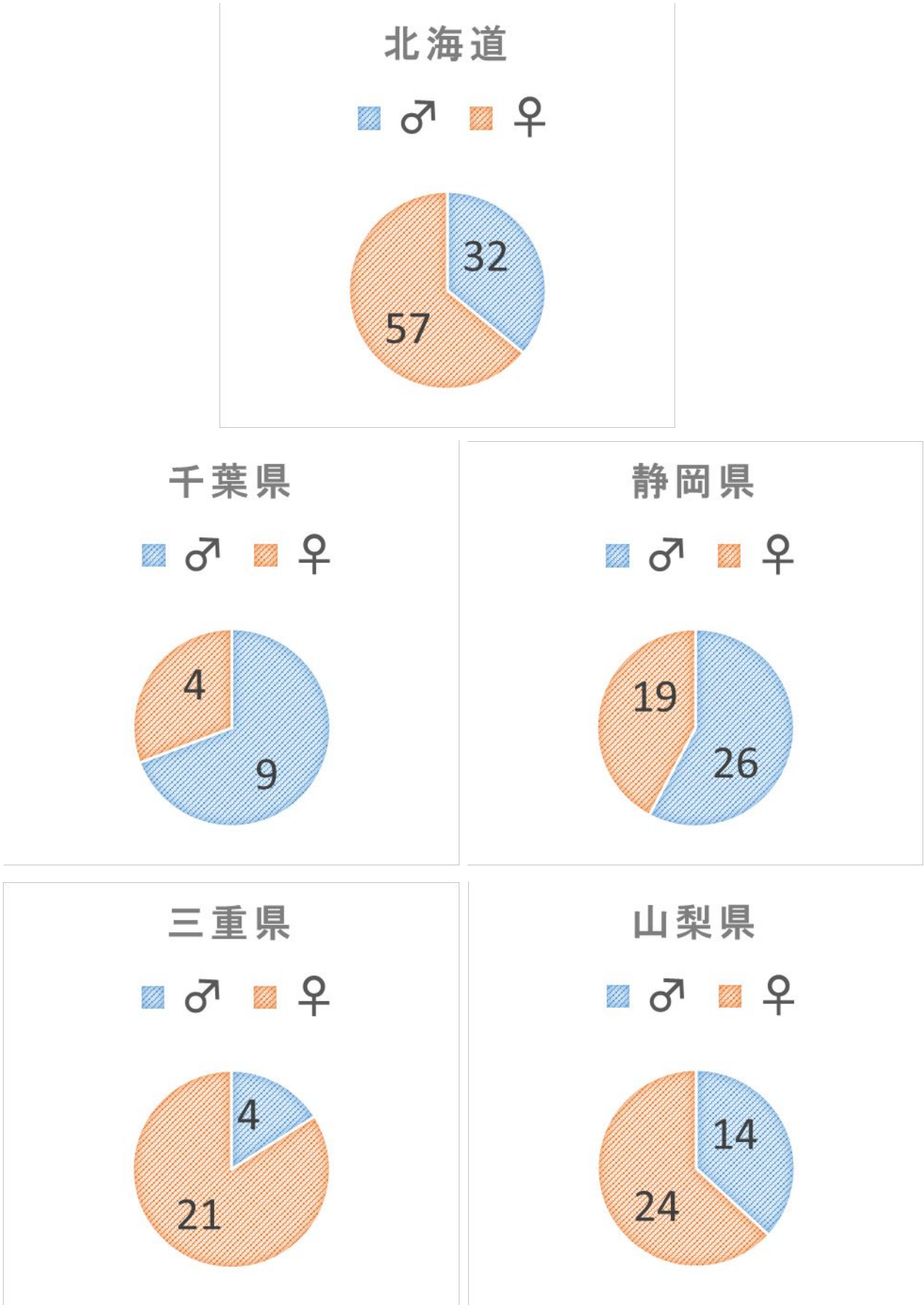
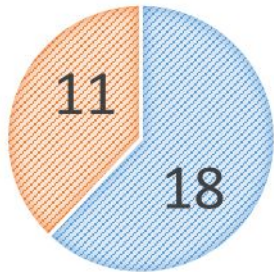


図2 - 1 . 各自治体での試料における雌雄差



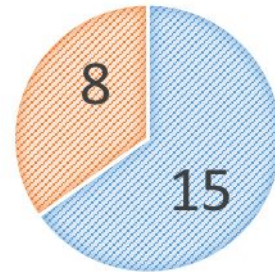
京都府

■ ♂ ■ ♀



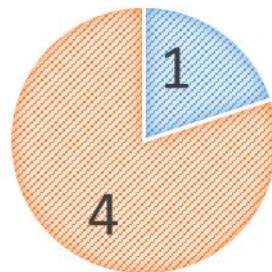
滋賀県

■ ♂ ■ ♀



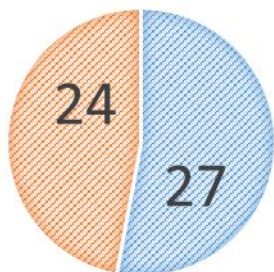
宮崎県

■ ♂ ■ ♀



長崎県

■ ♂ ■ ♀



熊本県

■ ♂ ■ ♀

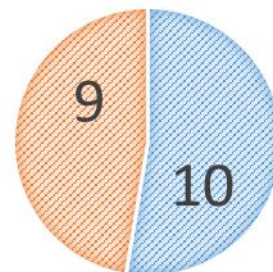


図2 - 2 . 各自治体での試料における雌雄差

表 3 . 北海道 ( 道東地区 ) の試料

番号	採取地域	捕獲場所	性別	試料	年齢
1	道東			横隔膜	5
2	道東			横隔膜	5
3	道東			横隔膜	5
4	道東			横隔膜	0
5	道東			横隔膜	5
6	道東			横隔膜	4
7	道東			横隔膜	4
8	道東			横隔膜	3
9	道東			横隔膜	8
10	道東			横隔膜	4
11	道東			横隔膜	4
12	道東			横隔膜	3
13	道東			横隔膜	3
14	道東			横隔膜	8
15	道東			横隔膜	4

表 4 . 北海道 ( 道北地区 ) の試料

番号	採取地域	捕獲場所	性別	試料	年齢
16	道北			横隔膜	3
17	道北			横隔膜	3
18	道北			横隔膜	4
19	道北			横隔膜	4
20	道北			横隔膜	4
21	道北			横隔膜	3
22	道北			横隔膜	5
23	道北			横隔膜	4
24	道北			横隔膜	4
25	道北			横隔膜	3
26	道北			横隔膜	5
27	道北			横隔膜	5
28	道北			横隔膜	4
29	道北			横隔膜	4
30	道北			横隔膜	3

表 5 . 北海道 ( 道南地区 ) の試料

番号	採取地域	捕獲場所	性別	試料	年齢
31	道南	小安町		横隔膜	3
32	道南	小安町		横隔膜	0
33	道南	小安町		横隔膜	2
34	道南	小安町		横隔膜	3
35	道南	小安町		横隔膜	1
36	道南	小安町		横隔膜	0
37	道南	小安町		横隔膜	1
38	道南	大川町		横隔膜	3
39	道南	小安町		横隔膜	1
40	道南	小安町		横隔膜	1
41	道南	小安町		横隔膜	4
42	道南	小安町		横隔膜	0
43	道南	小安町		横隔膜	0
44	道南	小安町		横隔膜	0
45	道南	小安町		横隔膜	2
46	道南	小安町		横隔膜	4
47	道南	小安町		横隔膜	0
48	道南	白石町		横隔膜	6
49	道南	小安町		横隔膜	1
50	道南	小安町		横隔膜	1
51	道南	小安町		横隔膜	3
52	道南	新湊町		横隔膜	2
53	道南	小安町		横隔膜	1
54	道南	亀尾町		横隔膜	1
55	道南	新湊町		横隔膜	1
56	道南	中野町		横隔膜	4
57	道南	小安町		横隔膜	1
58	道南	大川町		横隔膜	2
59	道南	豊原町		横隔膜	4
60	道南	桔梗町		横隔膜	2

表 5 . 北海道 ( 道南地区 ) の試料 続き

番号	採取地域	捕獲場所	性別	試料	年齢
61	道南	庵原町		横隔膜	3
62	道南	庵原町		横隔膜	2
63	道南	庵原町		横隔膜	1
64	道南	白石町		横隔膜	3
65	道南	白石町		横隔膜	1
66	道南	白石町		横隔膜	3
67	道南	新湊町		横隔膜	1
68	道南	新湊町		横隔膜	3
69	道南	新湊町		横隔膜	2
70	道南	新湊町		横隔膜	0
71	道南	新湊町		横隔膜	5
72	道南	小安町		横隔膜	2
73	道南	小安町		横隔膜	2
74	道南	豊原町		横隔膜	4
75	道南	庵原町		横隔膜	1
76	道南	亀尾町		横隔膜	1
77	道南	鉄山町		横隔膜	1
78	道南	白石町		横隔膜	0
79	道南	小安町		横隔膜	1
80	道南	小安町		横隔膜	3
81	道南	新湊町		横隔膜	2
82	道南	白石町		横隔膜	1
83	道南	古川町		横隔膜	4
84	道南	亀尾町		横隔膜	4
85	道南	小安町		横隔膜	2
86	道南	小安町		横隔膜	1
87	道南	新湊町		横隔膜	1
88	道南	鉄山町		横隔膜	4
89	道南	小安町		横隔膜	2

表 6 . 千葉県 の 試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢	体重 kg
1	6/13	千葉	鴨川市奈良林		糞便・横隔膜・骨格筋	1.2	30
2	6/13	千葉	鴨川市古畑		糞便・横隔膜・骨格筋	1.6	35
3	6/19	千葉	鴨川市古畑		糞便・横隔膜・骨格筋	4	50
4	6/29	千葉	鴨川市奈良林		糞便・横隔膜・骨格筋	5	60
5	7/31	千葉	鴨川市平塚		糞便・横隔膜・骨格筋	3	45
6	8/25	千葉	鴨川市奈良林		糞便・横隔膜・骨格筋	4	40
7	9/28	千葉	鴨川市平塚		糞便・横隔膜・骨格筋	4	80
8	10/3	千葉	鴨川市古畑		糞便・横隔膜・骨格筋	4	70
9	10/26	千葉	鴨川市古畑		糞便・横隔膜・骨格筋	3.2	35
10	10/30	千葉	鴨川市古畑		糞便・横隔膜・骨格筋	6	45
11	11/6	千葉	鴨川市金束		糞便・横隔膜・骨格筋	2.6	50

表7 . 静岡県 の 試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢
1	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	0
2	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
3	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
4	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	1
5	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
6	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
7	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
8	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
9	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
10	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	2
11	10/16	静岡	天城放牧場		糞便	1
12	10/18	静岡	富士宮市国有林内		糞便	2
13	10/18	静岡	富士宮市国有林内		糞便	2
14	10/18	静岡	富士宮市国有林内		糞便	0
15	10/18	静岡	富士宮市国有林内		糞便	2
16	10/19	静岡	富士宮市国有林内		糞便	2
17	10/19	静岡	富士宮市国有林内		糞便	2
18	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
19	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
20	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
21	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
22	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
23	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
24	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	1
25	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2

表7 . 静岡県 of 試料 続き

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢
26	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	1
27	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
28	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
29	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	0
30	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	1
31	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
32	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
33	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
34	12/14	静岡	天城放牧場		糞便	2
35	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
36	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
37	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
38	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
39	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
40	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
41	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
42	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
43	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
44	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2
45	5/28	静岡	天城放牧場		糞便	2

