

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～28年度 総合研究報告書

研究代表者 山崎 朗子

岩手大学 農学部

平成29（2017）年 5月

1.

目 次

I. 総合研究報告

　　国内野生ジカにおける病原性寄生虫の疫学的研究

　　山崎朗子（岩手大学 農学部共同獣医学科）

1. 各地自治体からの野生ニホンジカ採取試料分類	-----	3
2. 野生ニホンジカにおけるクリプトスピリジウムおよびジアルジアの疫学調査	-----	16
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法の確立その1	-----	30
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	-----	51
5. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の検査法の確立：18SrRNAを標的にした新規定性的PCR法の確立	-----	63
6. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の検査法の確立：18SrRNAを標的にした新規定量的PCR法のその2	-----	78
7. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の疫学調査：北海道、本州、九州に生息する各地の野生ニホンジカを対象とした疫学調査	-----	95
8. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の食中毒性検査：マウスを用いた腸管ループテスト	-----	112

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）

研究要旨

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、クリプトスピリジウム、ジアルジア調査に用いる直腸内容便、住肉胞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と、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、これからのがん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工産業が始まろうとしている。特に獣害被害を多く受けていたり、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、これからのがんのジビ工産業振興のために不可欠である数々のジビ工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。我が国のジビ工産業は、鳥獣被害対策の一環である面が強いため、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、その害獸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、未来のジビ工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、田畠など、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、獵友会に依頼し、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獵友会を訪れ、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に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に送付した。

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。クリプトスピリジウム、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 cm²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。

検体、静岡県から45検体、三重県から47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173検体、熊本県から19検体、宮崎県から5検体の計666検体である。地方別の検体数は、北海道244検体、関東地方39検体、東海地方92検体、甲信越地方42検体、近畿地方52検体、九州地方197検体であった（表1）。

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244検体、千葉県から39

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月の一斎捕獲期、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っていた(図2)。また、捕獲時の年齢も判明しないものがありながらも1歳未満から5歳以上を採集できた(図3)。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。クリプトスボ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。

D. 考察

本研究では、合計述べ数666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、自治体行政と獵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獵友会等の狩猟者へと届けられるため、獵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ても、獵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獵友会では協力を得られなかつた。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なため、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。

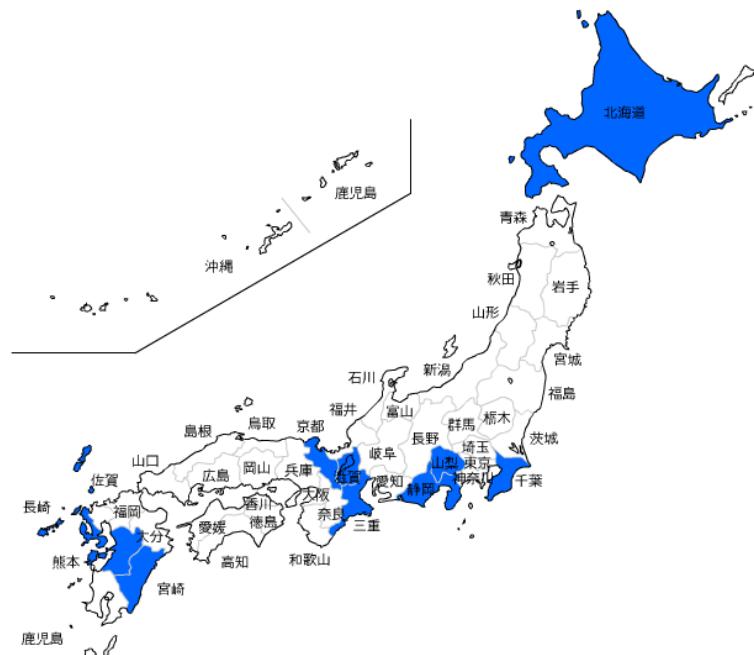


図 1 本研究での試料採取地域

表 1. 試料採取都道府県と検体数

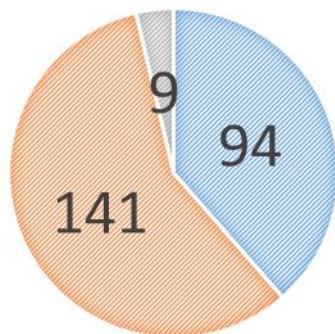
地図	都道府県	件件数	地方別検体数
北海道	北海道	244	244
関東	千葉	39	39
東海	静岡	45	92
	三重	47	
甲信越	山梨	42	42
近畿	滋賀	23	52
	京都	29	
九州	長崎	173	197
	熊本	19	
	宮崎	5	
合計		666	

表2 . 試料採取時期

月	都道府県									
	北海道	千葉	静岡	山梨	三重	滋賀	京都	長崎	熊本	宮崎
1	2			5			16	14	3	
2	7			3				23	3	
3	2			3	30	8		12	3	
4		1		4				7		
5	4	1	11	4				2		
6	8	17		4				15		
7	3	5						15		
8	18	3						6		
9	25	2		4				16		
10	53	6	17	4	13	1		25		
11	17	2		2		11		18	5	
12	5	2	17	9		3	13	20	5	5
時期不明	100				4					
合計	244	39	45	42	47	23	29	173	19	5

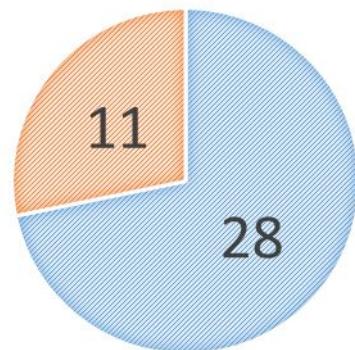
北海道

■ ♂ ■ ♀ ■ 性別不明



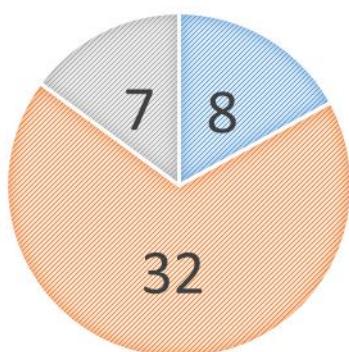
千葉県

■ ♂ ■ ♀



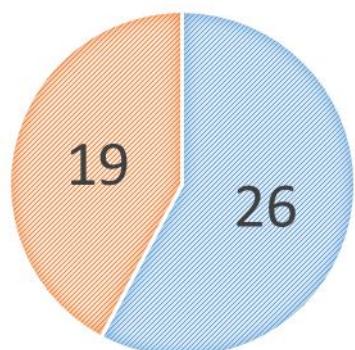
三重県

■ ♂ ■ ♀ ■ 性別不明



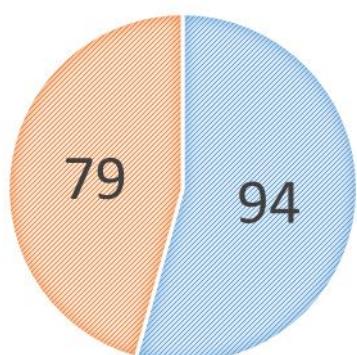
静岡県

■ ♂ ■ ♀



長崎県

■ ♂ ■ ♀



山梨県

■ ♂ ■ ♀

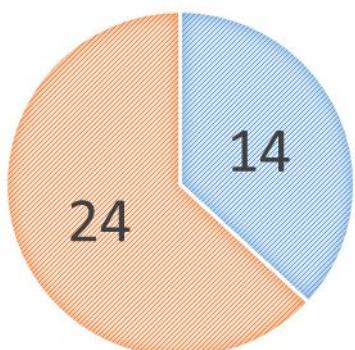
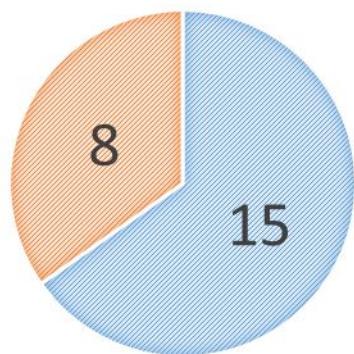


図2 - 1 . 各自治体での試料における雌雄差

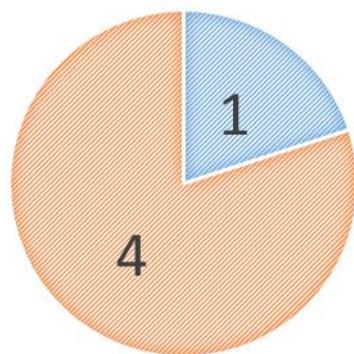
滋賀県

■ ♂ ■ ♀



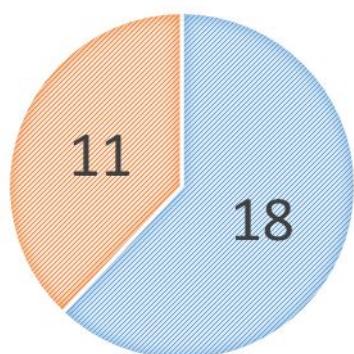
宮崎県

■ ♂ ■ ♀



京都府

■ ♂ ■ ♀



熊本県

■ ♂ ■ ♀

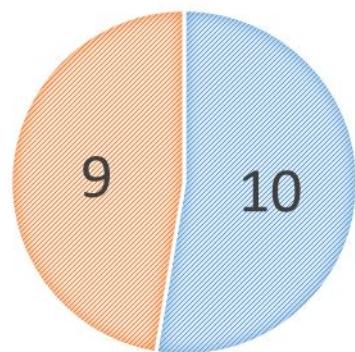


図2 - 2 . 各自治体での試料における雌雄差

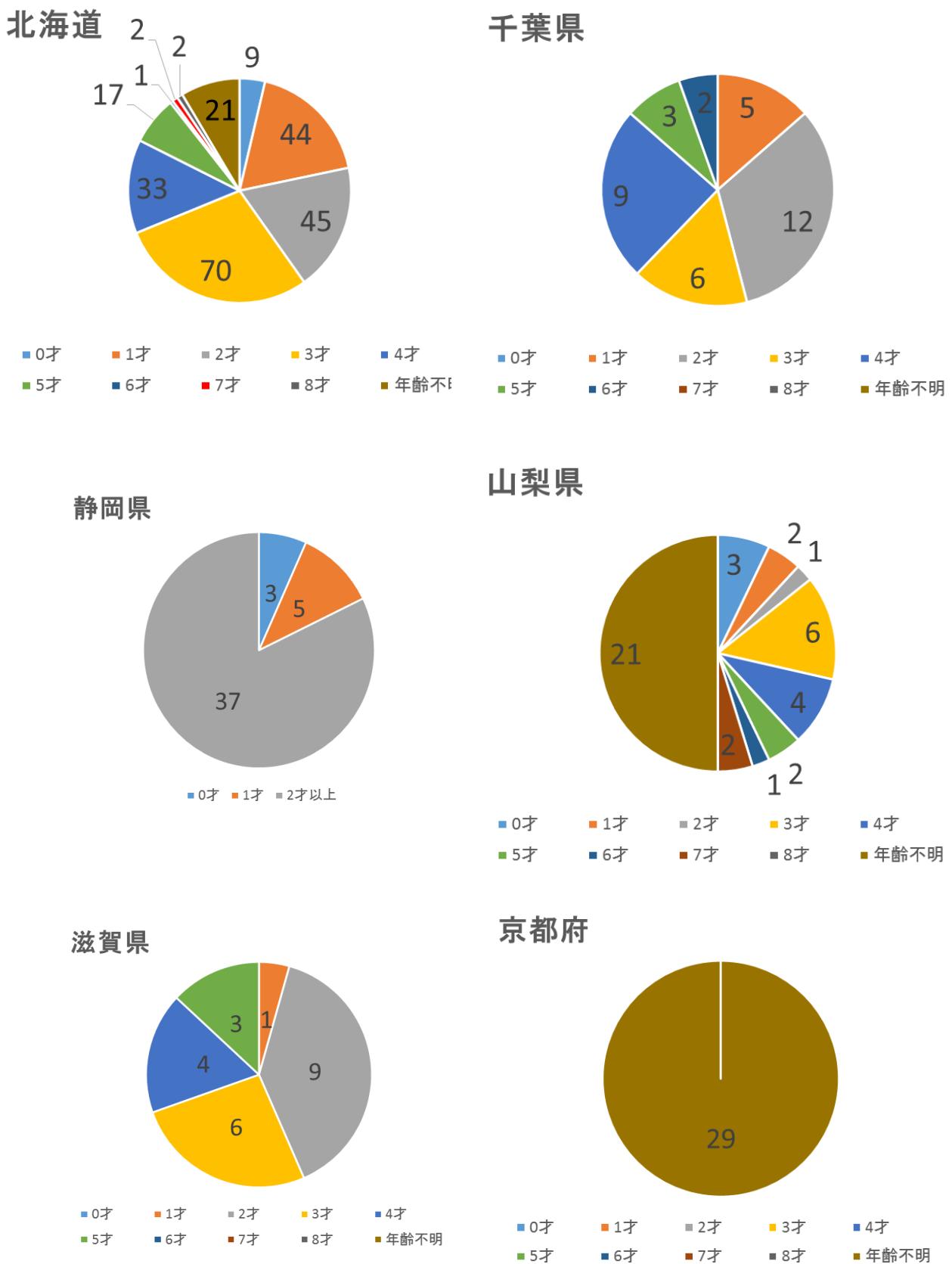
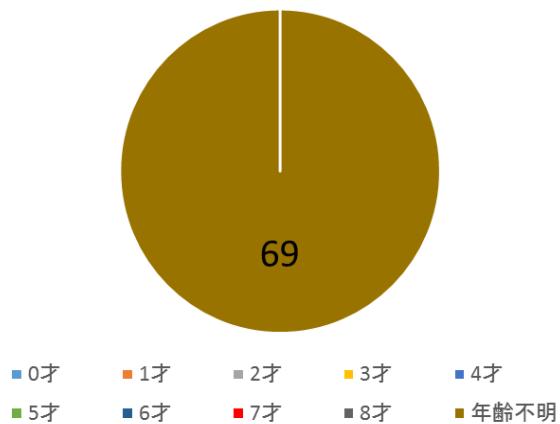
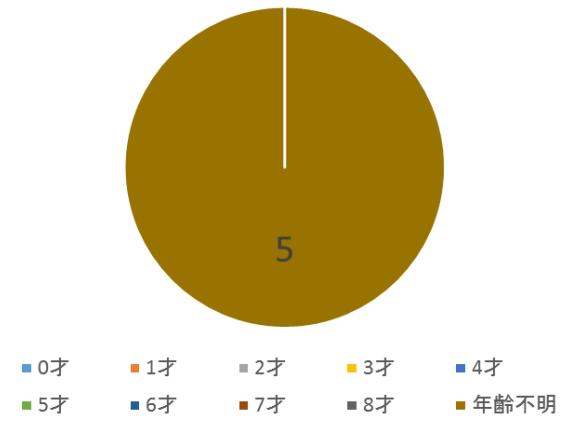