表8 . 山梨県の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢
1	11/22	山梨	早川町峡南		糞便	0
2	11/29	山梨	早川町峡南		糞便	4
3	12/6	山梨	早川町峡南		糞便	0
4	12/13	山梨	早川町峡南		糞便	3
5	12/13	山梨	早川町峡南		糞便	1
6	12/20	山梨	早川町峡南		糞便	4
7	12/20	山梨	早川町峡南		糞便	0
8	12/20	山梨	早川町峡南		糞便	
9	12/25	山梨	早川町峡南		糞便	
10	12/25	山梨	早川町峡南		糞便	
11	12/26	山梨	早川町峡南		糞便	7
12	1/8	山梨	早川町峡南		糞便	
13	1/8	山梨	早川町峡南		糞便	
14	1/19	山梨	早川町峡南		糞便	5
15	1/19	山梨	早川町峡南		糞便	
16	1/29	山梨	早川町峡南		糞便	
17	2/13	山梨	早川町峡南		糞便	5
18	2/27	山梨	早川町峡南		糞便	4
19	2/27	山梨	早川町峡南		糞便	7
20	3/6	山梨	早川町峡南		糞便	
21	3/13	山梨	早川町峡南		糞便	3
22	3/13	山梨	早川町峡南		糞便	3
23	4/10	山梨	早川町峡南		糞便	6
24	4/17	山梨	早川町峡南		糞便	
25	4/17	山梨	早川町峡南		糞便	
26	4/24	山梨	早川町峡南		糞便	
27	5/8	山梨	早川町峡南		糞便	3
28	5/15	山梨	早川町峡南		糞便	
29	5/15	山梨	早川町峡南		糞便	
30	5/22	山梨	早川町峡南		糞便	1
31	6/6	山梨	早川町峡南		糞便	
32	6/12	山梨	早川町峡南		糞便	
33	6/19	山梨	早川町峡南		糞便	
34	6/26	山梨	早川町峡南		糞便	
35	9/3	山梨	早川町峡南		糞便	2
36	9/18	山梨	早川町峡南	-	糞便	
37	9/25	山梨	早川町峡南		糞便	3
38	9/25	山梨	早川町峡南		糞便	4
39	10/2	山梨	早川町峡南		糞便	3
40	10/23	山梨	早川町峡南	-	糞便	
41	10/31	山梨	早川町峡南	-	糞便	
42	10/31	山梨	早川町峡南		糞便	



表9 . 三重県の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料
1	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
2	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
3	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
4	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
5	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
6	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
7	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
8	10/4	三重	名張市		横隔膜・糞便
9	10/12	三重	名張市		横隔膜・糞便
10	10/12	三重	名張市		横隔膜・糞便
11	10/12	三重	名張市		横隔膜・糞便
12	10/12	三重	名張市		横隔膜・糞便
13	10/12	三重	名張市		横隔膜・糞便
14	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
15	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
16	3/1	三重	名張市		横隔膜・糞便
17	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
18	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
19	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
20	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
21	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
22	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
23	3/8	三重	名張市		横隔膜・糞便
24	3/6	三重	名張市		横隔膜・糞便
25	3/6	三重	名張市		横隔膜・糞便

表 1 0 . 滋賀県の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢	体重 kg
1	11/2	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	4	
2	11/2	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	3	
3	11/2	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	5	
4	11/2	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	4	
5	11/2	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	
6	11/3	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	4	
7	11/3	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	3	
8	11/3	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	5	
9	11/3	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	
10	11/3	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	1	
11	10/19	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	3	
12	11/13	滋賀	甲賀市土山町		糞便	5	
13	12/14	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	30
14	12/14	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	4	50
15	12/16	滋賀	甲賀市土山町		糞便	2	40
16	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	40
17	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	40
18	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	40
19	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	40
20	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	3	50
21	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	3	50
22	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	3	45
23	3/8	滋賀	蒲生郡日野町		糞便	2	30

表 1 1 . 京都府の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料
1	12/11	京都	丹後高地		糞便
2	12/11	京都	丹後高地		糞便
3	12/12	京都	丹後高地		糞便
4	12/13	京都	丹後高地		糞便
5	12/13	京都	丹後高地		糞便
6	12/13	京都	丹後高地		糞便
7	12/14	京都	丹後高地		糞便
8	12/14	京都	丹後高地		糞便
9	12/14	京都	丹後高地		糞便
10	12/14	京都	丹後高地		糞便
11	12/19	京都	丹後高地		糞便
12	12/19	京都	丹後高地		糞便
13	12/19	京都	丹後高地		糞便
14	1/9	京都	丹後高地		糞便
15	1/9	京都	丹後高地		糞便
16	1/9	京都	丹後高地		糞便
17	1/9	京都	丹後高地		糞便
18	1/9	京都	丹後高地		糞便
19	1/11	京都	丹後高地		糞便
20	1/11	京都	丹後高地		糞便
21	1/11	京都	丹後高地		糞便
22	1/11	京都	丹後高地		糞便
23	1/11	京都	丹後高地		糞便
24	1/14	京都	丹後高地		糞便
25	1/14	京都	丹後高地		糞便
26	1/15	京都	丹後高地		糞便
27	1/15	京都	丹後高地		糞便
28	1/16	京都	丹後高地		糞便
29	1/16	京都	丹後高地		糞便

表 1 2 . 長崎県の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢	体重 kg	体長 cm
1	6/17	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	34	93
2	6/19	長崎	長崎市平山町		糞便・骨格筋	2.6	32	90
3	7/6	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	3	38	90
4	7/22	長崎	長崎市布巻町		糞便・骨格筋	3	26	96
5	7/29	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	3	30	95
6	8/7	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2~3	26	97
7	8/24	長崎	長崎市布巻町		糞便・骨格筋	5~6	74	130
8	8/25	長崎	長崎市千々町		糞便・骨格筋	3~4	32	100
9	9/2	長崎	長崎市茂木町		糞便・骨格筋	2	29	100
10	9/2	長崎	長崎市茂木町		糞便・骨格筋	3	49	115
11	9/7	長崎	長崎市布巻町		糞便・骨格筋	4	55	117
12	9/15	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	1.6	18	70
13	9/17	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	1	23	78
14	9/24	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	1	13	75
15	10/2	長崎	長崎市平山町		糞便・骨格筋	3	34	100
16	10/3	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	4~5	37	100
17	10/5	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	5	23	90
18	10/5	長崎	長崎市平山町		糞便・骨格筋	5	53	120
19	10/22	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	25	90
20	10/22	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	6	47	120
21	10/26	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	25	85
22	11/5	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	1.6	15	76
23	11/16	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	2	13	75
24	11/16	長崎	長崎市為石町		糞便・骨格筋	3	21	90
25	11/19	長崎	長崎市為石町		糞便・骨格筋	4~5	33	100
26	11/19	長崎	長崎市為石町		糞便・骨格筋	4	27	95

表 1 2 . 長崎県の試料 続き

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料	年齢	体重 kg	体長 cm
27	11/27	長崎	長崎市藤田尾		糞便・骨格筋	6	50	110
28	12/2	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	18	75
29	12/3	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	3	32	100
30	12/4	長崎	長崎市大崎町		糞便・骨格筋	3	24	82
31	12/4	長崎	長崎市大崎町		糞便・骨格筋	2	17	70
32	12/4	長崎	長崎市為石町		糞便・骨格筋	6	42	120
33	12/9	長崎	長崎市布巻町		糞便・骨格筋	3	40	110
34	12/22	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	4	39	110
35	12/22	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	2	20	90
36	1/5	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	1	18	65
37	1/15	長崎	長崎市茂木町		糞便・骨格筋	4	37	115
38	1/15	長崎	長崎市茂木町		糞便・骨格筋	4	34	105
39	1/15	長崎	長崎市茂木町		糞便・骨格筋	4	37	105
40	1/21	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	25	100
41	1/21	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	22	90
42	2/1	長崎	長崎市布巻町		糞便・骨格筋	5	36	105
43	2/1	長崎	長崎市布巻町		糞便・骨格筋	5	44	110
44	2/8	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	18	90
45	2/9	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	2	24	90
46	2/29	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	3	39	110
47	2/29	長崎	長崎市竿浦町		糞便・骨格筋	2	24	100
48	2/29	長崎	長崎市磯道町		糞便・骨格筋	1	15	80
49	3/4	長崎	長崎市草住町		糞便・骨格筋	3	22	95
50	3/10	長崎	長崎市平山町		糞便・骨格筋	2	20	80
51	3/15	長崎	長崎市大山町		糞便・骨格筋	3	25	95

表 1 3 . 熊本県の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料
1	11/17	熊本	五木村鳶山		糞便
2	11/18	熊本	五木村久領		糞便
3	11/19	熊本	五木村栗鶴		糞便
4	11/29	熊本	球磨郡湯前町		糞便
5	11/30	熊本	球磨郡湯前町		糞便
6	12/5	熊本	球磨郡多良木松ヶ野		糞便
7	12/5	熊本	山江村山田		糞便
8	12/21	熊本	五木村平沢津		糞便
9	12/21	熊本	五木村元井谷		糞便
10	12/21	熊本	五木村大藪		糞便
11	1/17	熊本	五木村平瀬		糞便
12	1/22	熊本	五木村下谷		糞便
13	1/24	熊本	五木村平沢津		糞便
14	2/24	熊本	五木村内谷		糞便
15	2/25	熊本	五木村八ツ原		糞便
16	2/27	熊本	五木村元井谷		糞便
17	3/13	熊本	五木村白岩戸		糞便
18	3/11	熊本	五木村白頭地		糞便
19	3/12	熊本	五木村白頭地		糞便

表 1 3 . 宮崎県の試料

番号	採取日	都道府県	捕獲場所	性別	試料
1	12/18	宮崎	東臼杵郡		糞便
2	12/18	宮崎	東臼杵郡		糞便
3	12/18	宮崎	東臼杵郡		糞便
4	12/18	宮崎	東臼杵郡		糞便
5	12/18	宮崎	東臼杵郡		糞便

## 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クリプトスポリジウムの疫学調査

#### 要旨

クリプトスポリジウムは激しい下痢を引き起こす消化管寄生性原虫で、強い塩素耐性を有することから上水道処理の過程で消毒されず、水道を介して広い範囲に感染することで問題とされている。中でも、*Cryptosporidium parvum* は、多様な感染性を有し、多くの哺乳類を宿主とすると同時に感染源となることから、発生は集団感染が多く、発展途上国のみならず、先進国でも発生している。近年、日本では野生動物の増加に伴い、餌を求めて山から下りてきた動物が人と接することが多くなった。クリプトスポリジウムの宿主となりうるこれらの野生動物が家畜動物と比べ遥かに広い範囲を生活圏にしていることを考えると、野生動物個体数の増加によりクリプトスポリジウム感染源が人の生活用水の水源に接する機会が増えている状況であると言える。

そこで本研究では、日本国内各地に分布する野生動物の糞便試料からクリプトスポリジウムの検出を試み、クリプトスポリジウムの分布についての疫学的調査を行うことにより、野生動物に起因する生活用水汚染の危害性を検討した。

本研究の結果、国内野生ニホンジカにおいて初めてクリプトスポリジウムの存在が明らかになった。その陽性率は地域によって異なっており、陽性検体を遺伝解析したところ、シカ固有種に加えてウシの固有種も検出された。しかし、どの種においてもヒトへの直接的な危害性をもつ種ではないため、現段階ではクリプトスポリジウム症の発症対策措置を取る必要はないと思われる。しかし、ウシ固有種がシカにも感染する事が明らかになった本研究結果は、ヒトに危害性のある *C. parvum* にもシカが感染する可能性を示した。更にはヒトへの危害のみでなく、家畜に危害を及ぼす種を伝播する感染源となり得る可能性も同時に示している。

これまで、クリプトスポリジウムについてはその感染事例の規模に相反し、総括的な疫学研究や、汚染源の特定について未だ解明されていない。本研究は、クリプトスポリジウムが自然界から人間の生活に侵入する第一線を明らかにするものであり、全国的に分布している野生動物を広範的に疫学調査することで広大な生息域を持つ野生動物が水源の汚染源になり得る可能性を精査するという試みは今までに行われていないため、学術的価値は非常に高い。人獣感染症の中でも人の生活にとって不可欠である水を媒介する感染性原虫であることを鑑みると、日常生活、畜産業、農業、をはじめとするすべての人間生活に深く関係する水供給の面から、安全な家庭用水・飲料水の供給に寄与するという点でも本研究の意義は国内外を問わず、非常に大きいと言える。

## A. 研究目的

クリプトスポリジウムは激しい下痢を引き起こす消化管寄生性原虫で、強い塩素耐性を有することから上水道処理の過程で消毒されず、水道を介して広い範囲に感染することで問題とされている。中でも、*Cryptosporidium parvum* は、多様な感染性を有し、多くの哺乳類を宿主とすると同時に感染源となることから、発生は集団感染が多く、発展途上国のみならず、先進国でも毎年のように発生している。国内の例としては越生市で人口の 71.4 % に相当する 8,196 名もの感染発症者を出した事例や、米国ウィスコンシン州で起こった、403,000 名の下痢発症うち 4,000 名が入院し、400 名が死亡したという記録がある。また、発生例の中では、飲料水からの一次感染だけでなく、患者が泳いだプールで感染した等、二次感染の例もある。クリプトスポリジウムには抗生物質等が効果を示さず、決定的な治療法が未だ確立されていないた

め、発症に際しては対症療法以外に手立てがなく、個人の免疫機能に頼る他ない現状である。そのため、子供や高齢者、免疫不全者には脅威であり、死亡する可能性が高い。このことが、先進国、発展途上国を問わずクリプトスポリジウムが大きな問題として取り上げられる理由のひとつであり、また、国際化に伴う地球規模での人や物の移動の増加が、輸入による感染拡大の一因となっている。

近年、日本では野生動物の増加に伴い、餌を求めて山から下りてきた動物が人と接することが多くなった。クリプトスポリジウムの宿主となりうるこれらの野生動物が家畜動物と比べ遥かに広い範囲を生活圏にしていることを考えると、野生動物個体数の増加によりクリプトスポリジウム感染源が人の生活用水の水源に接する機会が増えている状況であると言える。これは、飲料水をはじめとする家庭用水を媒介した水系感染によるクリプトスポリジウム症の集団発生が増加する危



険性を示唆している。そこで本研究では、日本国内各地に分布する野生動物の糞便試料からクリプトスポリジウムの検出を試み、クリプトスポリジウムの分布についての疫学的調査を行うとともに、検出された原虫の型を解析することにより、野生動物に起因する生活用水汚染の危険性を検討する。本研究においては、ヒトの生活用水の水源近辺に接触する可能性のある野生動物について、それらのクリプトスポリジウムの保有状況に加え各型の同定を行い、人に感染性を持つ *C. parvum* の分布状況を解析することにより汚染源の可能性を解析する。試料採取は年間を通して行い、季節変動など、環境の変化に伴う動態にも着目する。

これまで、クリプトスポリジウムについてはその感染事例の規模に相反し、総括的な疫学研究や、汚染源の特定について未だ解明されておらず、対処については浄水施設における消毒法にとどまる現状だが、塩素消毒に抵抗性のある本病原体に

ついてはいまだ効果は表れていない。本研究は、クリプトスポリジウムが自然界から人間の生活に侵入する第一線を明らかにするものであり、全国的に分布している野生動物を広範的に疫学調査することで広大な生息域を持つ野生動物が水源の汚染源になり得る可能性を精査するという試みは今までに行われていないため、学術的価値は非常に高い。また、汚染源の特定および汚染経路の解明は、野生動物の行動規制・誘導等により水源をいかにして汚染から守り、集団感染を回避するかという防疫策の基盤となるほか、野生動物の腸内容物に触れる可能性のある狩猟者、解体事業者を感染から守るための規制にも非常に重要な情報となる。人獣感染症の中でも人の生活にとって不可欠である水を媒介する感染性原虫であることを鑑みると、日常生活、畜産業、農業、をはじめとするすべての人間生活に深く関係する水供給の面から、安全な家庭用水・飲料水の供給に寄与するという

点でも本研究の意義は国内外を問わず、非常に大きいと言える。

## B. 研究方法

### 1. 試料からの核酸抽出

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。

#### 1) 糞便からの分離

ポリプロピレン製栄研スピッツ管に糞便 1 g を入れ、精製水または PBS を 10 ml 加え、15 分間程度静置する。滅菌済みの綿棒の柄でよく攪拌する。ポリプロピレン製漏斗に綿製ガーゼを四つ折りにして浅く設置する。ガーゼの上から 500 円玉強の大きさに精製水または PBS を滴下して湿らせる。新しい栄研スピッツ管にガーゼをセットした漏斗を設置する。漏斗の上から試料懸濁液をポリプロピレンスポイトで滴下していく。全て注ぎ終

えたら、栄研スピッツ管を洗うように 5 ml の精製水または PBS を加え、再びスポイトで漏斗に注ぐ。綿棒の柄でガーゼを巻き付けて漏斗の中で絞り、試料溶液を全て集める (図 4)。

#### 2) 酢酸エチル法による精製

試料懸濁液が入ったポリプロピレン栄研スピッツ管に最終濃度 20 % になるように酢酸エチルを加える。蓋を閉め、よく混和するように攪拌する。均一に混ざったら、ふたを一度開けて抜気する。その後、1000 × g で 5 分間、室温にて遠心分離する。回転停止の際に沈査が浮き上がることを防ぐため、ブレーキはオフに設定する。遠心分離後、試料溶液が沈査、水溶媒層、有機溶媒層の 3 層に分かれたことを確認したら、上部の 2 層の交雑物をスポイトで吸引、またはデカンテーションで除去する。その際、管壁についた交雑物等は綿棒で拭き取る。タッピングかボルテックスを用いて沈殿物をほ

ぐした後、2 ml 程度の精製水で洗う。1000 × g で 3 分間、室温にて遠心分離し、上清を除去する。残った沈査を用いてゲノム抽出を行った(図 4)。

### 3) 沈査からの核酸抽出

上記の操作で得られた沈査から核酸抽出を最も効率よく行うため、凍結融解処理を繰り返して沈査を破碎する。凍結は液体窒素を用いて-196 °Cで行い、融解は85 °Cで行う。凍結融解処理を5回行った後、超音波処理を5分間かけ、最終濃度10%のProteinase K 溶液で56 °Cにて一晩の消化を行う。処理後の沈査からの核酸抽出はQIAGEN mini stool kit を用い、プロトコルに準拠して抽出する。抽出した核酸は-20 °Cにて保存した。

### 2. クリプトスポリジウム属の検出

試料中のクリプトスポリジウム属の検出にはリアルタイム PCR 法を用いた。

クリプトスポリジウム 18S リボソーム

RNA を標的とした Cycleave® RT-PCR *Cryptosporidium* 18S rRNA Detection kit (Takara) を用いて、プロトコルに従って逆転写リアルタイム PCR を行った。逆転写反応は、5 × PrimerScript RT Master Mix を核酸試料と混和し(表 1 4) 37 °Cにて15分間で行った(表 1 5)。逆転写反応の後、得られた反応液を試料としてリアルタイム PCR を行った。2 × Cycleave Reaction Mixture と *Crypto.* Primer/Probe Mix を試料と混和して反応溶液を調整し(表 1 6)、プロトコルの反応条件に従ってターゲット領域の遺伝子増幅と検出を行った(表 1 7)。得られた陽性検体については、18S リボソーム RNA の塩基配列の解析を外部委託し、その遺伝子配列について National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて相同性検索を行い、種を同定した。

### C. 研究結果

上記の方法に従い、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(18SrRNA)を標的としたクリプトスポリジウム属原虫の検出を行った。その結果、いくつかの自治体からの試料中にクリプトスポリジウム属原虫特異的18SrRNA遺伝子の増幅が確認された(図4)。各自治体によって陽性検出率には相違があった。千葉県では9.1%(1/11)、静岡県15.6%(7/45)、山梨県2.4%(1/42)、滋賀県0%、京都府17.2%(5/29)、三重県0%、熊本県0%、宮崎県20.0%(1/5)、長崎県0%(1/51)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*の三種がBLASTによる相同性検索で100%の相同性を示した。これらのうち、*C. sp. deer genotype*

はシカ固有種であるが、*C. ryanae*、*C. bovis*はウシ由来の種であることが分かった。陽性検体は1月、5月、6月、10月、12月に捕獲されたものであった。

### D. 考察

クリプトスポリジウムは、塩素に耐性を持つ水媒介性の微生物である特性から、非常に大きな規模の発症事例を特徴とする。人の生活、ひいては生物の生命維持に欠かせない水を媒介することにより、消毒以外に回避する手段はないが、塩素消毒が有効でないために完全に殺菌するには紫外線照射以外の手段は現在のところない。ところが、国内の住宅に水を供給するすべての水道に紫外線殺菌を施すには費用が掛かりすぎるため、現在は多くの水道施設がクリプトスポリジウム検出の際には紫外線殺菌を施すという条件付き規制にとどまっている。山間部の小さな集落では戸数の少なさに応じて簡易水道が設置されている。また、このよう

な集落では私有地の畑で小規模な農業を営んでいることが多く、その際には自宅の井戸水や、川の水などを使用している場合がほとんどである。ニホンジカとの遭遇や被害が頻発する場所はまさに上記のような場所であり、現に井戸の水をシカが飲んでいて、井戸の周りにシカの糞が大量に落とされている、などの訴えが多くあり、生活水の安全性や衛生面での不安が自治体に寄せられていた。本研究は、ジビエとしての食肉利用の安全性担保に関する研究から派生した、野生動物によるヒトへの危害性に焦点を当てている。

これまで、我が国の野生ニホンジカからクリプトスポリジウムの検出報告はなかった。ところが、本研究では千葉県、静岡県、山梨県、京都府、宮崎県、長崎県の6県から検出された。自治体によって試料数が少ないことも原因の一つであると考えられるが、少なくとも我が国の野生ニホンジカにはクリプトスポリジウ

ムを保有している個体があり、地域によって保有率には最大10倍の相違があることが証明された。今回の調査地域について試料採取個体の捕獲場所を検討すると、陽性個体が検出された自治体の捕獲区域内に牧場又は仔牛の哺育施設があった。本研究では我が国全ての野生ニホンジカを調査していないので、断定は出来ないが、陽性検体の過半数が *C. ryanae*、*C. bovis* というウシを優先宿主とする種であったことから、野生ニホンジカとウシ間におけるなんらかの相互関係が示唆される。また、同時に、今回検出された全ての種についてはヒトに対する病原性が確認されていないので、これらの野生ニホンジカによる水源汚染がヒトへの危害に直結するとは考えにくい。今後とも注意喚起は必要である。

雌雄別に解析したクリプトスポリジウムの陽性率が雄で8.9%であったのに対して、雌では4.1%と半分程度の感染率であったことに関しては非常に興味深い

結果である。これまで、家畜を対象としたクリプトスポリジウムの調査では決定的な雌雄差の報告はなく、雌雄よりも年齢による影響が多くを占めていた。本研究で示されたシカでのクリプトスポリジウム保有状況は家畜との共通の種を保有しながら、家畜では見られない性別による影響を受けていることから、シカ特異的な感染動態が推測できる。一方、季節による陽性率の変動は認められなかった。このことに関しては、狩猟や捕獲による試料採取にはどうしても法律で決められた猟期が関係してくるため、年間を通して満遍なく試料を採取することが難しいことから、正確な解析が叶わなかったことが背景にある。また、夏季の狩猟ではSFTSV 陽性マダニやその他の衛生動物による刺咬が増えるため、危険回避のために採取試料数が減ることなども関係する。そのため、野生ニホンジカにおけるクリプトスポリジウム陽性率の季節変動を確認するには、上記のような背景の解

決と四季を通して満遍なく試料採取が行われることが必要である。

本研究では本州のホンシュウジカ、九州のキュウシュウジカ由来の試料での調査になったが、どちらの種についても検出された種は同じものであったが、北海道に生息するエゾシカではまた異なる結果が出される可能性は大きい。逆に、陽性率に相違があっても検出された種が同じであったという今回の結果から類推すると、宿主と地域の相違により、陽性率には違いが反映されるが感染するクリプトスポリジウムの種に関しては本州、九州で違いはないことが考えられる。

## E. 結論

本研究により、日本に生息する野生ニホンジカには地域によってクリプトスポリジウムに感染している現状が明らかになった。その陽性率には地域によっては10倍、性別によっては2倍ほどの違いが確認されたが、感染している種は、*C. sp.*

*deer genotype*, *C. ryanae*, *C. bovis* と、  
全て同じであったことから、本州、九州  
という土地柄、また、ホンシュウジカ、  
キウシュウジカという宿主の種の違い  
は *C. sp. deer genotype*, *C. ryanae*, *C.*  
*bovis* の3種の感染動態については影響  
しないことが分かった。さらに、*C.*  
*ryanae* と *C. bovis* はウシを優先宿主と  
することが報告されているため、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  
害な病原体のベクターにもなりうる可能  
性が示唆される。