図3-1. 各自治体での試料における年齢差

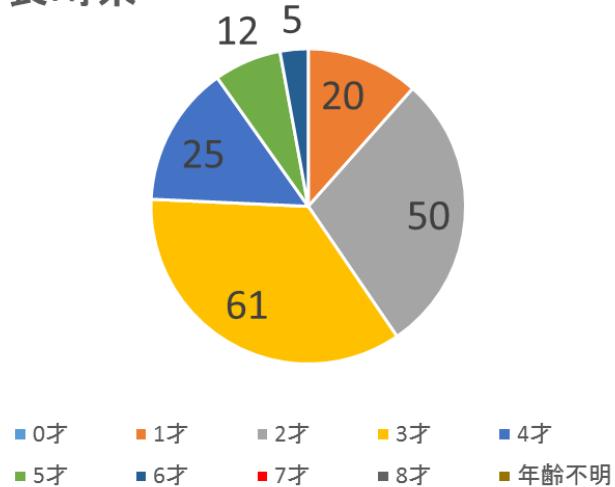
三重県



宮崎県



長崎県



熊本県

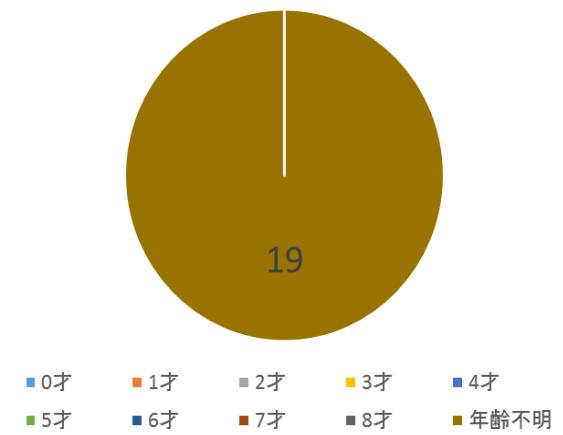


図3-2. 各自治体での試料における年齢差

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ピロジウム・ジアルジアの疫学調査

研究要旨

クリプトスピロジウム、ジアルジア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*、*Giardia intestinalis*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。宿主となりうるこれらの野生動物の個体数の増加によりクリプトスピロジウム・ジアルジア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ピロジウムおよびジアルジアの検出を試み、その分布についての疫学的調査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クリプトスピロジウムおよびジアルジアの存在が明らかになった。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、クリプトスピロジウムについては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な危害性をもつ種ではなかった。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。一方、ジアルジアについては、*Giardia intestinalis* が検出された。こちらについては、陽性率こそ低いが、多種の動物を宿主にし、人への病原性が証明されていることから、今後の感染率の拡大と感染伝播が危惧される。

これまで、クリスピロジウムおよびジアルジアといった水系感染性原虫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。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野生動物が水源の汚染源になり得る可能性を精査した。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は、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について重視すべきである。

A. 研究目的

クリプトスパリジウムおよびジアルジア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。クリプトスパ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、免疫不全者にでは脅威であり、死亡する可能性が高い。同様に、ジアルジアについても特にヒトに病原性を示すことで知られている *Giaridia intestinalis* も宿主範囲が広く、現代に至っても根絶されることなく散発的に発症を起こしている。このことが、先進国、発展途上国を問わずクリプトスパリジウム・ジアルジア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。クリプトスパリジウム・ジアルジアの宿主となりうるこれらの野生動物が家畜動物と比べ遙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パリジウム・ジアルジア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パリジウム・ジアルジア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パリジウム・ジアルジアの検出を試み、クリプトスパリジウム・ジアルジア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害性を検討する。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パリジウム・ジアルジア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* および *Giardia intestinalis* 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、クリススパ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、クリプトスパリジウム・ジアルジア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に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「クリプトスパリジウム症・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パリジウムおよびジアルジア原虫を濃縮する。

1) 糞便からの分離

ポリプロピレン製栄研スピツツ管に糞便

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。新しい栄研スピツ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ットで滴下していく。全て注ぎ終えたら、栄研スピツツ管を洗うように 5 ml の精製水または PBS を加え、再びスポットで漏斗に注ぐ。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

試料懸濁溶液が入ったポリプロピレン栄研スピツツ管に最終濃度 20 %になるよう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、 $1000 \times g$ 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 것을为了避免するために、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 層の交雑物をスポットで吸引、またはデカンテーションで除去する。その際、管壁についた交雫物等は綿棒で拭い取る。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。 $1000 \times g$ 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 ℃ で行い、融解は 85 ℃ 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 Protease K 溶液で 56 ℃ 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 ℃ にて保存した。

2 . クリプトスパリジウム属およびジアルジア属の検出

試料中のクリプトスパリジウム属およびジアルジア属の検出にはリアルタイム PCR 法を用いた。クリプトスパリジウム 18S リボソーム RNA を標的とした Cycleave® RT-PCR *Cryptosporidium* 18S rRNA Detection kit (Takara) と Cycleave® RT-PCR *Giardia* 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 3）、37 ℃ にて 15 分間で行った（表 4）。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 5）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 6）。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ボリジウム属およびジアルジア属原虫の検出を行った。各自治体によって陽性検出率には相違があった。クリプトスボリジウムについては、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（表 7）。ジアルジアについては、千葉県では 0 % (0/27) 静岡県 0 % (7/45) 山梨県 0 % (0/40) 滋賀県 0 % (0/23) 京都府 3.5 % (1/29) 三重県 0 % (0/25) 熊本県 0 % (0/7) 宮崎県 0 % (0/5) 長崎県 1.7 % (1/58) という陽性率が確認された。雌雄間では雄 0.7 % (1/135) 雌 0.8 % (1/129) であった（表 7）。地域別、雌雄別の陽性率に有意差はなかった。クリプトスボリジウムの陽性率はジアルジアの陽性率に比べ、有意に高かった（表 7）。これらの陽性検体について塩基配列を解析したところ、クリプトスボリジウムでは *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。ジアルジアについては、*G. intestinalis*がBLASTによる相同性検索で100 %の相同性を示した（表8）。

更に、系統樹解析の結果、検出されたクリプトスボリジウム3種は全て反芻獣に感染するクラスターに属しており、ジアルジアは *G. intestinalis* の Assamblage のうち、最もヒトでの症例が多く見られる Assamblage A に属する事が分かった（図5、図6）。

D. 考察

クリプトスボリジウム、ジアルジアは、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ボリジウム、ジアルジア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畠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た、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ボリジウムおよびジアルジ

ア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 県からクリプトスピリジウムが、また、京都府と長崎県の 2 県からジアルジアが検出された。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ピリジウムおよびジアルジア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も、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が、今後とも注意喚起は必要である。しかし、ジアルジアについては、今回検出された種はヒトに対して病原性を持つものであるため、陽性率は低いものの、*G. Intestinalis* が幅広い種の宿主に感染する特性を持つ事を考えると、シカから各種の野生動物、家畜等への感染拡大を経て、水源汚染に繋がる可能性を考慮する必要がある。

雌雄別に解析したクリプトスピ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ピ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ピ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。

これまで、家畜を対象としたクリプトスピリジウムおよびアルジアの調査では年齢による影響を示したものが多かったが、本研究結果での陽性個体はどちらも若齢ではなく、成獣であることから、本来ならば成長に伴う免疫力の向上により排出される原虫がなんらかの原因により、生残していると考えられる。

また、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獵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

叶わなかつ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ピ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ピリジウムおよびジアルジア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ピリジウムおよびジアルジアに感染している

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、クリプトスピリジウムでは *C. sp. deer genotype*、*C. ryanae*、*C. bovis*、では、*G. intestinalis* Assamblage A 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、キュウシュウジカという宿主の種の違いは今回検出した感染原虫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* はウシを宿主とすることも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や、水源汚染の元凶となりうる可能性が示唆される。

12th International Symposium
“Toxins, Pathogens, and Foods:
Challenges and Opportunities for
Public Health” May 16-18, 2017,
US FDA Facilities, Laurel and College
Park, MD

G. 研究発表

学科発表（国際学会）

UJNR Toxic Microorganisms Panel

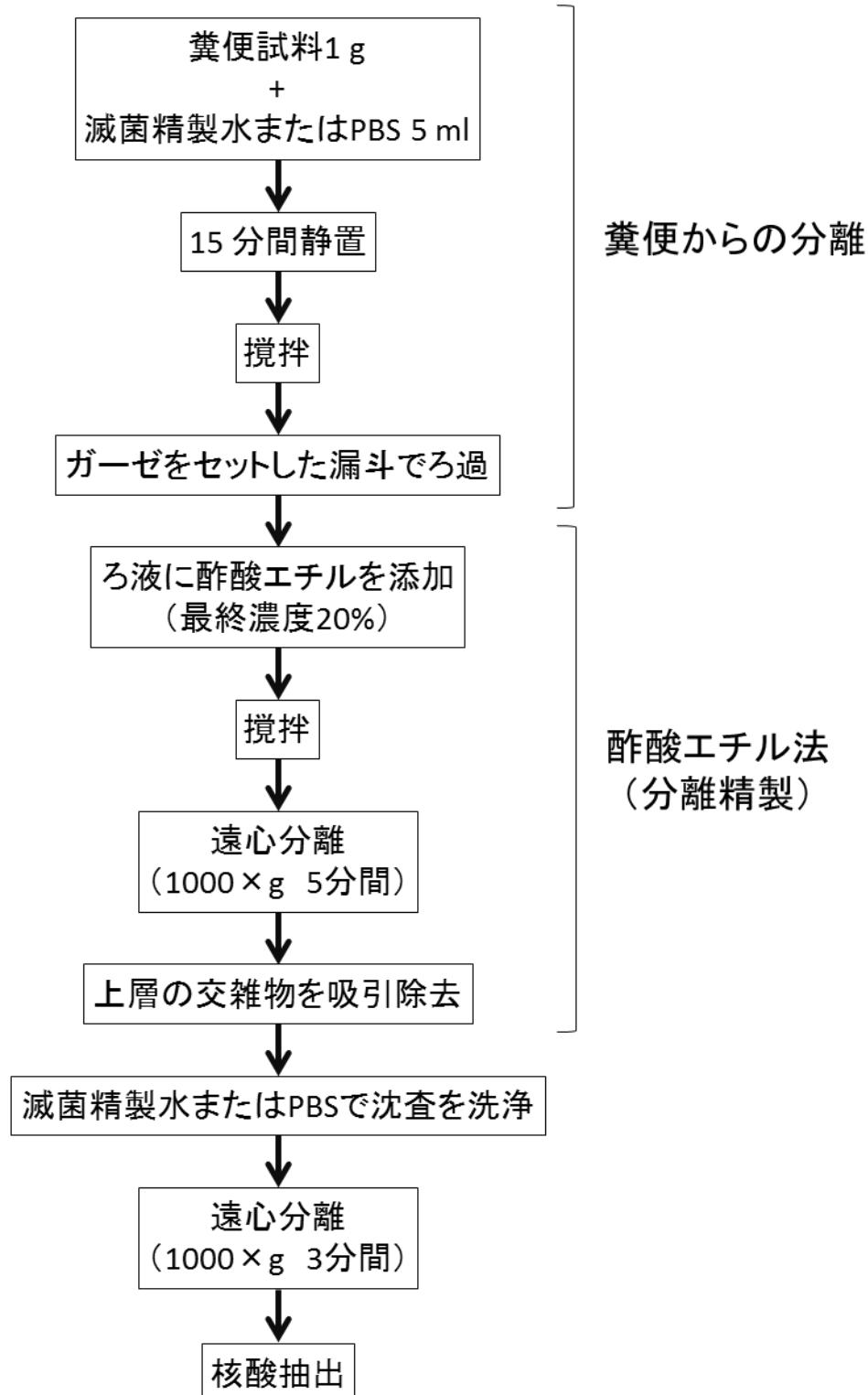


図4 粪便試料からの原虫分離法

表3 . クリプトスボリジウム・ジアルジア逆転写反

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

表4 . クリプトスボリジウム・ジアルジア逆転写反

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

表5 . クリプトスボリジウム・ジアルジアリアルタイム PCR 反応液

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

表6 . クリプトスボリジウム・ジアルジアリアルタイム 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