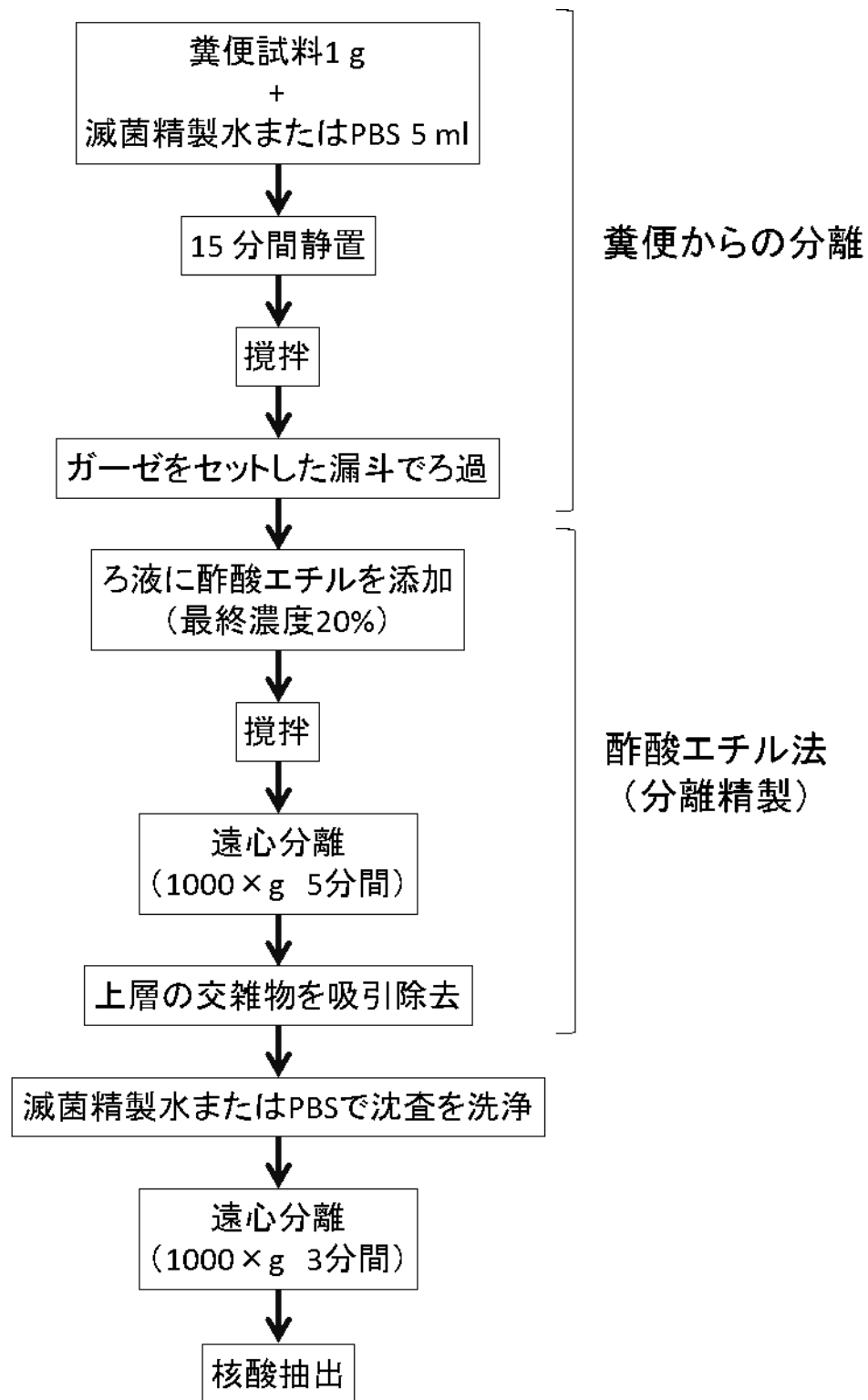


図3 . 糞便試料からの原虫分離法



表 1 4 . クリプトスポリジウム逆転写反応液構成

5 × PrimerScript RT Master Mix	2 μl
サンプル核酸溶液	1~5 μl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl

表 1 5 . クリプトスポリジウム逆転写反応条件

Reverse transcription	37	15分間
inactivation	85	5秒間
Cooling	4	Keeping

表 1 6 . クリプトスポリジウムリアルタイム PCR 反応液構成

5 × PrimerScript RT Master Mix	2 μl
サンプル核酸溶液	1~5 μl
RNase Free dH <sub>2</sub> O	Up to 10 μl

表 1 7 . クリプトスポリジウムリアルタイム PCR 法反応条件

Initial denaturation	95	10秒間
Denaturation	95	5秒間
Annealing	55	10秒間
Extention	72	20秒間

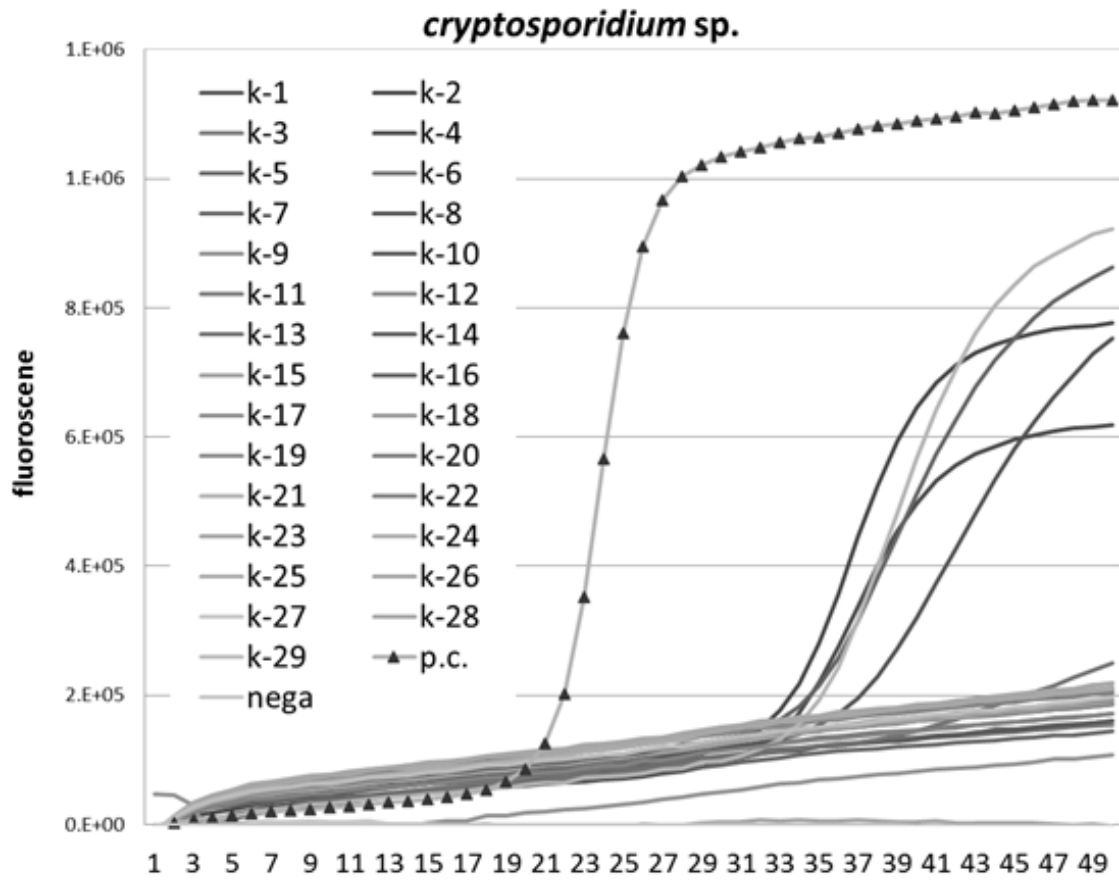


図4 .クリプトスポリジウム検出リアルタイム PCR

表 1 8 .野生ニホンジカにおけるクリプトスポリジウム調査

2012～2014 クリプトスポリジウム調査結果

		陽性率 (%)	
		(陽性個体数/総個体数)	
採取地	千葉	鴨川	9.1 (1/11)
	静岡	天城・富士宮	15.6 (7/45)
	山梨	早川	2.4 (1/42)
	滋賀	蒲生	0.0 (0/23)
	京都	丹後	17.2 (5/29)
	三重	名張	0.0 (0/25)
	熊本	五木村	0.0 (0/19)
	宮崎	東臼杵	20.0 (1/5)
	長崎	長崎	2.0 (1/51)
性別			4.1 (5/122)
			8.9 (11/123)

陽性検体についての遺伝子配列解析結果

*Cryptosporidium ryanae* isolate 18366

*Cryptosporidium bovis* isolate DDC-3

*Cryptosporidium* sp. Deer genot

**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孢子虫の疫学調査：

18SrRNA を標的にした定量的リアルタイム PCR 法の確立

要旨

家畜に比べ、成育環境・解体環境ともに大きく異なる野生鳥獣は、家畜が通常保有する食中毒病原性微生物以外にも食中毒誘起因子となりうる多くの有害微生物に感染している可能性が高い。ところがこのような事実は世間一般的に認知度が低く、野生獣肉喫食による事例は既に数件報告されている。その一つである住肉孢子虫 (*Sarcocystis* 属) は平成 21 年頃から起こった生食用馬肉を原因食品とした食中毒事例により全国的に広く知られ、新規病原性寄生虫の出現として注意喚起されるに至った。にもかかわらず、近年、新たに報告された住肉孢子虫による食中毒事例の原因が野生シカ肉の生食であったことは、一般社会における野生獣肉に関する危害性認識の低さを顕著に表している。

我が国の野生シカにおける住肉孢子虫については、北海道のエゾシカにおいて 96 %、本州のホンシュウジカにおいて 90 % という極めて高い保有率が報告されたが、生食用馬肉で発見された住肉孢子虫については、事例後の調査により食中毒危害の基準値が定められたのに対して、同様に食中毒事例を起こしたニホンジカ由来の住肉孢子虫については、これほどの高い陽性率でありながら食中毒発症基準も明確にされていない。

本研究は、野生ニホンジカ由来住肉孢子虫の詳細な疫学解析を遺伝子情報に基づいて行い、ニホンジカに寄生する住肉孢子虫の定量することにより未だ明らかにされていないニホンジカ寄生性住肉孢子虫のヒトへの危害性について検討した。その結果、ニホンジカには 1 個体に複数種が混合感染している事が明らかになったため、本研究にて *Sarcocystis* 属の複数種を広く検出できる定量的検査法を確立した。

害獣対策としてジビエ産業の振興が望まれる現状において、ジビエの安全性の担保は必須であり、既にシカ肉での食中毒事例が発生している今、住肉孢子虫の疫学調査は早急に行われるべき重要課題と考えられる。本研究成果は、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

昨今、害獣駆除目的で捕獲された野生鳥獣の肉をジビエとして食肉活用する地域振興事業が盛んに行われている。しかし、整った衛生管理下で肥育・食肉加工されている家畜に比して、成育環境・解体環境ともに大きく異なる野生鳥獣は、家畜が通常保有する食中毒病原性微生物以外にも食中毒誘起因子となりうる有害細菌類や、ウイルス類、寄生虫類など多くの有害微生物に感染している可能性が高い。事実、野生鳥獣からは、サルモネラ、カンピロバクター、ベロ毒素遺伝子陽性大腸菌等の細菌類、E型肝炎ウイルス由来遺伝子に加え鞭虫、回虫、鉤虫等の寄生虫卵および住肉胞子虫、線虫、肝蛭などの寄生虫類が検出されている(平成23～25年度厚生労働科学研究「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)。

これは、多種多様な動物との接触機会が多い自然環境での成育に大きく寄与するものと考えられ、野生鳥獣の大きな特徴であるが、この観点からの野生鳥獣肉喫食危害についてはこれまでに十分な研究が行われていない。ところがこのような事実は世間一般的に認知度が低く、野生獣肉喫食による事例は既に数件報告されている。

その一つである住肉胞子虫(*Sarcocystis* 属)は平成21年頃から起こった生食用馬肉を原因食品とした食中毒事例により全国的に広く知られ、これまでの家畜肉による食中毒事例の主な原因とされてきた細菌類やウイルス類に加えて新たに食中毒を起こしうる新規病原性寄生虫の出現として注意喚起されるに至った。にもかかわらず、近年、新たに報告された住肉胞子虫による食中毒事例の原因が野生シカ肉の生食であったこ

とは、一般社会における野生獣肉に関する危害性認識の低さを顕著に表している。

住肉胞子虫は、主に草食性の哺乳類を中間宿主に、肉食性の哺乳類を終宿主に持つ二宿主性の原虫で、家畜ではウマ、ウシ、ヒツジ、ブタなどが中間宿主となる。ヒトへの感染は、中間宿主の骨格筋組織に寄生したサルコシストを摂食することにより成立する。

我が国の野生シカにおける住肉胞子虫については、北海道のエゾシカにおいて 96 %、本州のホンシュウジカにおいて 90 %という極めて高い保有率が報告され、食肉利用にあたって迅速に対応すべき問題点となっている。ところが、生食用馬肉で発見された住肉胞子虫については事例後の調査により、*Sarcocystis fayeri* と種同定され、さらに、食中毒事例における喫食検出量が 18SrRNA 遺伝子コピー数

$1.2 \times 10^6 \sim 6.6 \times 10^6 / g$  であったことから食中毒危害の基準値が定められたのに対して、同様に食中毒事例を起こしたニホンジカ由来の住肉胞子虫については、これほどの高い陽性率でありながら、光学顕微鏡による組織切片の検査にとどまり、遺伝的な種同定も、食中毒発症基準も明確にされていない。その最も大きな理由は、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫を定量する方法が確立されていないことである。

野生動物としての成育環境や、ニホンジカが保有する微生物の多様性から考えると、住肉胞子虫についても他の微生物と同様、これまでに家畜で発見された種と同一種が感染している可能性は低く、未知なる新種が寄生している可能性すら考えられるが、現在までに国内野生ニホンジカでの詳細な住肉胞子虫の疫学調査は行われて

いない。

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、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫を定量することにより未だ明らかにされていないニホンジカ寄生性住肉胞子虫のヒトへの危害性について検討する。

害獣対策としてジビエ産業の振興が望まれる現状において、ジビエの安全性の担保は必須であり、既にシカ肉での食中毒事例が発生している今、住肉胞子虫の疫学調査は早急に行われるべき重要課題と考えられる。本研究成果は、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。

## B. 研究方法

### 1 . ニホンジカ肉試料の乳化

厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法に準拠し、国内の野生ニホンジカ由来の横隔膜又は骨格筋から住肉胞子虫の核酸を抽出する。全国から試料提供を受けた野生ニホンジカの横隔膜、骨格筋から脂肪、筋を除去し、筋肉繊維を 10 g 切り出す。包丁などを用いてまな板の上で細かく破碎し、ミンチ状にする。PBS 30 ml と共にホモジナイザーカップに入れ、5000 rpm で 1 分間ホモジナイズして均一の乳剤状にする。乳化した乳液を 200  $\mu$ l 取り、1.5 ml マイクロチューブに取る (図 5)。

### 2 . DNA の抽出精製

乳液状となったシカ肉試料から QIAamp DNA Mini Kit ( QIAGEN

51304、51306) を用いてプロトコルに準拠して核酸を抽出精製し、-20 で保存する。

### 3 . 住肉孢子虫の定性試験法

住肉孢子虫の定性試験については、馬肉での *S.fayeri* 検査法に準拠する。

住肉孢子虫の 18S リボソーム DNA を標的とした polymerase chain reaction (PCR) 法により検出する。

プライマー配列、および遺伝子増幅反応条件は表 18、表 19、表 20 に示すとおりである。

### 4 . 住肉孢子虫のシーケンス解析法

3 . の定性試験で増幅された住肉孢子虫の 18SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。pMD20-T ベクターを用いて、住肉孢子虫 18SrRNA 遺伝子をライゲーションし、T-A クローニングを行った。完成したプラスミドベクター

を DH5 コンピテントセルに導入し、形質転換した。LB 培地上に形成されたコロニーを 10 個釣菌し、抽出精製したプラスミドをシーケンス解析に用いた(図 7)。解析結果は、BLAST を用いた相同性検索によって 98 % 以上の相同性を示す種を同定した。

### 5 . 住肉孢子虫の定量法の確立-標的領域の選出-

4 . で得られた個々の 18SrRNA 遺伝子配列に共通する配列を探索し、標的配列領域とした(図 10)。その領域を増幅できるプライマーを Primer 3 を用いて設計した(図 11)。

### 6 . 住肉孢子虫の定量法の確立 - リアルタイム PCR 法の反応条件の決定

設計したプライマーにあわせてアニーリング温度を決定し、標的遺伝子領域の塩基数を増幅するのに適した



伸張反応時間を決定した。酵素は SYBR qPCR kit (GeneAmp SYBR qPCR Mix α) を用い、プロトコルに準拠して初期変性温度、反応時間、伸張反応温度を設定した (表 2 1)。

#### 7. 住肉孢子虫の定量法の確立 - 陽性対照の決定 -

定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照は、住肉孢子虫 18SrRNA 遺伝子をライゲーションしたプラスミドを用いた。制限酵素 *Hind* III を用いてプラスミドを切断し、段階希釈したものをサンプルとしてリアルタイム PCR 法で検出した (図 1 2)。各濃度の試料における Ct 値をもとに検量線を作成し、R 二乗値を求めた (図 1 3)。

#### C. 研究結果

本研究では採集したニホンジカ試料のうち、まず北海道のエゾシカ試料

89 検体を用いて上記のとおり実験を行った。馬肉と同様の実験手法でエゾシカ肉から核酸抽出を行う事が出来た。*S. fayeri* と同様の検出プライマーを用いて、定性 PCR 法を行った結果、住肉孢子虫由来の 18S リボソーム RNA 遺伝子領域 1100 bp の増幅が確認された (図 6)。

ここで増幅された 18SrRNA 遺伝子領域をアガロースゲルから抽出し、pMD20-T ベクターにライゲーションして T-A クローニングを行った。DH5 コンピテントセルにクローニングしたプラスミドを導入して形質転換を行ったところ、LB 培地上に多数のコロニーが確認された。その中から 10 個のコロニーを選び、個々に培養した後、プラスミドを抽出・精製した。釣菌したコロニーから抽出したプラスミド 10 個のうち、6 個のプラスミドに挿入した遺伝子配列が解析された。

解析が出来た領域はプラスミドによって異なり、最短 360 bp から最長 800 bp であった (図 8)。ここで得られた塩基配列について、NCBI の BLAST を用いた相同性検索を行った結果、各クローンについて、数種類の種が 98 % 以上の相同性を示した。コロニ-番号 DM-1-1 では *S. tarandi*、*S. elongata*、*S. truncata*、DM-1-2 は *S. tarandi*、*S. elongata*、DM-1-5 も同じく *S. tarandi*、*S. elongata*、DM-1-6 は *S. tarandi*、*S. elongata*、*S. truncata*、*S. silva*、sp.HM050622、DM-1-9 は *S. hjorti*、DM-1-10 で *S. tarandi*、*S. elongata*、*S. truncata*、sp.HM050622 が同定され、総合すると、一個体の試料から合計 6 種の *Sarcocystis* 属が同定された。

ここで得られた 6 種の 18SrRNA 遺伝子領域に共通する配列を定量的リアルタイム PCR 法の標的とした。そ

の結果、住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子領域の 853 番 bp から 1251 番 bp までの 399 bp が共通領域であった。その中で、定量的リアルタイム PCR 法による増幅に適した長さで配列を持つ領域を探索し、1135 番 bp から 1205 番 bp までの 71 bp を標的領域に決定した (図 10)。標的領域の増幅に適したプライマーは primer3 を用いて設計した。その結果、3 組のプライマーペアを候補とした (図 11)。これらの候補プライマーの GC 含有率からアニーリング温度を 60 に決定した。また、増幅配列の bp 数から、伸張反応時間を 60 秒間とした。全ての増幅反応条件は、初期変性を 95 にて 10 秒間、変性を 95 にて 30 秒間、アニーリングを 60 にて 60 秒間、伸張を 72 にて 60 秒間で行い、サイクル数は 45 とした (表 2 1)。

陽性対照は、住肉胞子虫 18SrRNA

を組み込んだプラスミド DNA を用いた。制限酵素 *Hind* III で切断した後、3 種類のプライマーペア候補を用いてリアルタイム PCR 法にて遺伝子増幅を試みた (図 1 2)。結果から得られた Ct 値と遺伝子コピー数の近似曲線を作成したところ、決定係数  $R^2$  値が 0.998 を示し、信頼度の高い検量線が得られた (図 1 3)。この結果から、最も Ct 値の誤差が少ないプライマーペアを選定した結果、図 1 1 に示した DMScommon 1 の Sarco. Deermeat 1-F  
5'-CGACTTCTCCTGCACCTTATGA  
-3'、Sarco. Deermeat 1-R  
5'-TTCAGCCTTGCGACCATACTC-  
3'に決定した。

これらの条件を用いて段階希釈した住肉孢子虫ゲノム核酸を試料として定量的リアルタイム PCR 法を行った結果、ピークの揃った融解曲線が示

され (図 1 4)。また、得られた Ct 値と試料の遺伝子コピー数には高い相関性を示す一時曲線が認められた (図 1 5)。

#### D. 考察

住肉孢子虫による食中毒に関しては、生食用馬肉での事例が発生した際に行われた危害性解明調査の結果、筋肉組織中に形成されたサルコシスト、ひいてはサルコシストに内包されたブラディゾイト量の摂取量に依存することが明らかにされている。有症事例試料から、遺伝子コピー数について  $10^6$  /g を上回るものについては危害性が想定されるという基準も設けられ、その後の生食用馬肉については、冷凍処理にて住肉孢子虫の食中毒危害性を消失させるよう定められた。生食用馬肉での事例からわずか一年後に同じく住肉孢子虫による食中毒事例を

起こしたシカ肉については、原因微生物が同じであることまで明らかにされたにも関わらず、安全性管理に関する詳細な調査はまだ完了していない。そのため、シカ肉による食中毒がどの程度の住肉胞子虫の摂取量で発症するかということも明らかにされていない。

これまでに野生ニホンジカでの住肉胞子虫調査はいくらか行われてきたが、その全てが組織切片内のサルコシストの顕微鏡検査にとどまっている。顕微鏡検査で検出される住肉胞子虫の判断基準は染色された虫体壁の厚みや、虫体の大きさを判断することが大部分を占め、それ以上の解析には限界がある。また、鑑別点を判断するには熟練を要するため、誰もが診断を出来る方法でないことに加え、検査者の主観が反映される可能性も拭いきれない。本研究では、今後食肉として

社会一般的に提供されることが強く推進されている野生シカ肉の安全性の担保に貢献するべく、食中毒危害性の検査法として住肉胞子虫の定量法の確立を試みた。

大まかには、野生ニホンジカに寄生している住肉胞子虫の塩基配列を決定し、その配列内から定量的リアルタイム PCR 法に適した標的塩基配列を決定、続いて標的塩基配列の増幅に適切なプライマーを設計し、定量のため信頼性の高い検量線を示す陽性対照を作製して検査法を考案した。野生ニホンジカ肉の住肉胞子虫の検出に厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法を用いたところ、1100 bp の遺伝子が増幅されたが、この塩基配列を解析したところ、*S. fayeri* は検出されなかった。代わりに、*S. tarandi*、*S. elongata*、*S.*

*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欠であるため、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。

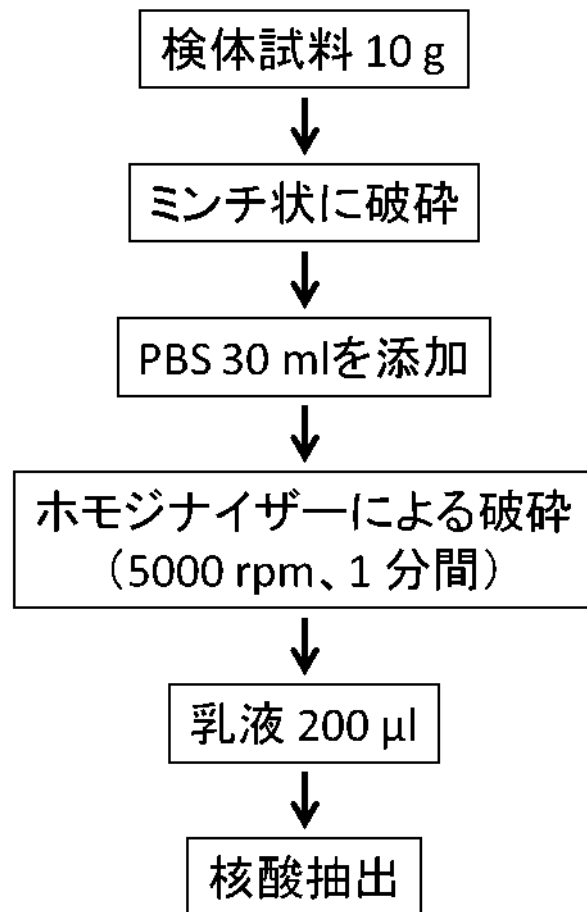


図5 . 試料からの住肉胞子虫ゲノム抽出法



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 <sub>2</sub> 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	temprature	Time
Initial denaturation	94	3分間
Denaturation	94	30秒間
Annealing	60	60秒間
Extention	72	60秒間
Final extention	72	5分間
Cooling	4	保持