表7 . 野生ニホンジカにおけるクリプトスピリジウム・ジアルジア調査結果

	Cryptosporidium			Giardia			Crypto / Giardia	
	No. of deer	no. of PCR positive with SSU-rRNA	%	p value of Fisher's exact test	No. of deer	no. of PCR positive with SSU-rRNA	%	p value of Fisher's exact test
Area				0.055				0.817
Kanto 1	27	3	11.1		27	0	0.0	
Kanto 2	45	7	15.6		45	0	0.0	
Chubu	40	1	2.5		40	0	0.0	
Kinki 1	25	0	0.0		25	0	0.0	
Kinki 2	29	4	13.8		29	1	3.4	
Kinki 3	23	0	0.0		23	0	0.0	
Kyushu 1	19	0	0.0		19	0	0.0	
Kyushu 2	5	1	20.0		5	0	0.0	
Kyushu 3	58	2	3.4		58	1	1.7	
Gender				0.2				0.975
Male	135	11	8.1		135	1	0.7	
Female	129	5	3.9		129	1	0.8	
Total	271	18	6.6		271	2	0.7	0.00036

表8 . 野生ニホンジカにおけるクリプトスピリジウム・ジアルジア種同定結果

date of capture	sampling area	gender	identities (more than 99%)
<i>Cryptosporidium</i>			
2015 Jun. 13	Kanto1	F	<i>C. ryanae, C. bovis, C. deertype</i>
2016 Jun. 26	1	M	<i>C. ryanae, C. bovis, C. deertype</i>
Unknown	1	Unknown	ND
2012 Oct. 16	Kanto2	M	<i>C. ryanae</i>
2012 Oct. 16	2	F	<i>C. sp. Deer genotype</i>
2012 Oct. 18	2	F	<i>C. ryanae</i>
2012 Dec. 14	2	M	<i>C. ryanae</i>
2012 Dec. 14	2	M	<i>C. ryanae</i>
2013 May 28	2	M	<i>C. ryanae, C. bovis</i>
2013 May 28	2	M	<i>C. ryanae, C. bovis</i>
2015 Jun. 6	Chubu	M	<i>C. ryanae, C. bovis, C. deertype</i>
2013 Dec. 11	Kinki2	F	<i>C. ryanae, C. bovis</i>
2013 Dec. 13	2	M	<i>C. ryanae</i>
2014 Jan. 9	2	M	<i>C. ryanae</i>
2014 Jan. 11	2	Unknown	<i>C. ryanae, C. bovis</i>
2014 Dec. 18	Kyushu2	F	ND
2016 Jan. 21	3	M	<i>C. meleagridis</i>
<i>Giardia</i>			
2014 Jan. 16	Kinki2	F	<i>G. intestinalis</i>
2015 Nov. 27	Kyushu3	M	<i>G. intestinalis</i>

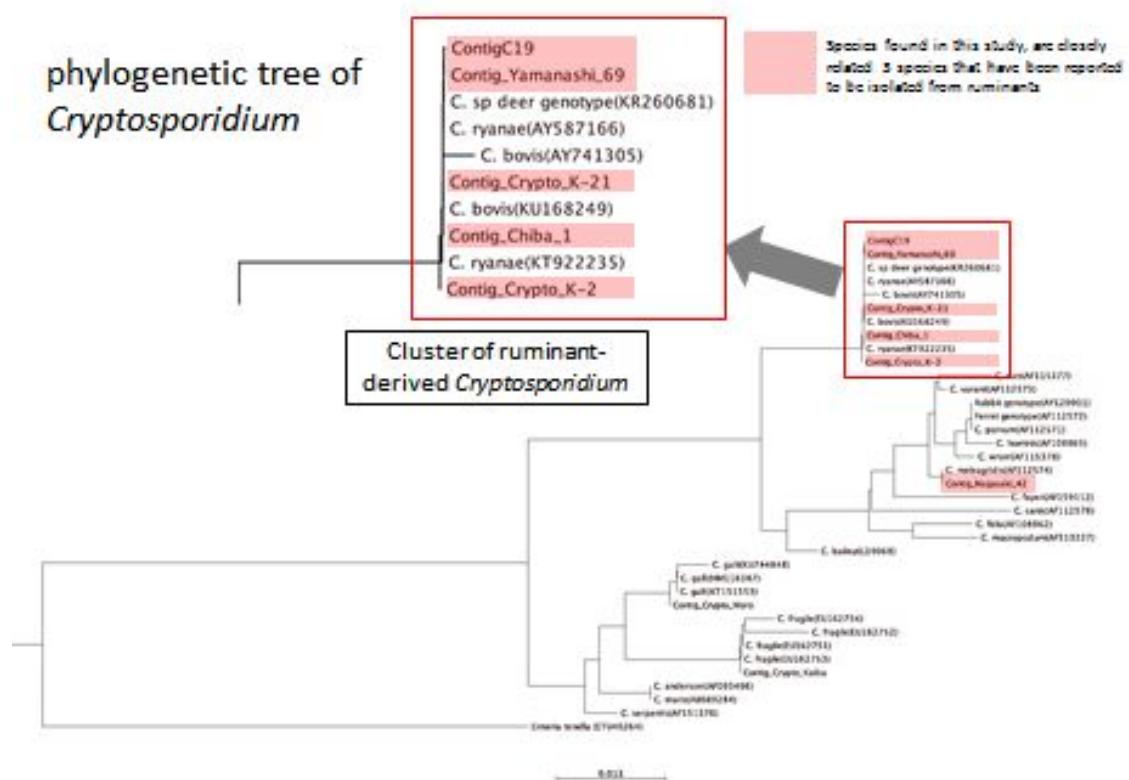


図5. 陽性検体から同定されたクリプトスピリジウム種の系統樹

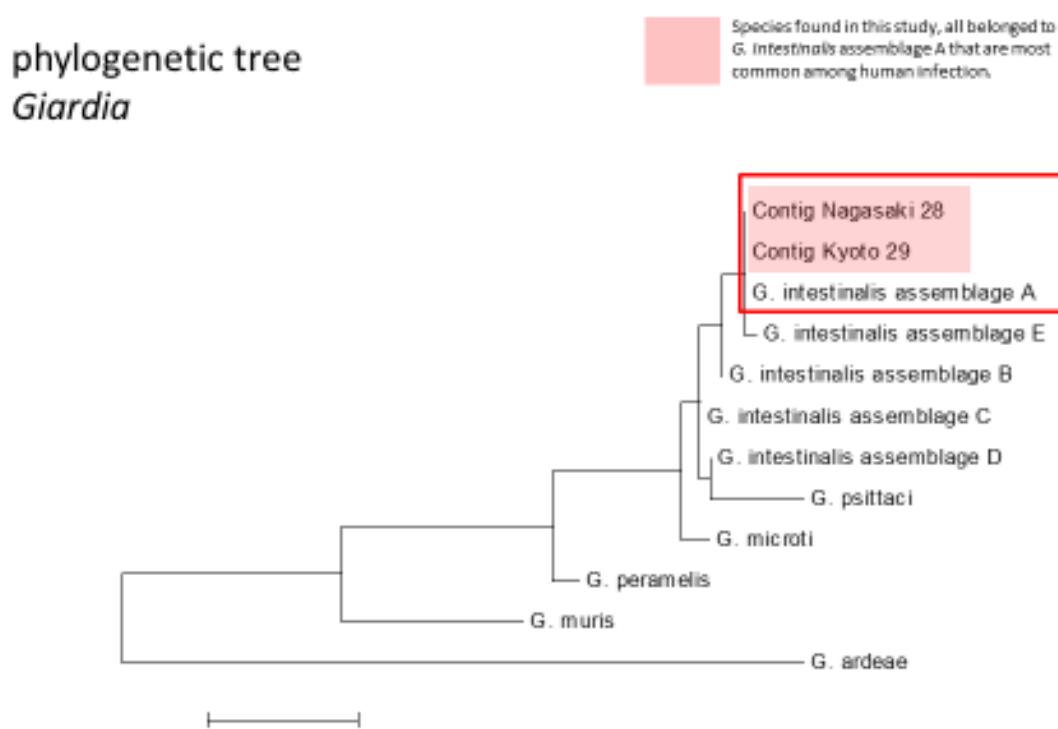


図 6 陽性検体から同定されたジアルジア種の系統樹

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：

18SrRNA を標的にした定量的リアルタイム PCR 法の確立その 1

研究要旨

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、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。

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たが、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食中毒危険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胞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つたため、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。

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、野生獸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性ニホンジカの横隔膜、骨格筋から脂肪、筋を除去し、筋肉纖維を 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 μl 取り、1.5 ml マイクロチューブに取る（図 7）。

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度保存する。

3. 住肉胞子虫の定性試験法

住肉胞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。住肉胞子虫の 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 9、表 10、表 11 に示すとおりである。

4. 住肉胞子虫のシークエンス解析法

3. の定性試験で増幅された住肉胞子虫の 18SrRNA 遺伝子の塩基配列を解析した。pMD20-T ベクターを用いて、住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子をライグーションし、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クエンス解析に用いた（図 8）。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（表 12）。

5. 住肉胞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 11）。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（表 11）。

6. 住肉胞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 (GeneAce 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12）。

7. 住肉胞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、住肉胞子虫 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作成し、サンプルとしてリアルタイム PCR 法で検出した（図12）。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13）。

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に実験を行った。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、住肉胞子虫由来の 18S リボソーム RNA 遺伝子領域 1100 bp の増幅が確認された（図8）。

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つて異なり、最短 360 bp から最長 800 bp であった（図 10）。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。コロニーパン号 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と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 11）。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（表 13）。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 14）。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 12）。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 13）。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、表 13 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胞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 14）。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 15）。

D. 考察

住肉胞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、冷凍処理にて住肉胞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胞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くら行われてきたが、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. cruzi*、*S. hominis*、ブタに寄生する *S. suihominis*、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觸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だけでなく、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でき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。

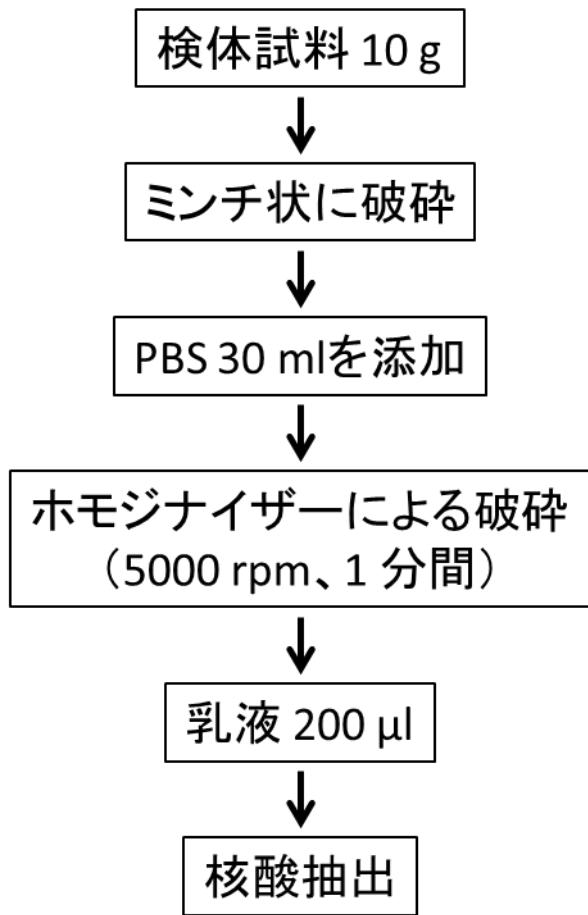


図 7 . 試料からの住肉胞子虫ゲノム抽出法

表9 . 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10 . 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11 . 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