} 30 サイクル

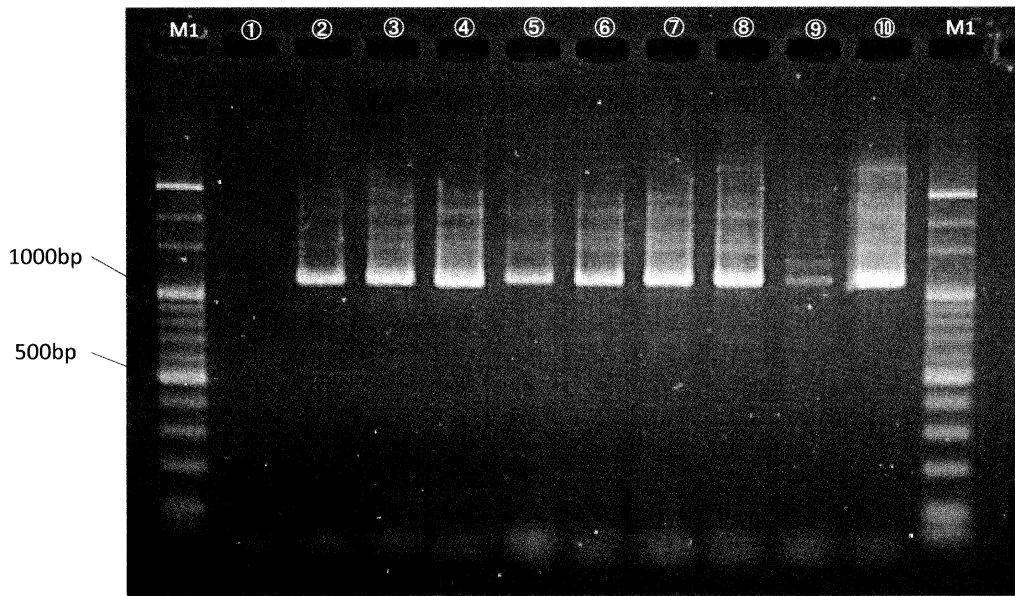


図6 . エゾシカ試料からの住肉胞子虫 18SrRNA 検出用定

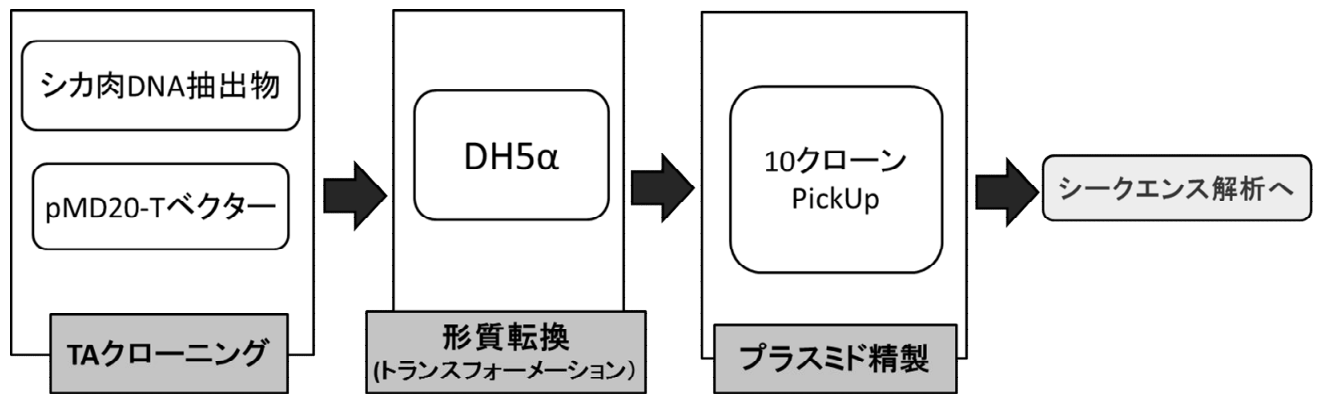


図7 . エゾシカ由来住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子塩基配列

DM-1-1 Consensus 配列

1 60  
AATGATGGGAATCTAAACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA  
GCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA  
GTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGATGAATT  
CTGGCATCTAGTATCCCTAATATGGTCACGATTTTCAGTAATCGTGACTTCTTATTAGGG  
ATAATACAGTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTGTTGCCTTGAATACT  
GCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAAAT

DM-1-2 Consensus 配列

1 60  
GTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTTATTTCTAGTGATTGGAATGATGGGAATCCA  
AACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCA  
GCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCTGCTG  
GAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTTCACTTGATGAATTCTGGCATTTACGATC  
CCTAATATGGTCACGATTTTCAGTAATCGTGACTTCTTATTAGGGATAATACAGTTACTT  
TGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTTTGTGGCTTGAATACTGCAGCATGGAAT  
AACAAATATAGGATTTTCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAAATAATGATTAATAG  
GGACAGTTGGGGG

DM-1-5 Consensus 配列

1 60  
AATGATGGGAATCTAAACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA  
GCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTA  
GTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGATGAATT  
CTGGCATCTAGTATCCCTAATATGGTC\*CGATTTTCAGTAATCGTGACTTC\*TATTAGGG  
ATAATACAGTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTGTTGCCTTGAATACT  
GCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAAAT  
A

図8 . エゾシカ由来住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子塩基配列

## DM-1-6 Consensus 配列

1 60  
 TGGCGATAGATCATTCAAGTTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTAGTGTATTGGACTAC  
 CCGTGGCAG\*GACGGGTAACGGGG\*ATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAA  
 ACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGA  
 GGTAGTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTTATTTCTAGTGATTGGAATGATGGGAA  
 TC\*AAACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
 TCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCT  
 GCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGATGAATTCTGGCATCTAC  
 GATCCCTAATATGGTC\*CGRTTTTCAGTAATCGTGACTTCTTATTAGGGATAATACAGTT  
 ACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTGAAGCAGGCTTGTTGCCTTGAATACTGCAGCATGGAA  
 TAACAATATAGGATTTTCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGACTGAA\*TAATGATTAATA  
 GGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAG  
 ACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG  
 GGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATA  
 GGAAAATGTCAGTGTTCGACTTCTCC

## DM-1-9 Consensus 配列

1 60  
 CGATAGATCATTCAAGTTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTAGTGTATTGGACTACCG  
 TGGCAGTGACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG  
 CTACCACAT\*TAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGAGGTA  
 GTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTATTTCTAGTGATTGGAATGATGGGAATTTA  
 AACCCCTTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATCCA  
 GCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATGTCTGCTG  
 GAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTGTAGGGTGTGCACTTGATGAATTCTGGCATCTATGTC  
 \*\*AATGTAATACGGCGACGGTGTATATGGGTAAATCCTATATACCCGTTTTTGTATATTA  
 TATTGGGATAATACCGTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTGAAGCAGGCTAATTGCCTT  
 GAATACTGCAGCATGGAATAACAATACAGGATTTTCGGTCTATTTTGTGGTTTCTAGGA  
 CTGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAA  
 TTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTA  
 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  
 GATTGGAATGATGGGAATTTAAACCCCTTT CAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTG  
 CCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG  
 CTCGTAGTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTTAGGGTGTGCACTTGA  
 TGAATTCTGGCATCTATGATCCCTAGTACGGTCACGATTTTCAGTAATCGTGACTTCTTA  
 TTAGGGATAATACAGTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTGTGTCCTTG  
 AATACTGCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTCCGTTCTATTTTGTGTTTCTAGGAC  
 TGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATT CGTATTTAACTGTC\*\*AGGTGAAAT  
 TCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTATTAAAT  
 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

TTGCCTTGAATACTGCAGCATGGAATAACAATATAGGATTTTCGGTTCATTTTTG  
 TTGGTTTCTAGGACTGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGCATTCGTAT  
 TTAAGTGTTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACTACTGCGAAAG  
 CATTTGCCAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGCTCGAAGAC  
 GATCAGATAACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATAGGAAA  
 ATGTCACTGTTTT**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	10 分間
Denaturation	95	30 秒間
Annealing	60	60 秒間
Extention	72	60 秒間