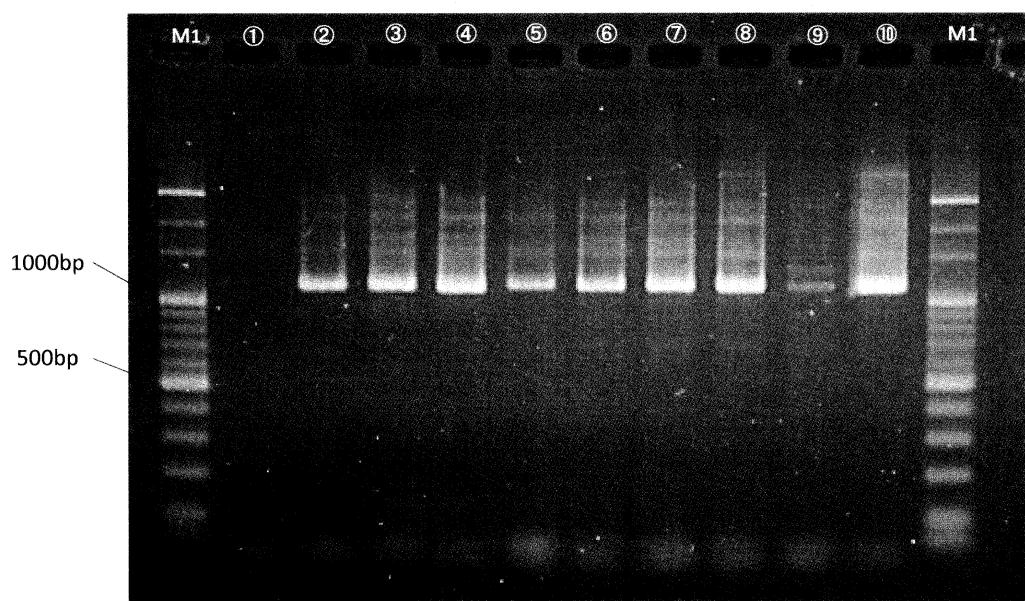


図8 . エゾシカ試料からの住肉胞子虫 1 8 SrRNA 検出用定

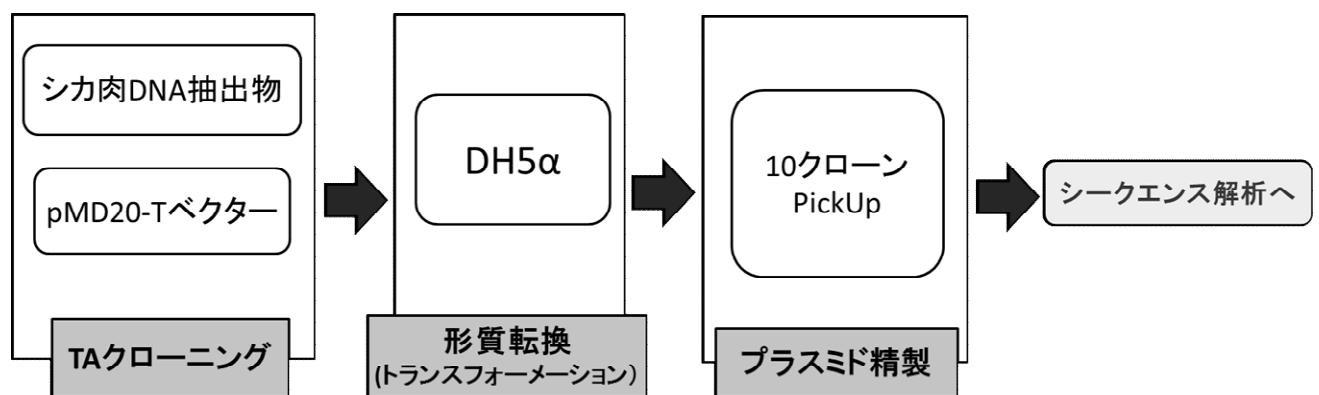


図9 . エゾシカ由来住肉胞子虫 1 8 SrRNA 遺伝子塩基配列

DM-1-1 Consensus 配列

1 60
AATGATGGGAATCTAACCCCTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGGCCAGCA
GCCGCGGTAAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTCAGTTAAAAAGCTCGTA
GTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTAGGGTGTGCACTTGATGAATT
CTGGCATCTAGTATCCCTAATATGGTCACGATTTCAGTAATCGTGACTTCTATTAGGG
ATAATACAGTTACTTGAGAAAATTAGAGTGTGAAAGCAGGCTTGCCTTGAATAACT
GCAGCATGGAATAACAATATAGGATTCGGTTCTATTTGTTGGTTCTAGGACTGAAAT

DM-1-2 Consensus 配列

1 60
GTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTATTCTAGTGATTGAAATGATGGAAATCCA
AACCCCTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGGCCAGCAGCCGGTAATTCCA
GCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCTGCTG
GAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTAGGGTGTCACTTGATGAATTCTGGCATTACGATC
CCTAATATGGTCACGATTTCAGTAATCGTGACTTCTATTAGGGATAATACAGTTACTT
TGAGAAAATTAGAGTGTGAAAGCAGGCTTTGTTGCCTTGAATACTGCAGCATGGAAT
AACAAATAAGGATTCGGTTCTATTTGTTGGTTCTAGGACTGAAATAATGATTAATAG
GGACAGTTGGGGG

DM-1-5 Consensus 配列

1 60
AATGATGGGAATCTAACCCCTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGGCCAGCA
GCCGCGGTAAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTCAGTTAAAAAGCTCGTA
GTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTAGGGTGTGCACTTGATGAATT
CTGGCATCTAGTATCCCTAATATGGTC*CGATTTCAGTAATCGTGACTTC*TATTAGGG
ATAATACAGTTACTTGAGAAAATTAGAGTGTGAAAGCAGGCTTGCCTTGAATAACT
GCAGCATGGAATAACAATATAGGATTCGGTTCTATTTGTTGGTTCTAGGACTGAAAT
A

図10. エゾシカ由来住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子塩基配

DM-1-6 Consensus 配列

1

60

TGGCGATAGATCATTCAAGTTCTGACCTATCAGCTTCGACGGTAGTGTATTGGACTAC
CCGTGGCAG*GACGGGTAACGGGGG*ATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAA
ACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGA
GGTAGTGACAAGAAATAACAAACACTGGAAATTCTAGTGTGGATGATGGAA
TC*AAACCCCTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCAGCAGCCGCGTAAT
TCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATATCT
GCTGGAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTAGGGTGTGCACCTGATGAATTCTGGCATCTAC
GATCCCTAATATGGTC*CGRTTTCACTGACTTCTATTAGGGATAATACAGTT
ACTTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTTGCCTGAATACTGCAGCATGGAA
TAACAATATAGGATTCGTTCTATTGTTGGTTCTAGGACTGAA*TAATGATTAATA
GGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTGTTAAAG
ACGAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGG
GGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGCTTAACCATAACTATGCCACTAGAGATA
GGAAAATGTCACTGTTCGACTTCTCC

DM-1-9 Consensus 配列

1

60

CGATAGATCATTCAAGTTCTGACCTATCAGCTTCGACGGTAGTGTATTGGACTACCG
TGGCAGTGACGGGTAACGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG
CTACCACAT*TAAGGAAGGCAGCAGGCCGCAAATTACCCAATCCTGACTCAGGGAGGTA
GTGACAAGAAATAACAAACACTGGAAATTCTAGTGTGGATGATGGAAATTAA
AACCCCTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCAGCAGCCGCGTAATTCCA
GCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATGTC
GAAGCAATCAGTCCGCCCTATTTGTAGGGTGTGCACCTGATGAATTCTGGCATCTATGTC
**AATGTAATACGGCGACGGTGTATGGGTTAATCCTATACCCGTTTGATATTAA
TATTGGGATAATACCGTTACTTGAGAAAATTAGAGTGTGTTGAAGCAGGCTAATTGCCTT
GAATACTGCAGCATGGAATAACAATACAGGATTCGGTTCTATTGTTGGTTCTAGGA
CTGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAA
TTCTTAGATTGTTAAAGACGAAACTACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTCATTAA
TCA

図10. エゾシカ由来住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子塩基配

DM-1-10 Consensus 配列

1	60
CAATCCTGACTCAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAACAACACTGGAAATTTATTTCTAGT	
GATTGGAATGATGGAATTAAACCCCTTCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTG	
CCAGCAGCCCGCGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAG	
CTCGTAGTTGGATATCTGCTGGAAGCAATCAGTCGCCCTATTTAGGGTGTGCACTTGA	
TGAATTCTGGCATCTATGATCCCTAGTACGGTCACGATTTCAGTAATCGTACTTCTTA	
TTAGGGATAATAACAGTTACTTGAGAAAATTAGAGTGTGAAGCAGGCTGTTGCCCTG	
AATACTGCAGCATGGAATAACAATATAGGATTCGGTCTATTTGTTGGTTCTAGGAC	
TGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTGTATTAACTGTC**AGGTGAAAT	
TCTTAGATTGTTAAAGACGAACACTGCGAAAGCATTGCCAAGGATGTTTCATTAAT	
CAAGAACGAAAGTTAGGGCTCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTAACCATAAAC	
TATGCCGACTAGAGATAGG	

図10. エゾシカ由来住肉胞子虫 18SrRNA 遺伝子塩基配列

表12. BLAST による 98 %以上を示した相同性検索結果

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)

TTGCCTGAATACTGCAGCATGGAATAACAATATAGGATTCGGTTCTATTTG
 TTGGTTCTAGGACTGAAATAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCATTCTAT
 TTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGAACACTACTGCGAAAG
 CATTGCCAAGGATGTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGCTCGAAGAC
 GATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGAGATAGGAAA
 ATGTCACTGTTT **CGACTTCTCCTGCACCTTATGA** GAAATCAAAGTCTTGGGTT
 Forward
 CTGGGGG **GAGTATGGTCGCAAGGCTGAA** ACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAC
 Reverse
 CACCAGGCGTGGAGCCTCGGG

図11. 全てのクローンに共通する *Sarcocystis* sp. 18srRNA 共通配列

表13. 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

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

表14. 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

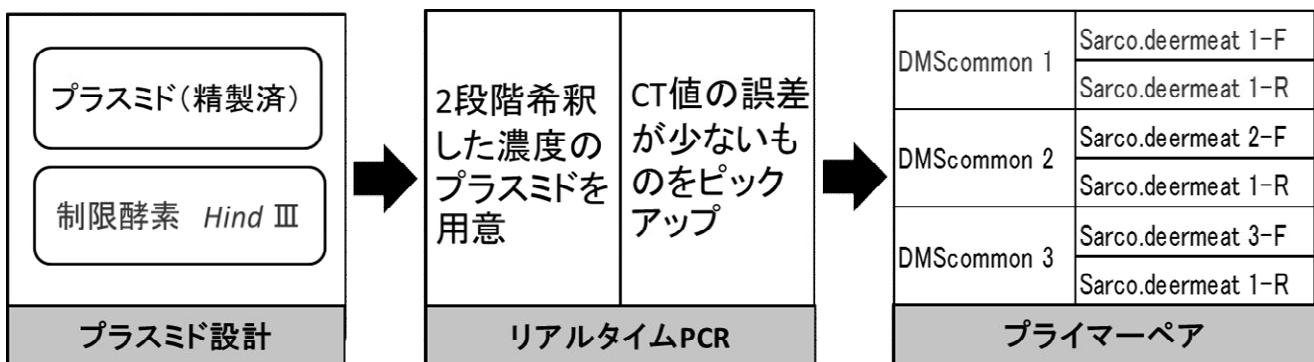


図 1 2 . 定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照の選定方法チャート

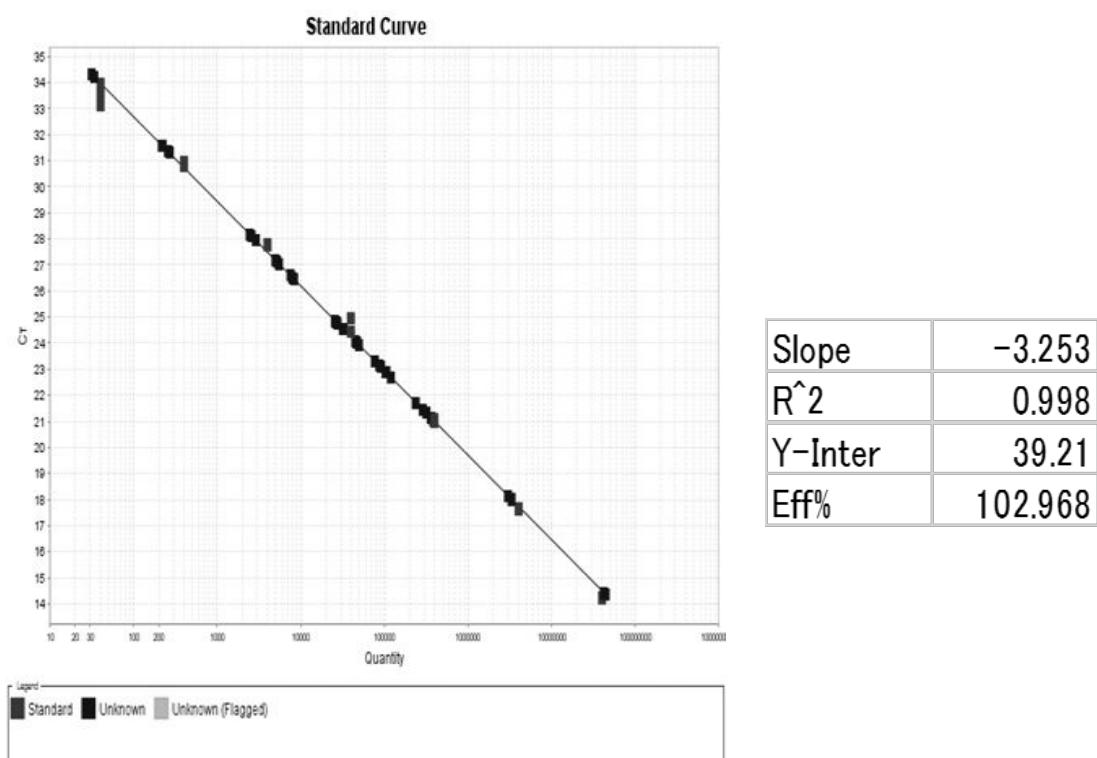


図 1 3 . 定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照による検量線

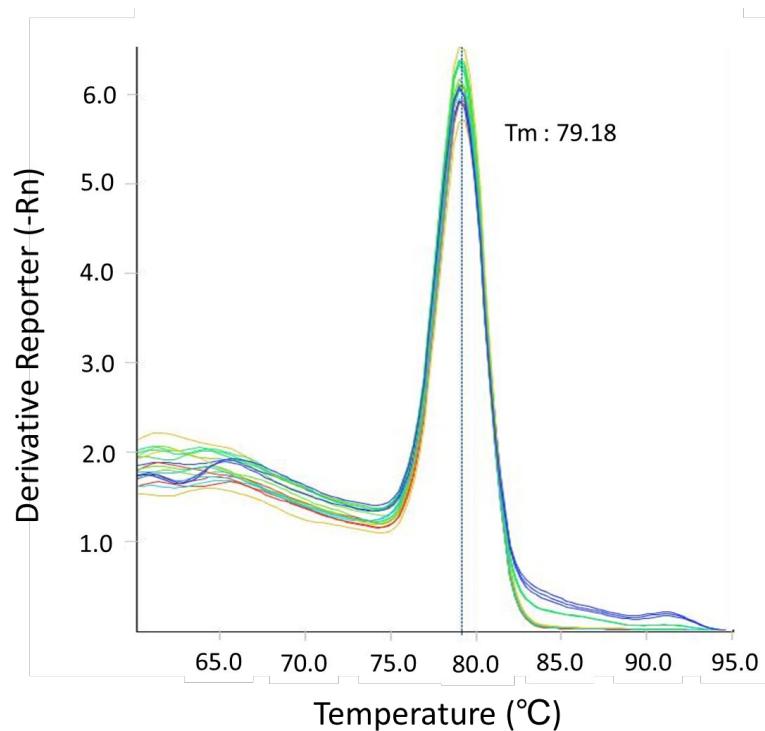


図 1 4 . 定量的リアルタイム PCR 法による融解曲線

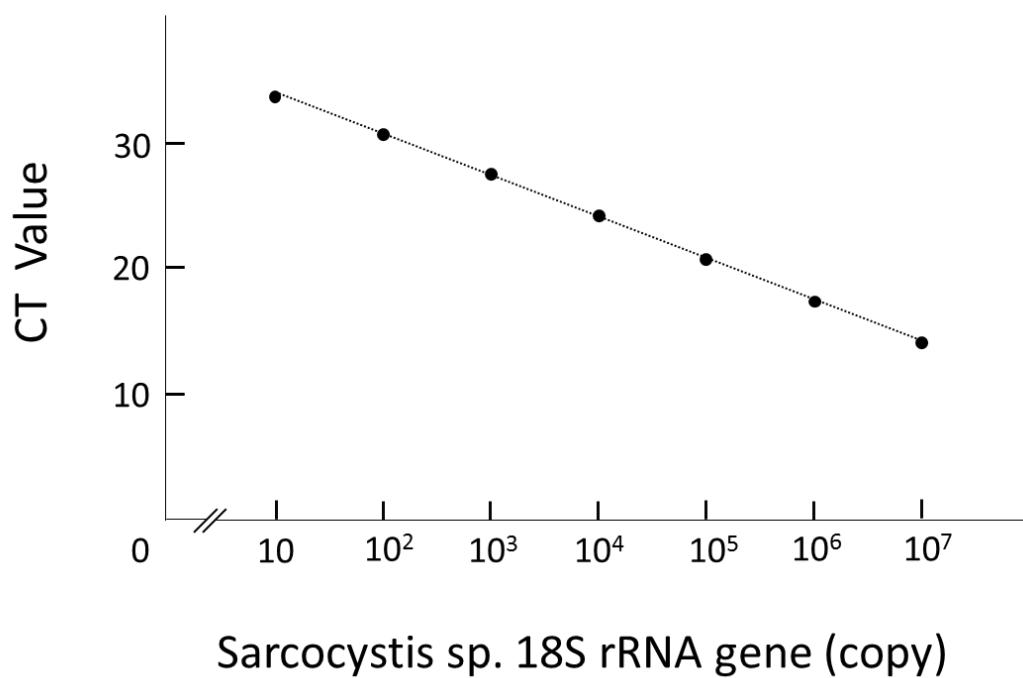


図 1 5 . 定量的リアルタイム PCR 法による試料コピー数と Ct 値の相関

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つていなかつたため、*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、一個体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つた。

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（図17）。

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 0.6×10^5 、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 15)。供

試検体全体の遺伝子コピー数の分布は 1 g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、1 g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(図 21)

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、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、地域ごとに道北、道東で 15 検体であるのに対し、道南えは 59 検体であることは、獣害の程度と捕獲の必要性は相關してい

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つ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 $5.8 \times 10^5 \sim 224.7 \times 10^5$ 、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 76.3×10^5 、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も大きかった。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、幼齢から年を取りにつれ、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プ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つたため、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つ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。これらのことと加味すると、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。

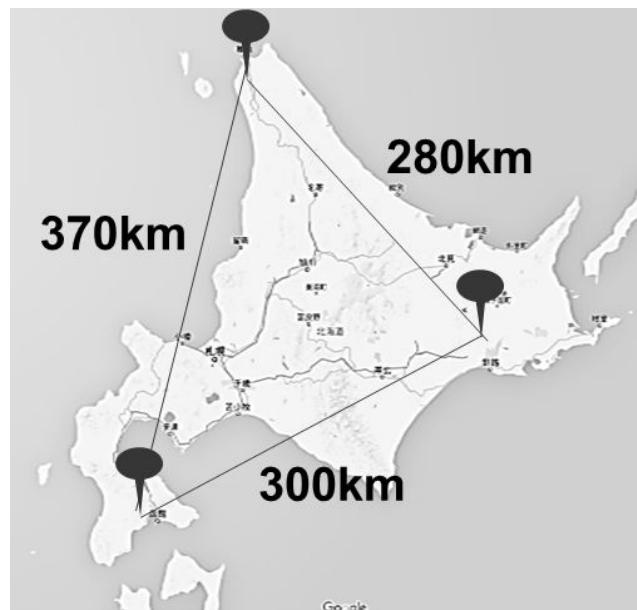


図16 北海道道北、道東、道南の調査地域位置関係

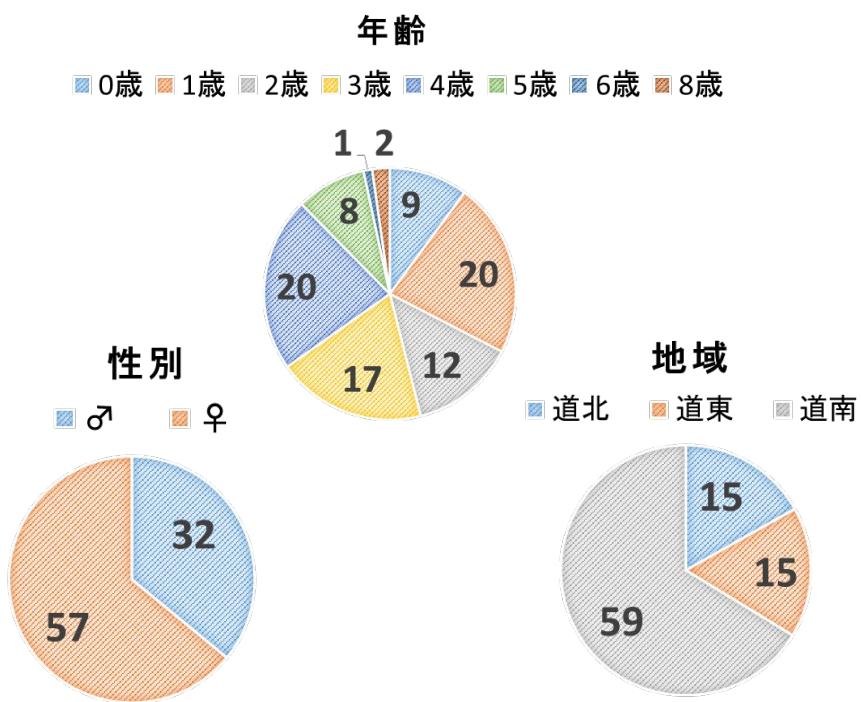


図17 北海道由来試料の要因別分類

表15 北海道由来試料の要因別分類

	全体 (copies /g) × 10 ⁵	道北 (copies /g) × 10 ⁵	道東 (copies /g) × 10 ⁵	道南 (copies /g) × 10 ⁵
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

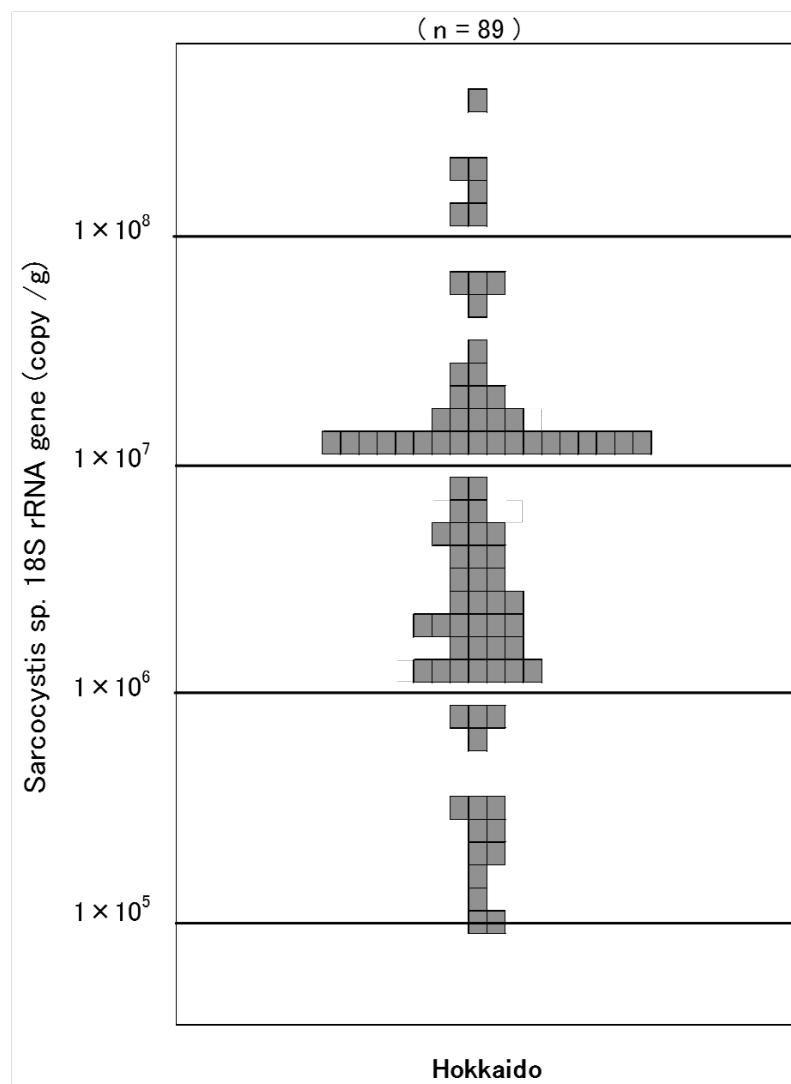


図18 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(全体)