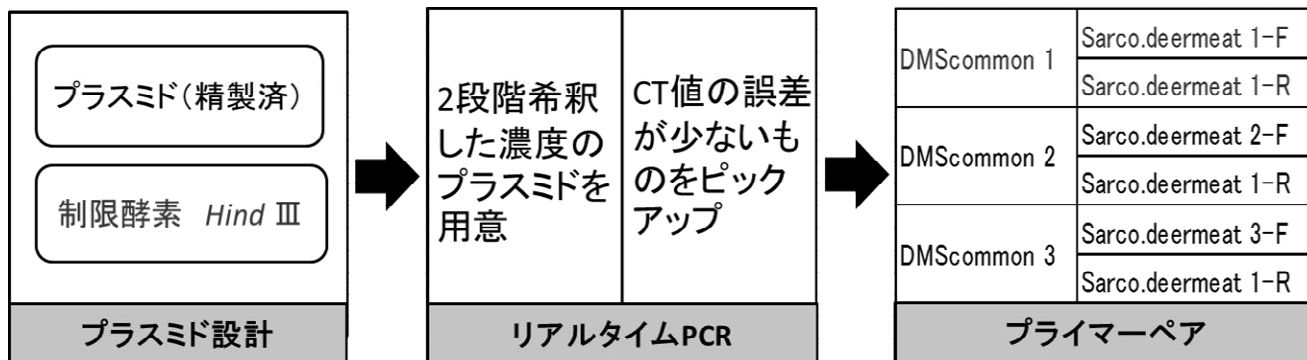


図 1 2 . 定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照の選定方法チャート

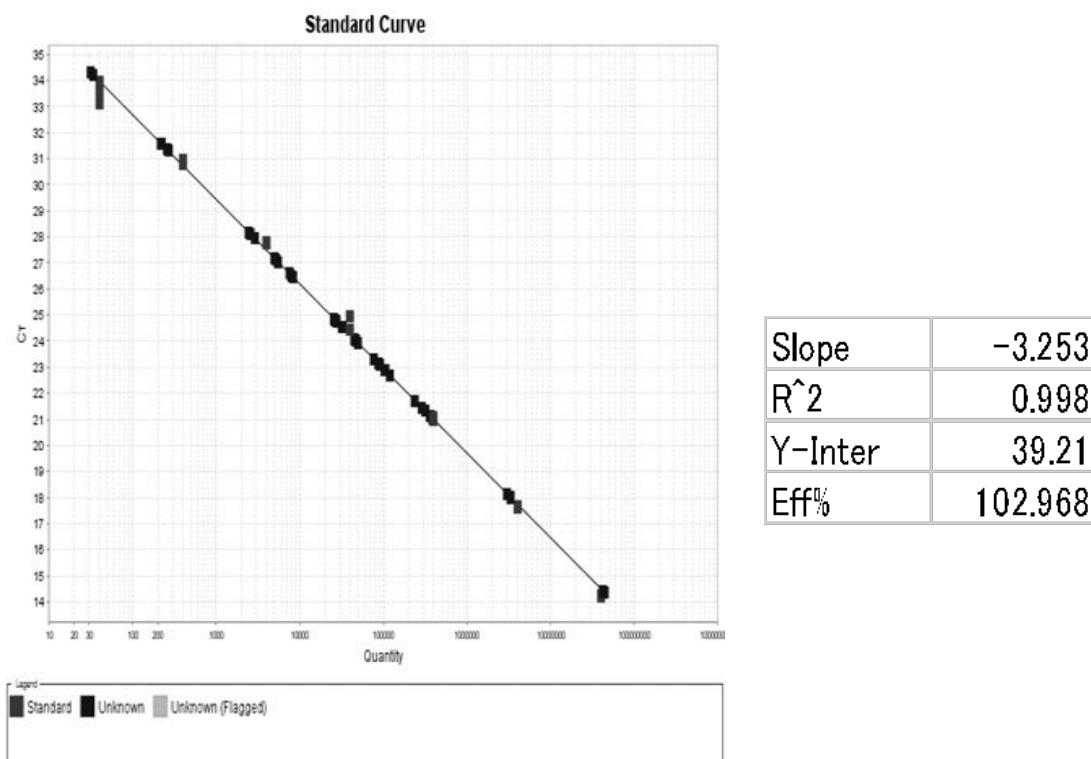


図 1 3 . 定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照による検量線

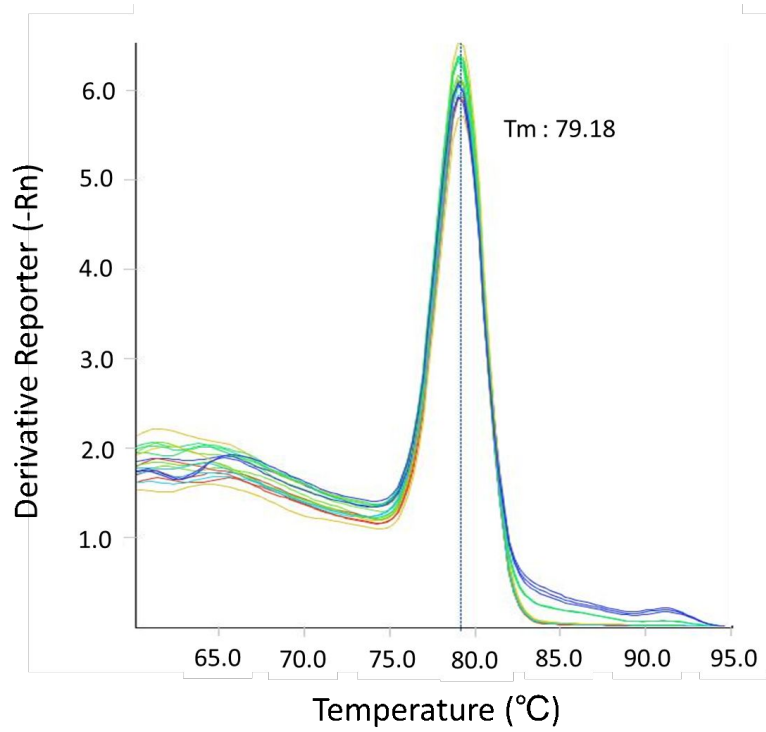


図 1 4 . 定量的リアルタイム PCR 法による融解曲線

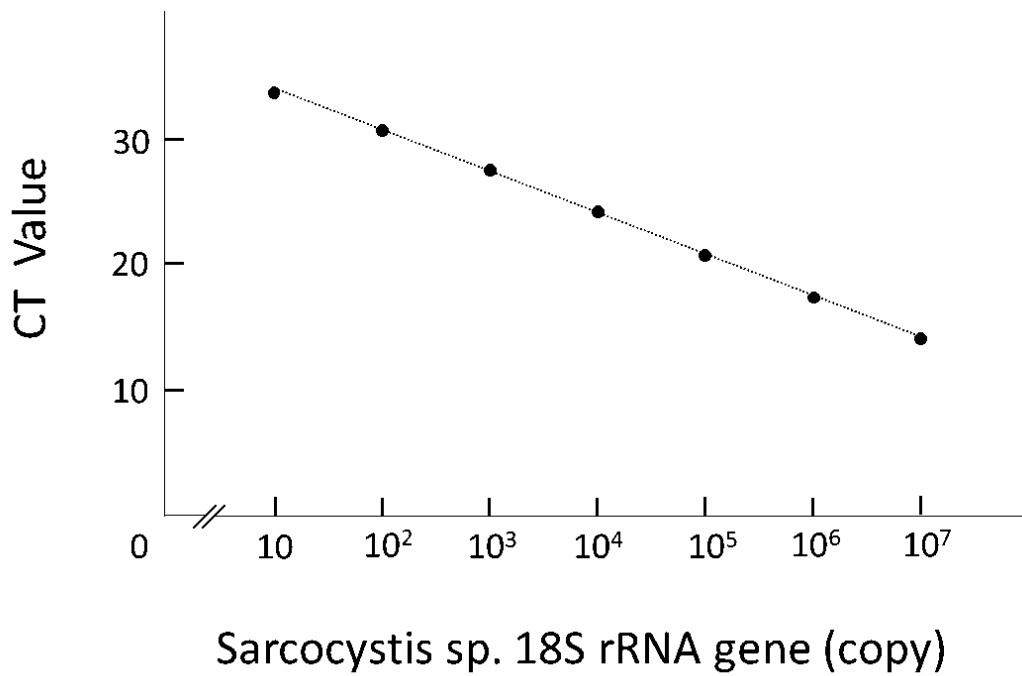


図 1 5 . 定量的リアルタイム PCR 法による試料コピー数と Ct 値の相関



**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孢子虫の疫学調査：北海道エゾシカでの実地調査

要旨

住肉孢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。基本的には住肉孢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孢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孢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孢子虫の定量的検査法を用いて、ニホンジカにおける住肉孢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 検体には全て住肉孢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、 $1 \times 10^5$  から  $1000 \times 10^5$  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孢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孢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。本研究者達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ことから、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 1 g あたりの遺伝子コピー数は、最小値が  $0.6 \times 10^5$ 、最大値は  $6014 \times 10^5$ 、平均値は  $343 \times 10^5$ 、中央値は  $79.3 \times 10^5$  であった。地域ごとに分類した群では、道北では最小値が  $5.8 \times 10^5$ 、最大値は  $224.7 \times 10^5$ 、平均値は  $76.3 \times 10^5$ 、中央値は  $79.3 \times 10^5$  であった。道東では最小値が  $52.2 \times 10^5$ 、最大値は  $3700.5 \times 10^5$ 、平均値は  $630.1 \times 10^5$ 、中央値は  $272.3 \times 10^5$  で、道南では最小値が  $0.6 \times 10^5$ 、最大値は  $6014 \times 10^5$ 、平均値は  $338 \times 10^5$ 、中央値は  $44 \times 10^5$  であった(表 2 2)。供試検体全体の遺伝子コピー数の分布は 1 g あたり  $10 \times 10^5$  から  $500 \times 10^5$  にかけて多く、 $100 \times 10^5$  が最も多かった(図 1 8)。

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 1 9)。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  $334.4 \times 10^5$ 、雌個体群で  $348.4 \times 10^5$ 、中央値では雄個体群  $68.6 \times 10^5$ 、雌個体群で  $79.5 \times 10^5$  と、大きな相違は認められなかった(図 2 0)。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、1 g あたり遺伝子コピー数  $10 \times 10^5$  から  $100 \times 10^5$  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、 $1 \times 10^5$  から  $6000 \times 10^5$  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  $5.8 \times 10^5 \sim 224.7 \times 10^5$ 、であったのに対し、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  $76.3 \times 10^5$ 、道東  $630.1 \times 10^5$ 、中央値が道北  $79.3 \times 10^5$ 、道東  $272.3 \times 10^5$  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  $0.6 \times 10^5$  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  $6014 \times 10^5$  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。





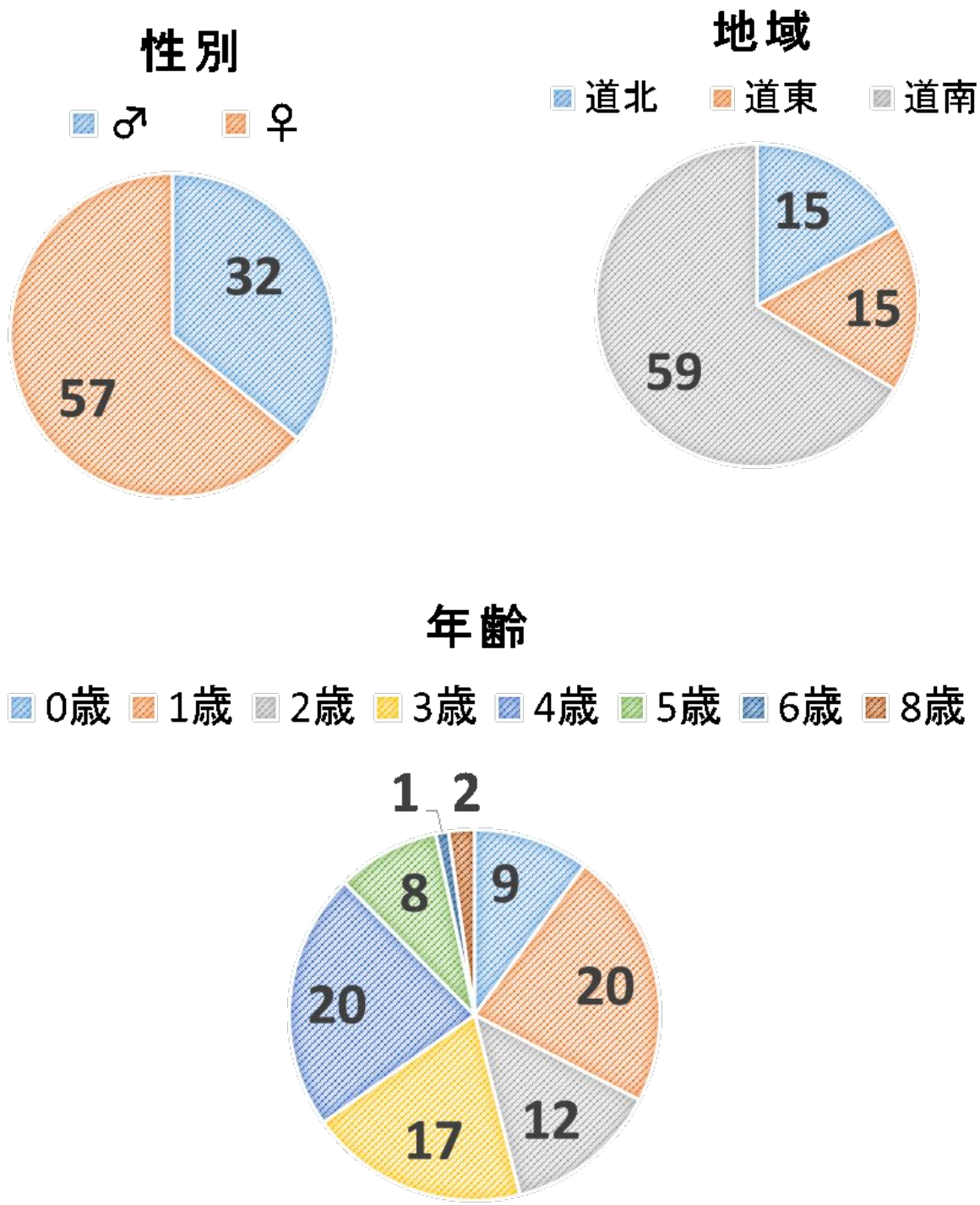


図 1 7 . 北海道由来試料の要因別分類

	全体 (copies /g) × 10 <sup>5</sup>	道北 (copies /g) × 10 <sup>5</sup>	道東 (copies /g) × 10 <sup>5</sup>	道南 (copies /g) × 10 <sup>5</sup>
最小値	0.6	5.8	52.2	0.6
最大値	6013.9	224.7	3700.5	6013.9
平均値	343.3	76.3	630.1	338.4
中央値	79.3	79.3	272.3	44.5

表 2 2 . 北海道由来試料の要因別分類

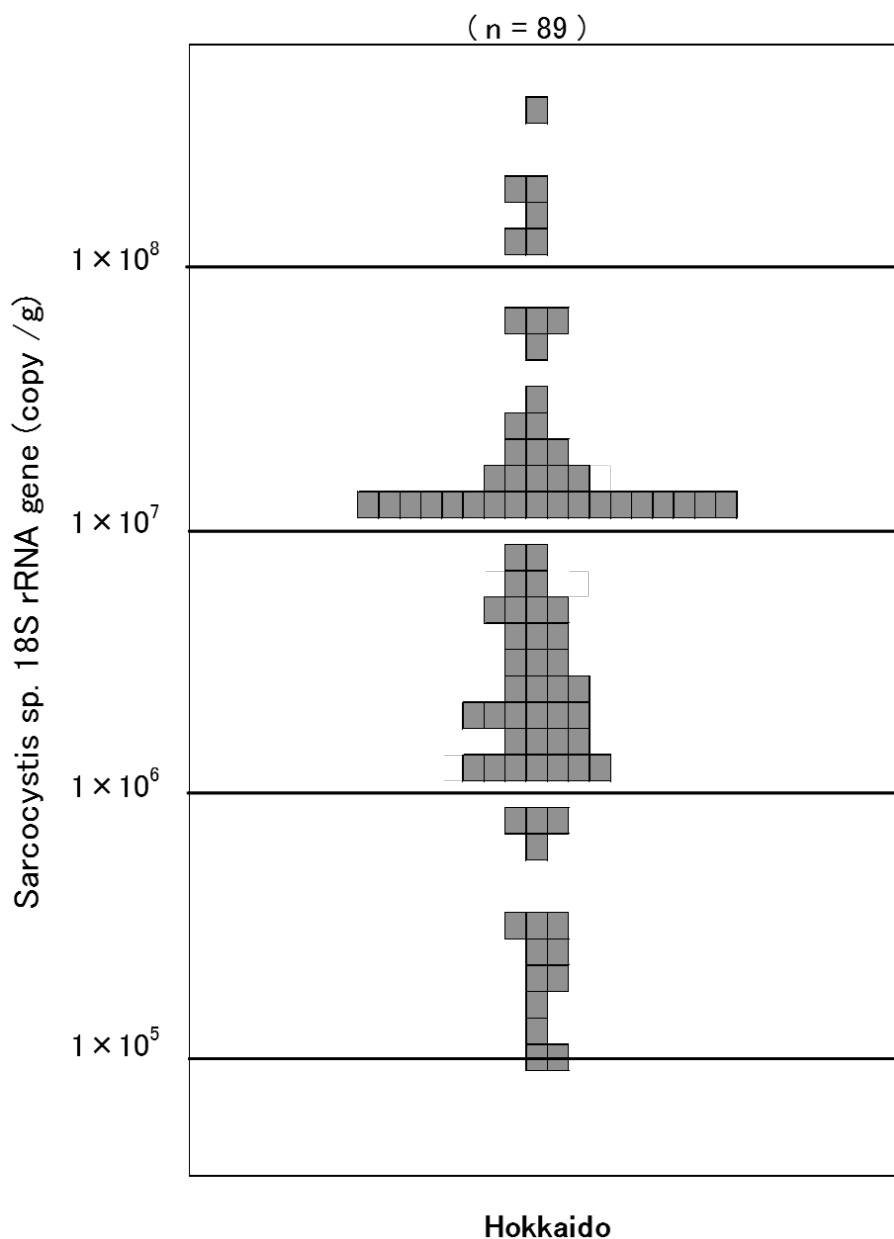


図 1 8 . 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布 (全体)