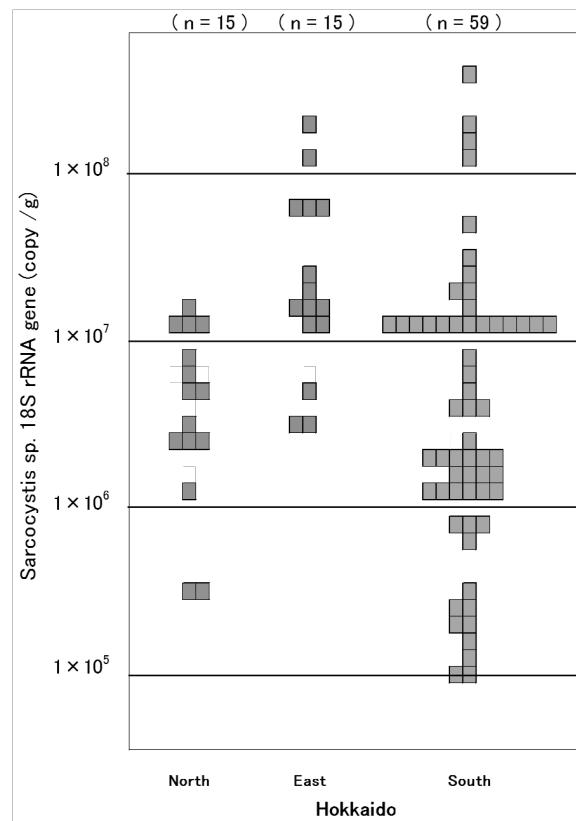


図 19 . 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(地域)

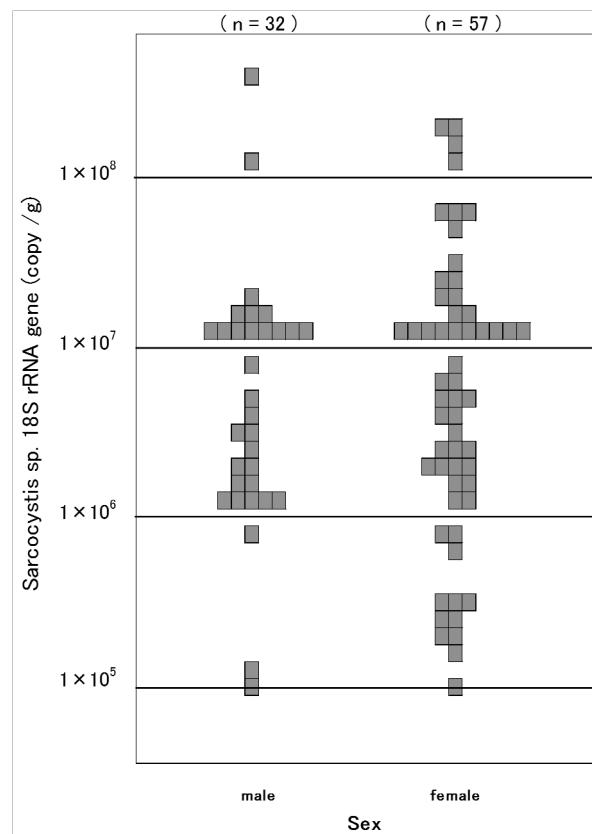


図 20 . 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(性別)

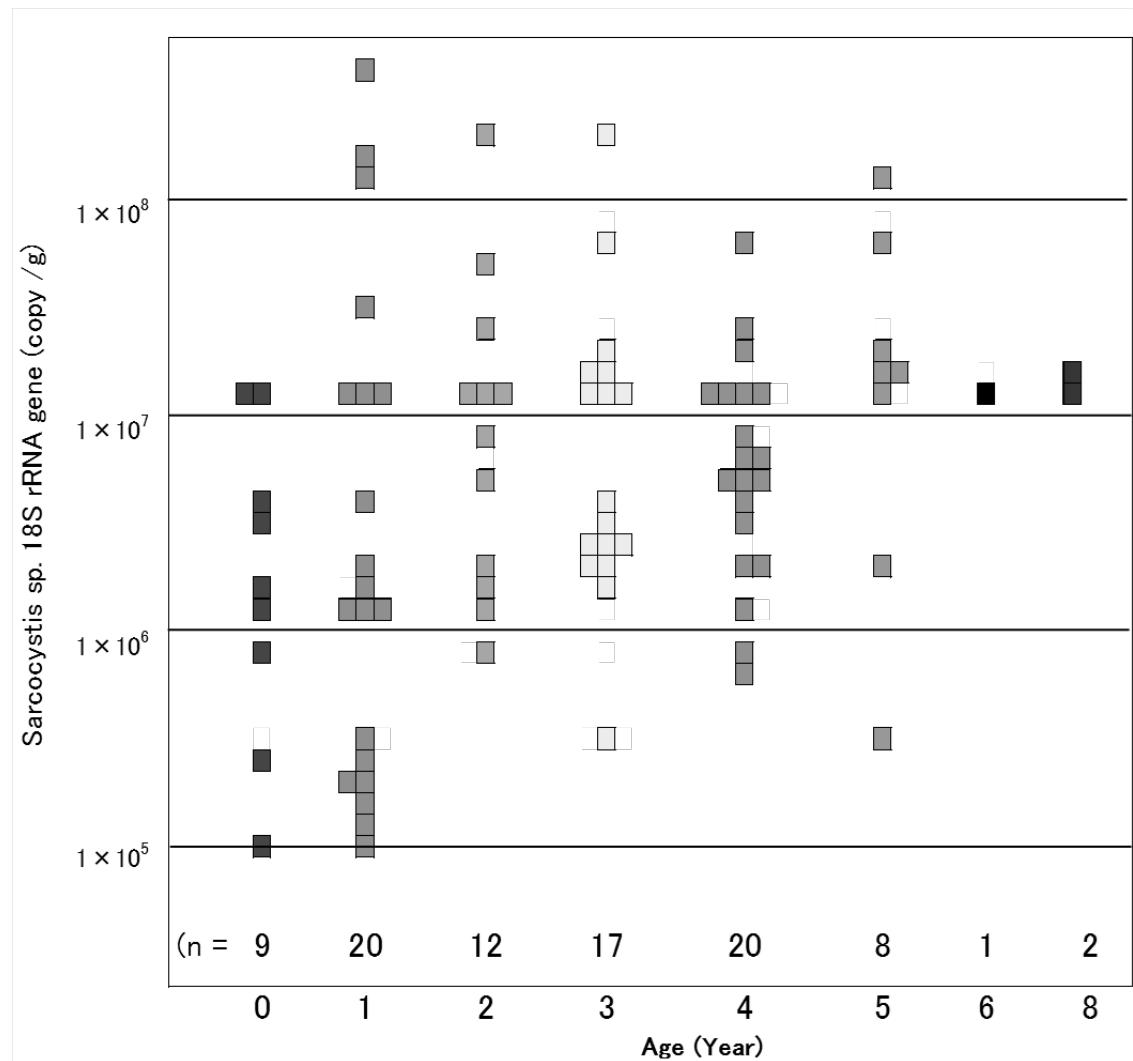


図 2 1 . 北海道由来試料における住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(年齢)

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

国内野生ジ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）

研究要旨

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。

本研究では昨年から引き続き、国内各所の野生シカを対象にして、ジアルジア、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昨年度の研究で新規に確立したニホンジカに適応したPCRによる定量的試験法を用いて、北海道、本州、九州と調査地域を拡大した疫学調査を行った。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、国内野生ニホンジカにジアルジア、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觀点に入れ、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検査法についても、原理は従来の検査法と同等であるため、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。国内ではこれまでに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ジアルジア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ところ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觀点に入れ、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た。

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獵師の協力のもと行った。

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した。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、雌雄の偏りがないよう配慮した。また、これまでに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予定である。

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、季節変動の確認を試みた。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した。

2 . 遺伝子検出法と種同定

1) ジアルジアの検出法

国立感染症研究所による「ジアルジア症・ジアルジア症等の原虫性下痢症」に準拠して糞便中のジアルジア原虫を濃縮した。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ジアルジア検出キット（例：Cyclease®RT-PCR Giardia (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、陽性検体を検出した。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プラディゾイド数を測定する。顕微鏡検査によりシストとプラディゾイドを確認する。更に、本研究では厚生労働省通知法の転用では検出しきれないシカ特異的住肉胞子虫を検出および定量する検査法を新規に確立した。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岩手大学農学部内で行い、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共同獣医学科獣医公衆衛生学研究室は特定病原微生物取り扱い区域および P2 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ジアルジア、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した。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ことを試みた。

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た。個体間での感染虫密度の確認の為、検量線からのブラディゾイド数の算出を試みた。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の確認を試みた。

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の基盤とした。

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、北海道、千葉県、三重県、長崎県から試料提供を受けた。

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。

現段階で計 325 頭分である。雌雄差は全体で雌 129 頭、雄 135 頭、不明 4 頭であり、おおむね偏りのない比率といえる。

2. 遺伝子検出と種同定

(1) ジアルジアの検出

上記については、研究計画書のとおりに実験を行い、問題なく糞便中のジアルジア原虫の濃縮、核酸抽出、18S リボソーム RNA を標的としたジアルジア属原虫の検出ができた。その結果、京都府と長崎県から 1 検体ずつ検出された。これらの陽性検体について塩基配列を解析したところ、*G. intestinalis* Assamblage A であり、ヒトへの危害性を示し、幅広い宿主に感染する種であることが分かった。

このことは、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も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

りに実験を行い、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、今回調査して地域の全てでほぼ 100% の感染率であることが分かった。

(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、ニホンジカに感染する住肉胞子虫が同定されていない現実を踏まえて、現在 NCBI に登録されている全ての住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属を網羅的に検出できる検査法の確立を試みた。標的領域は住肉胞子虫の 18SrRNA の共通領域とし、この配列の長さとプライマーペアの 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。定量的試験法については、定性的試験法と同様に 18SrRNA 遺伝子の共通配列を標的とし、住肉胞子虫 18SrRNA 全長をライゲートしたプラスミドを用いて陽性対照を調整した。プラスミドを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。

3. 住肉胞子虫の定性法および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性的試験法および定量的リアルタイム PCR 法を用いて、国内野生ニホンジカ試料の疫学解析を行った。その結果、ほとんど全てが陽性であった。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（ブレディゾイド定量値）を比較した結果、長崎県での感染密度が有意に低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が、有意差ではなかった。

4. 住肉胞子虫の腸管毒性

マウスを用いた腸管ループテストを行った結果、 1×10^6 のブレディゾイトを投与したループで腫脹が認められた。

D. 考察

Sarcocystis 属は世界中の多くの草食動物に寄生する原虫であるが、ヒトに

対して食中毒を引き起こすことは知られていなかった。しかし、近年、我が国で起きたウマ肉喫食事例により *Sarcocystis* 属のもつ消化管毒性が初めて知られるようになった。続いて、2011 年にシカ肉の生食による有症苦情事例が発生し、*Sarcocystis* 属が原因と推察された。ジビエ産業が推進されている昨今、こうした寄生虫性食中毒は公衆衛生上の懸念事項となっている。

しかし、野生動物に関する *Sarcocystis* 属については顕微鏡検査による虫体発見の報告にとどまり、疫学的情報が非常に少ない。本研究では、国内野生ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属について疫学的情報を広く収集する遺伝学的手法の確立と、その手法を用い、国内 4 地域の野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の統計学的解析に基づく疫学情報の収集、滋賀県内で発生した有症事例検体に寄生していた *Sarcocystis* 属の遺伝学的解析、および

エゾシカ妊娠検体を供試し、*Sarcocystis* 属の垂直感染の有無について検討した。

まず、厚生労働省の通知に基づく *Sarcocystis* 属の遺伝学的検査法を用いて国内野生ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属寄生の検査を試みたが、非特異的な DNA 断片の増幅が多く認められたため、シカ肉を試料として用いる場合には、現行の *S. fayeri* 検査法では野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の感染判定が正しく行えない可能性が考えられた。また、この検査法の標的塩基配列は 18S rRNA 遺伝子塩基配列の全長約 1,800 bp のうちの、約 1,100 bp の領域であり、18S rRNA 遺伝子塩基配列内に存在する特異領域を一部欠いていることから、塩基配列解析による種同定も、正しく同定できない可能性が示唆された。実際にシカ肉について、本研究で設計した特異的プライマーは現在 NCBI に登録されてい

る *Sarcocystis* 種 21 種の 18S rRNA 遺伝子の全長領域である 1,800 bp を増幅し、宿主であるニホンジカ由来の 18S rRNA 遺伝子を増幅することなく *Sarcocystis* 属の 18S rRNA 遺伝子を増幅することが確認された。また、顕微鏡検査でのサルコシスト検出が困難な微小なサルコシスト含む検体でも、検体筋肉組織 10 g から *Sarcocystis* 属の感染を判定することができる。

本研究で行った野生ニホンジカ調査では、国内 4 地域とも *Sarcocystis* 属の高率な寄生が確認された。このことから、調査地域においては、野生ニホンジカ生息環境中の *Sarcocystis* 属生活環が十分に保持されていると推察される。

捕獲時の推定年齢が 1 歳の検体にも高率に *Sarcocystis* 属が寄生していることが確認されたことから、垂直感染の可能性が推測された。

ノルウェーのアカシカから検出され

た *Sarcocystis* 属の報告から、野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属も 1 種ではない可能性が示唆されたため、種の遺伝学的同定には 18S rRNA 遺伝子のプラスミドシークエンシングを行った。

18S rRNA 遺伝子塩基配列解析から、国内 4 地域の野生ニホンジカには *S. tarandi*、*S. elongata* が共通して寄生していることが判明した。これらの 2 種は 18S rRNA 遺伝子のみでは遺伝学的に区別できないため、*tarandi* と *S. elongata* の 2 種のみが同定されていた北海道のエゾシカ 2 検体について *cox1* 塩基配列を標的遺伝子とした種同定を試みた。その結果、北海道の 2 検体に寄生している *Sarcocystis* 属は *S. tarandi* であると同定された。他の地域の *cox1* の解析は今後の課題である。千葉県のホンシュウジカ肉検体から検出された *S. pilosa* は、リトニアの動物園で飼育されていたニホンジカか

ら発見された新種で、ニホンジカ固有種の可能性が高い。

三重県のホンシュウジカ検体からは *S. silva* と *S. sp.* HM050622 が同定された。*S. sp.* HM050622 は、北海道(酪農学園大学)のエゾシカの調査で登録された種であるが、近年新種として登録された *S. truncata* と 18S rRNA 遺伝子塩基配列が 99%一致するため、同種ではないかと考えられる。

長崎県のキュウシュウジカ検体から、現在 NCBI に登録されている既存種の 18S rRNA 遺伝子とは一致しない *S. spp.* が検出された。九州地方に生息するキュウシュウジカは、ニホンジカ亜種の中でも、エゾシカおよびホンシュウジカと比較して形態的変異が大きいことが知られており、エゾシカおよびホンシュウジカと異なる *Sarcocystis* 種が寄生している可能性が推測される。滋賀県で発生した有症苦情事例のエゾシカ肉と、今回調査した北海道の 2 検

体で共通する種が、*S. tarandi*、*S. elongata* であるが、有症苦情事例シカ肉検体からは *S. pilosa*、*S. hjorti* も検出された。*S. pilosa* は千葉県からも検出されたため、*S. tarandi*、*S. elongata* 同様に、日本国内に広く分布している可能性がある。

今回 *Sarcocystis* 種に関して遺伝学的同定を実施した野生ニホンジカ個体は、計 10 個体であるが、ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の種の多様性および多様な種ごとの毒性解析の必要性、また、それらが寄生する国内に分布するニホンジカの亜種の多様性を鑑みると、さらに多くの野生ニホンジカ個体に寄生する *Sarcocystis* 種の調査が必要である。

国内野生ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属の定量法については、これまで顕微鏡検査でのシカ筋肉中サルコシスト計数によって行われていたが、この検査法では、計数者によってサル

コシストの計数に偏りが出ることが予想された。そこで本研究では遺伝学的手法から Real-time PCR 法を用いた *Sarcocystis* 属の定量法を開発した。Real-time PCR 法の定量に用いる標準試料は本来 *Sarcocystis* 属のみの単一 DNA 溶液が望ましいが、*Sarcocystis* 属は筋肉中に存在するため、シカ肉の組織断片の混入は避けられない。単一の DNA 溶液が用いられない場合のスタンダードには PCR アンプリコンを用いる方法と、目的 DNA 断片をプラスミドに導入したもの用いる方法があるが、本研究では後者を用いた。作製した標準試料を用いて実施した *Sarcocystis* 属の Real-time PCR 法にて算出された遺伝子コピー数の差について R software を用いた統計学的解析を行った。

95%信頼区間に基づき、棄却検定を行ったところ、長崎県と他の地域間のみ有意差が認められたが、顕微鏡による観察においても長崎県の検体中のシス

トは他の地域に比べ、発見が困難であることが多く、この結果は長崎県の検体は他の 3 地域より感染が軽度である可能性を補足する。しかしながら、*Sarcocystis* 属陽性率は 98.7% と他の地域と同程度の高い寄生率であった。また、長崎県で同定された種のうち *S. tarandi* と *S. elongata* に分類されたのは 20 個中 2 個のプラスミドのみであり、その他の 18 個のプラスミドはすべて *Sarcocystis* spp. であった。以上のことから、長崎県のシカ検体において、*Sarcocystis* 属寄生率は高値であるが、寄生密度が低値であることは、長崎県でのみ遺伝学的に同定された *S. spp.* の感染能力に関係していると推測される。高率な寄生率から、生活環は十分に保持されていると示唆されるため、他種と異なる条件は体内動態であると考えられる。

年齢別の遺伝子コピー数に有意差が認められなかったことと、前述のシカ

胎仔において *Sarcocystis* 属の感染が認められなかつたことから、野生ニホンジカは離乳後、草食を始めた直後にスポロシストの暴露を受けていることが考えられる。また、加齢ごとの遺伝子コピー数の増加は認められなかつたことから、*Sarcocystis* 属の寄生には宿主免疫など、一定の感染抑制因子が働いていると予想される。

性別の遺伝子コピー数には有意差が認められなかつたことは、雌雄に *Sarcocystis* 属の暴露回数および感染抵抗力に雌雄差がないと考えられる。スポロシストの感染経路は経口摂取が主であるため、常食している草や土壌などに点在するスポロシスト数に地域差がなければ、寄生密度には変化がないと考えられる。

Sarcocystis 属は横隔膜に多く寄生しているという報告があつたため、千葉県の骨格筋と横隔膜検体を用いて *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数を比較

したところ、この 2 群間での有意差は認められなかつた。元となつた報告は顕微鏡下でのサルコシスト計数によるもので、横隔膜は筋纖維の方向が一定であり、また厚みも他の骨格筋と比べ薄いことから、顕微鏡検査での発見が容易であったと考えられる。通常、骨格筋は扁平ではなく丸みを帯びており、筋纖維の方向も一定ではないため、顕微鏡による *Sarcocystis* 属の探索が困難である。報告者は *Sarcocystis* 属を見つけやすい条件が整つてゐるシカ横隔膜の観察を実施した結果、他の骨格筋と比べ、多くのシストがいると判断した可能性が考えられる。本研究で確立した検査法は、筋肉試料 10 g を均一化し、核酸抽出したものを使用しているため、作業者の熟練度による *Sarcocystis* 属検出率の偏りは最大限り除けると考えられる。

本研究の疫学的解析から、国内野生ニホンジカには *Sarcocystis* 属感染が

避けられないと推察された。食中毒性が判明しているウマの食肉利用には加熱、冷凍など予防対策が講じられていることから、シカ肉の食肉利用の際にも、十分なリスク管理を行うために危害性予防対策が必要である。しかし、対策の基となる国内野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の食虫毒性解析はいまだ行われていない。今後、本研究で確立した遺伝学的解析法を用いた国内野生ニホンジカにおける *Sarcocystis* 属の疫学的情報の蓄積と並行し、国内野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の詳細な食中毒解析が求められる。

G. 研究発表(原著論文によるものに限る。)

国内 5 件

1. ジビエ(野生鳥獣肉)とくに野生シカ肉を汚染する住肉胞子虫の危害性分析(第 27 回日本臨床寄生虫学

会大会)

2. 住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属由来の下痢誘発性毒素 15kDa タンパク質の病原性解析(第 159 回日本獣医学会学術集会)、
3. 国内野生ニホンジカに存在する *Sarcocystis* spp. の疫学的調査および遺伝学的解析(第 159 回日本獣医学会学術集会)
4. *Sarcocystis* 属における定量的 Real time PCR 法の確立と野生ニホンジカにおける感染状況(第 37 回日本食品微生物学会学術総会)
5. ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* spp. の宿主生息地域における疫学的相違の解析(平成 28 年度獣医学術東北地区学会 日本獣医公衆衛生学会東北地区)

(2) 海外 2 件

1. The enterotoxicity analysis of *Sarcocystis* spp. parasitized in

wild deer in Japan. (The Society
of Toxicology's 56th Annual
Meeting and ToxExpo)

2. The enterotoxic activity of

Sarcocystis fayeri actin
depolymerizing factor (ADF).
(The Society of Toxicology's 56th
Annual Meeting and ToxExpo)

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検査法の確立：

18SrRNA を標的にした新規定性的 PCR 法の確立

研究要旨

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、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。

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たが、現行の顕微鏡検査では、熟練度の低い検査員では検出が難しく、全国的な産業の振興を目指すジビ工産業の衛生管理法としては、より簡便で客観性の高い検査法が求められる。これまでに使用してきた、厚生労働省通知の *Sarcocystis fayeri* 検出法の転用では、ニホンジカ寄生性の住肉胞子虫の正しい検出ができないことを明らかにした。そのため、ニホンジカ寄生性の住肉胞子虫特異的な検出法の候補として、新たな PCR 法を用いた定性的検査法を確立した。

A. 研究目的

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

昨今、害獣駆除目的で捕獲された野生鳥獣の肉をジビ工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

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、野生鳥獣の大いな特徴であるが、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心宿主に、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検出する

方法は、厚生労働省通知の、*Sarcocystis fayeri* 検出法を転用する以外になく、その正確性が確認されていないことである。

本研究は、野生ニホンジカ由来住肉胞子虫を特異的に検出できる方法の確立を目的とし、まず、厚生労働省通知の *Sarcocystis fayeri* 検出法の転用の正確性を確認し、さらに、ニホンジカ寄生性住肉胞子虫の特異的検出法の確立を試みた。

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性ニホンジカの横隔膜、骨格筋から脂肪、筋を除去し、筋肉纖維を 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 μl 取り、1.5 ml マイクロチューブに取る（図 2-2）。

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. 網羅的 *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子特異的プライマーの設計

Sarcocystis 18S rRNA 遺伝子について、現在 National Center for Biotechnology Information(NCBI) に登録されている *Sarcocystis* 種 21 種、

Odocoileus virginianus、*Homo sapiens*、*Bos taurus*、*Sus scrofa* および *Equus caballus* の哺乳類、反芻獸の筋肉組織に寄生する可能性のある *Toxoplasma gondii* と *Trichinella spiralis* の 18S rRNA 遺伝子塩基配列を MEGA6 software を用いてマルチプロアライメントを行い、保存領域と特異領域を推定した（図 2-4）。続いて Snap Gene Software を用いて、*Sarcocystis* 属 18S rRNA 全長配列（約 1,800 bp）を特異的に增幅できる *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子特異的プライマー *Sarcocystis* 18S F および *Sarcocystis* 18S R を設計した（図 2-4）。

プライマーに適合する反応条件を設定し、定性的 PCR 法を用いて、て *Sarcocystis* 属の遺伝学的検出を試みた（表 1-6、表 1-7）。

C. 研究結果

1. 現行の厚生労働省通知 *S. fayeri* 検査法によるシカ肉材料の検査

現行の *S. fayeri* 定性的 PCR 法では、用いた長崎県由来検体 1~6 のうち非特異的な増幅が認められず、標的遺伝子増幅である 1,100 bp 付近にバンドが確認されたものは 1 のみであった(図 23)。2、5 および 6 は 1,100 bp 付近にバンドが確認できるものの、非特異的な増幅も認められた。3 および 4 は標的遺伝子と同程度の非特異的な増幅が認められた。

2. 設計した *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子特異的プライマーを用いた定性的 PCR 法の実施

設計した *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子特異プライマーを用いて、野生ニホンジカ供試検体由来の核酸抽出液を試料として定性的 PCR 法を行い、

アガロース電気泳動を実施した結果、約 1,800 bp 付近に単一のバンドが確認された(図 25)。

D. 考察

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くらに行われてきたが、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、検査者の主觀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検出法の確立を試みた。

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、非特異的な DNA 断片の増幅が多く認められたため(図 2 3)、シカ肉を試料として用いる場合には、現行の *S. fayeri* 検査法では野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の感染判定が正しく行えない可能性が考えられた。また、この検査法の標的塩基配列は 18S rRNA 遺伝子塩基配列の全長約 1,800 bp のうちの、約 1,100 bp の領域であり、18S rRNA 遺伝子塩基配列内に存在する特異領域を一部欠いていることから、塩基配列解析による種同定も、正しく同定できない可能性が示唆された。実際にシカ肉について、本研究で設計した特異的プライマーは現在 NCBI に登録されている

Sarcocystis 種 21 種の 18S rRNA 遺伝子の全長領域である 1,800 bp を増幅し、宿主であるニホンジカ由来の 18S rRNA 遺伝子を増幅することなく *Sarcocystis* 属の 18S rRNA 遺伝子を増幅することが確認された。また、顕微鏡検査でのサルコシスト検出が困難な微小なサルコシスト含む検体でも、検体筋肉組織 10 g から *Sarcocystis* 属の感染を判定することができるため、従来の検査法と比較して、検査の熟練度に関係なく、正確性の高い結果が得られる検査法であると考えられる。

E . 結論

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検出する PCR 法を確立した。食中毒危害性が想定される住肉胞子虫の検査はジビエ産業に

不可欠であるため、精度が高く迅速に
スクリーニング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。

ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* spp.の宿
主生息地域における疫学的相違の解
析(平成 28 年度獣医学術東北地区学会
日本獣医公衆衛生学会東北地区)