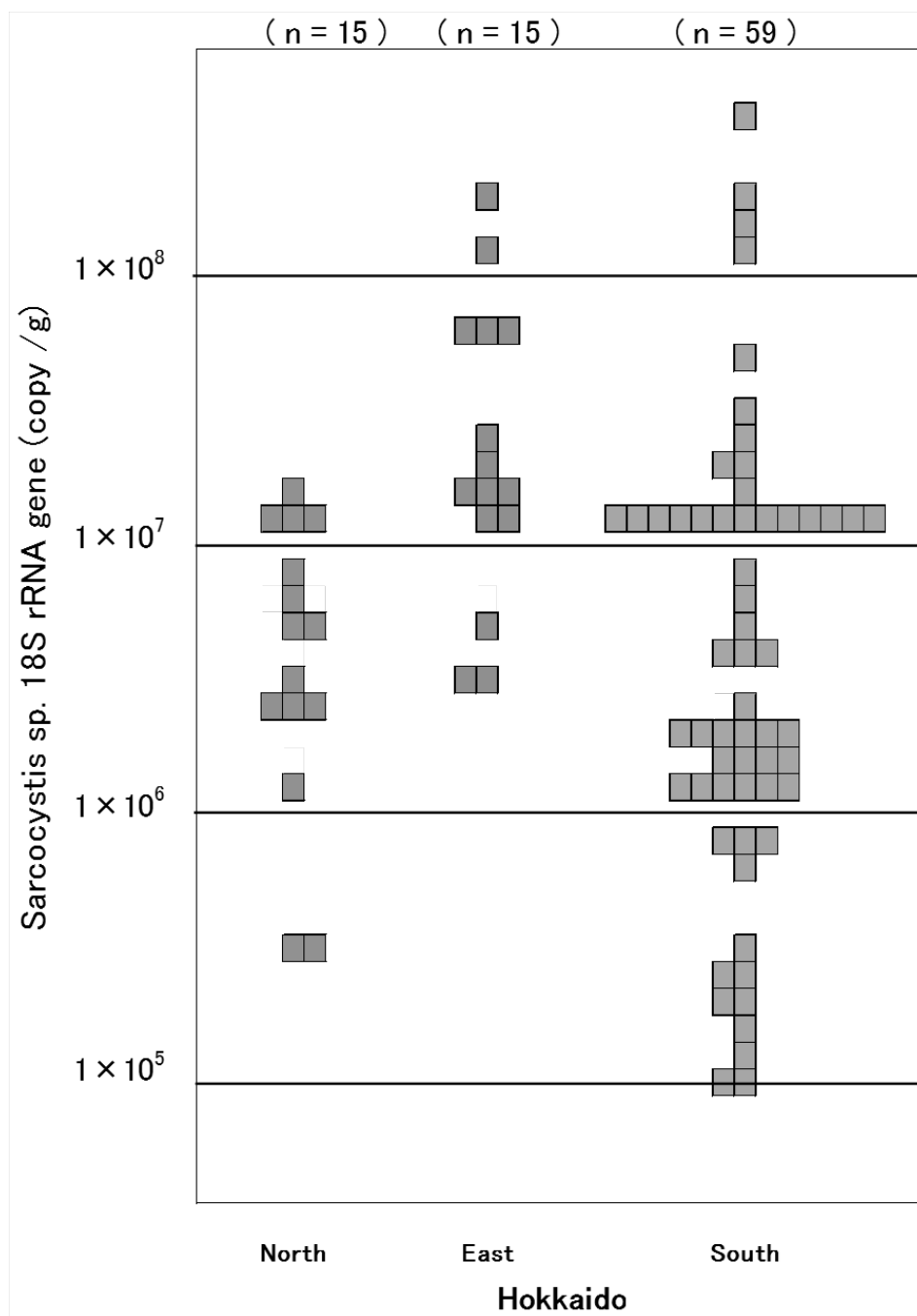


図 19 . 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布 (地域)

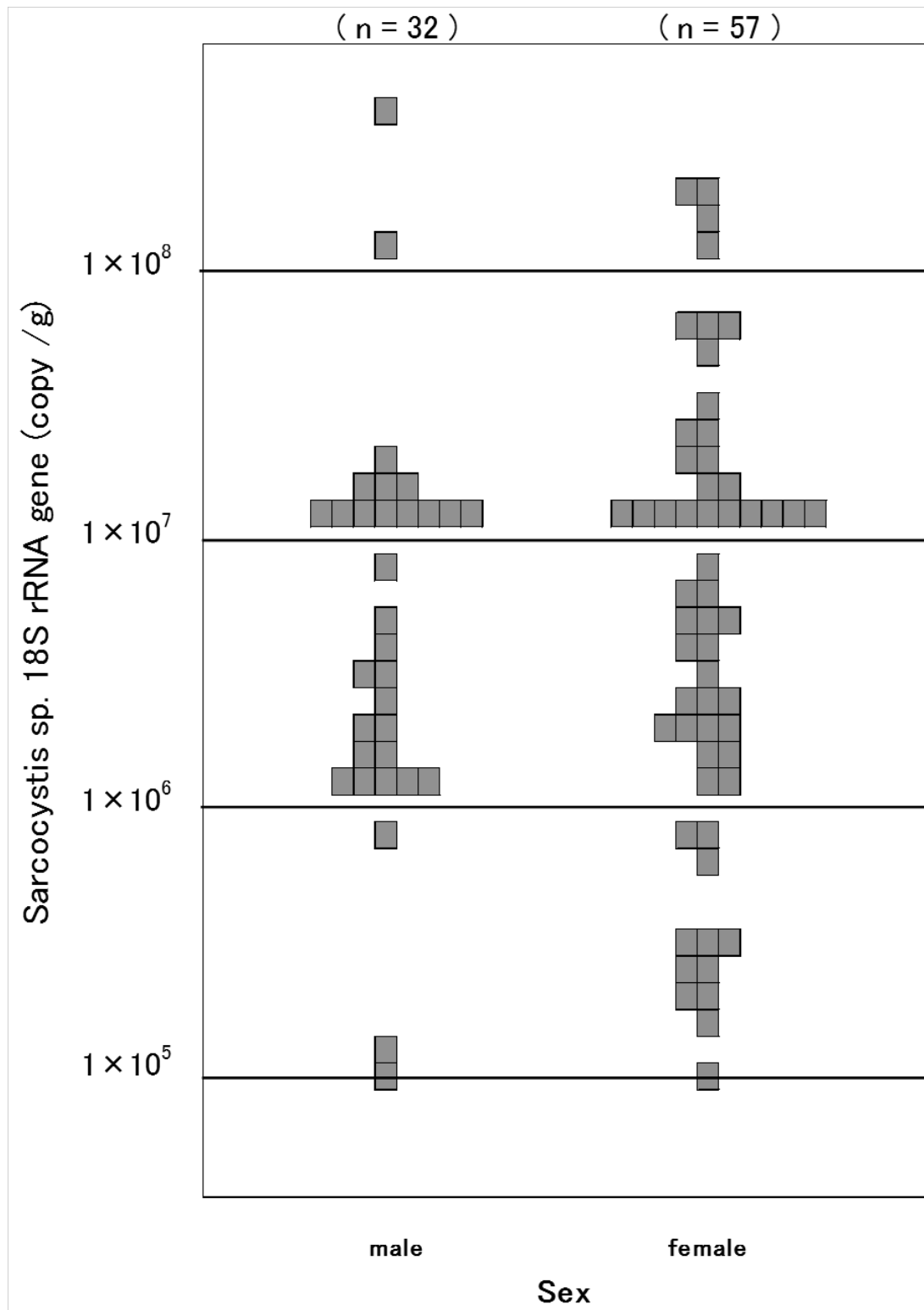


図 20 . 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布 (性別)

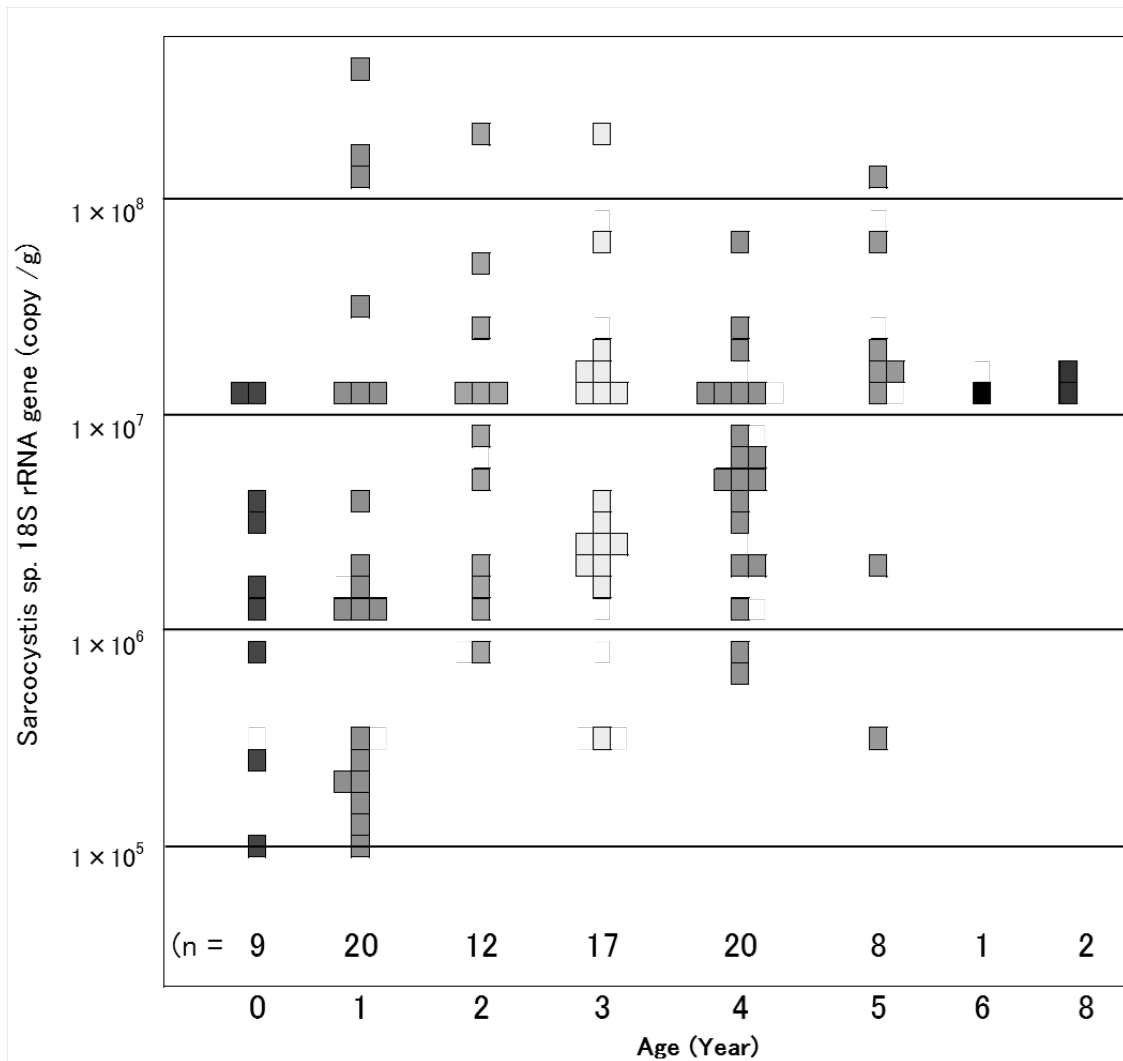


図 2 1 . 北海道由来試料における住肉孢子虫遺伝子コピー数の分布 (年齢)

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					