G. 研究発表

(1) 国内 5 件

ジビエ(野生鳥獣肉)とくに野生シカ
肉を汚染する住肉胞子虫の危害性分
析(第 27 回日本臨床寄生虫学会大会)、
住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属由来の下痢
誘発性毒素 15kDa タンパク質の病原性
解析(第 159 回日本獣医学会学術集会)、
国内野生ニホンジカに存在する
Sarcocystis spp. の疫学的調査および遺
伝学的解析(第 159 回日本獣医学会学
術集会)
Sarcocystis 属における定量的 Real
time PCR 法の確立と野生ニホンジカに
おける感染状況(第 37 回日本食品微生
物学会学術総会)

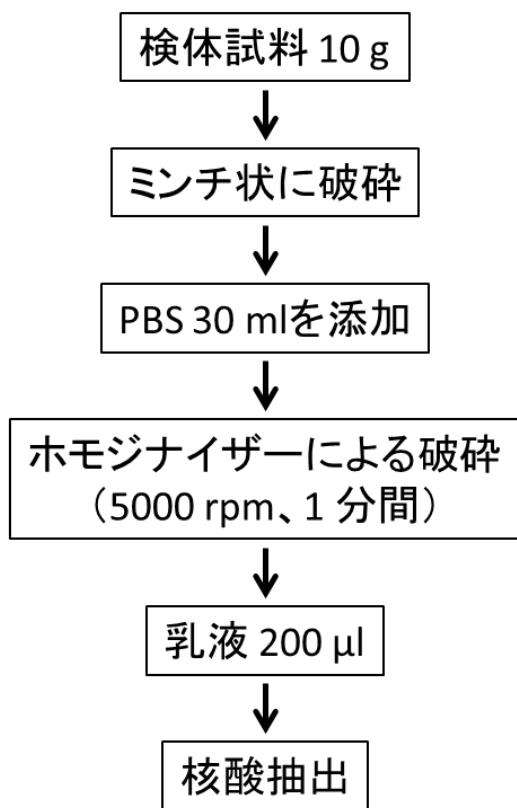


図 2 2 . 試料からの住肉胞子虫ゲノム抽出法

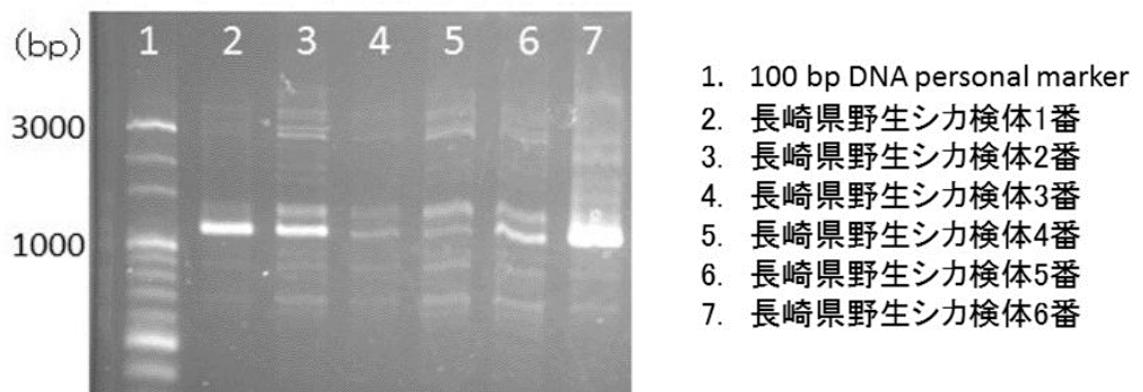


図 2 3 . 厚生労働省通知法を用いた検査結果

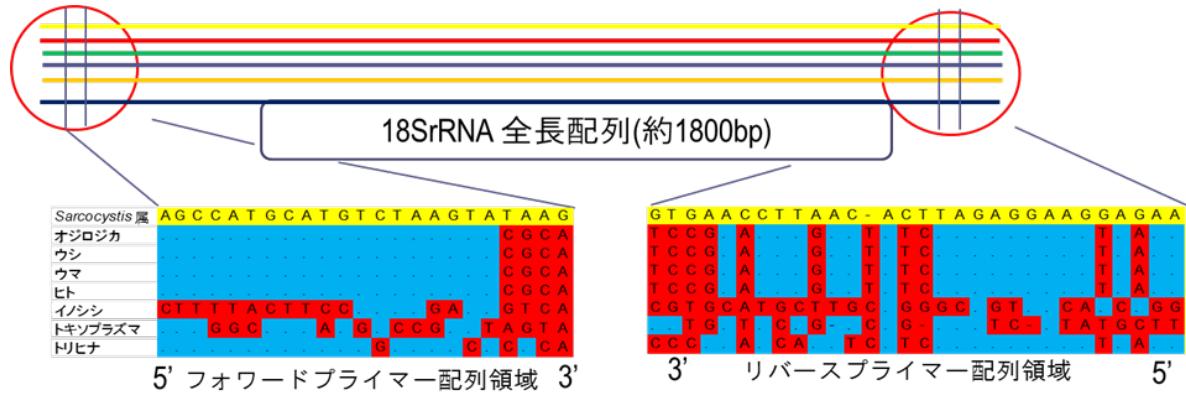


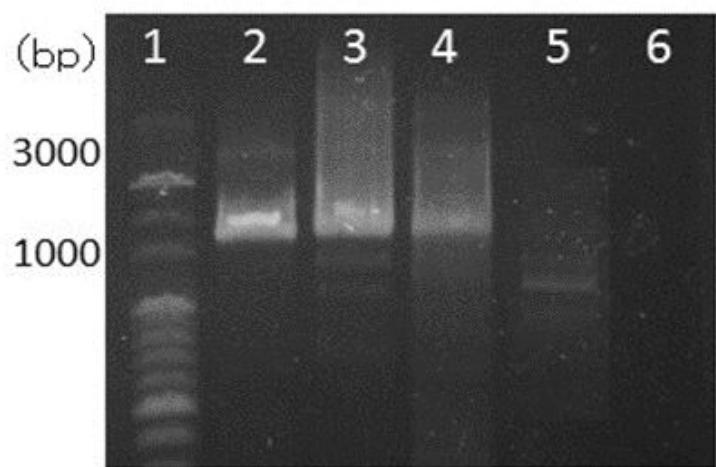
図24.住肉胞子虫18SrRNA検出用プライマー配列

表 1 6 . 住肉胞子虫 18SrRNA 檢出用定性 PCR 反應液構成

GeneAce SYBR qPCR Mix	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 1 7 . 住肉胞子虫 18SrRNA 檢出用定性 PCR 条件

condition	temprature	Time
Initial denaturation	95	10分間
Denaturation	95	30秒間
Annealing	55	30秒間
Extention	72	90秒間
Final extention	72	5分間
Cooling	4	保持



1. 100 bp DNA personal marker
2. 陽性対象(単分離 *Sarcocystis* 属由来DNA)
3. *S. fayeri* 寄生ウマ筋肉由来DNA
4. 長崎県野生シカ検体1番
5. 北海道シカ胎仔由来DNA
6. Negative control(PBS)

図25. 本研究で確立したニホンジカ用新規 *Sarcocystis* 定性的試験法を用いた検査結果

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検査法の確立：

18SrRNA を標的にした新規定量的 PCR 法の確立

研究要旨

平成 21 年頃から起こった生食用馬肉を原因食品とした住肉胞子虫 (*Sarcocystis* 属) 食中毒事例と同様に、野生シカ肉の生食でも住肉胞子虫による食中毒事例が発生している。

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たが、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食中毒発症基準も明確にされていない。

前年度に、厚生労働省通知の *S. fayeri* 検査法を基に定量試験法を考案したが、ウマと異なり、ニホンジカには *S. fayeri* が寄生しないことと、通知法は *Sarcocystis* 属を網羅的に検出するものではないことから、エゾシカ、ホンシュウジカ、キュウシュウジカの全てに適用する検査法ではないことが分かった。そこで本研究は、野生ニホンジカ由来住肉胞子虫を特異的に定量できる検査法を新たに考案した。現在 NCBI に登録されている全ての *Sarcocystis* 属の 18SrRNA 遺伝子領域から共通領域を選出し、標的領域とした。標的領域に適応したプライマー配列を選び、そのプライマーに適合した遺伝子増幅条件と、陽性対照を作製し、リアルタイム PCR 法を基とした定量法を確立した。

A. 研究目的

住肉胞子虫属は野生ニホンジカの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つ原因としていた。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つていなかつたため、*S. fayeri* 検査法を転用するほかなく、正確性が補償されたニホンジカ寄生性住肉胞子虫の特異的定量法とは言えなかつた。本研究では前項に引き続き、野生ニホンジカ肉における網羅的な住肉胞子虫の定量的検査法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. プライマー領域の決定

前項「野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の検査法の確立：18SrRNA を標的にした新規定性的 PCR 法の確立」で

推定した *Sarcocystis* 属に特異的な *Sarcocystis* 18S rRNA 遺伝子全長配列のうち、1123 bp から 1247 bp(124 bp) の領域を標的とするプライマー *Sarcocystis* Real-time F および *Sarcocystis* Real-time R (表1)を Snap Gene software を用いて設計した。(図 26)

2. 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 (GeneAce SYBR qPCR Mix)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 18)。

3. 陽性対照の決定

Sarcocystis 属 18S rRNA 遺伝子の定量的 Real-time PCR 法に用いる標準試料候

補として、pMD20/N1_18S rRNA_*Sarcocystis*I と pMD20/C3_18S rRNA_*Sarcocystis*を選び、これらのプラスミドに対して、*Bam*H と、*Eco*RV、*Eco*RV と *Sai*I の4種の制限酵素を同時に用いて、2種のプラスミドを切断するダブルダイゼーションを行った。ダブルダイゼーション反応後の溶液に対してアガロース電気泳動を行い、4,500 bp 付近のバンドをメスを用いて切り出し、Nucleospin(TaKaRa)を用いて直鎖状プラスミドを精製した。直鎖状プラスミドを標準試料として Real-time PCR を実施し、StepOnePlus Real Time PCR System(Applied Biosystems)にて検量線を作製した。(図28、図29)

C. 研究結果

設計した *Sarcocystis* 属に特異的な定量的 Real-time PCR 法用プライマーを用いて定性的 PCR 法をおこなった。反応物のアガロース電気泳動像では予測したサ

イズである 120 bp 付近に単一のバンドが認められた(図27)。

定量的 Real-time PCR 法用スタンダードとして作製し、得られた直鎖プラスミド(4500 bp)を以下の計算式に当てはめ、遺伝子コピー数を計算した。分子量(mw)は、二本鎖 DNA プロダクトの長さ(4506 bp) × 330 daltons × 2 nt/bp = 2.97×10^6 daltons(g/mole)となり、分子量からコピー数への変換は 2.97×10^6 g/mole ÷ アボガドロ定数(6.023 × 10²³molecules/mole) = 4.93×10^{-18} g/moleclue となった。これを 1 ng 当たりに計算すると、直鎖プラスミド 1 ng = 2.02×10^9 コピーとなった。スタンダードを用いた融解解離曲線解析では単一のピークが確認された。 10^1 ~ 10^8 遺伝子コピー一検量線の r^2 は 0.998 であったので(図12)、定量的試験の定量範囲は 10^1 ~ 10^8 遺伝子コピーに設定した。また、2.で述べたホモジナイズ後の試料には、30 ml の懸濁液中に筋肉 10 g が含まれているた

め、測定したシカ筋肉由来抽出核酸 1 μ l 中の遺伝子コピー数を 3,000 倍し、シカ筋肉 1 g 当たりの *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数を算出した。

D. 考察

国内野生ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属の定量法については、これまで顕微鏡検査でのシカ筋肉中サルコシスト計数によって行われていた(23)が、この検査法では、計数者によってサルコシストの計数に偏りが出ることが予想される。厚生労働省の通知法はウマ寄生性の *Sarcocystis fayeri* を対象とした試験法であり、ターゲット遺伝子およびプライマー領域は二ホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の配列と異なっていたため、野生ニホンジカ肉中の *Sarcocystis* 属の定量に同法を転用することは出来ないことが分かった。本研究で作成した *Sarcocystis* 属を網羅的に定量する

Real-time PCR 法は、前項の定性的試験法と同様、現在 NCBI に登録されている *Sarcocystis* 属全ての 18SrRNA 遺伝子のうち、real-time PCR 法に適したサイズの共通領域を増幅するものである。Real-time PCR 法の定量に用いる標準試料は本来 *Sarcocystis* 属のみの単一 DNA 溶液が望ましいが、*Sarcocystis* 属は筋肉中に存在するため、シカ肉の組織断片の混入は避けられない。単一の DNA 溶液が用いられない場合のスタンダードには PCR アンプリコンを用いる方法と、目的 DNA 断片をプラスミドに導入したものを用いる方法があるが、本研究では後者を用いた。

E. 結論

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 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。

二ホンジカ寄生 *Sarcocystis* spp.の宿主
生息地域における疫学的相違の解析(平
成 28 年度獣医学術東北地区学会 日本
獣医公衆衛生学会東北地区)

G. 学会発表

(1) 国内 5 件

ジビエ(野生鳥獣肉)とくに野生シカ肉
を汚染する住肉胞子虫の危害性分析(第
27 回日本臨床寄生虫学会大会)、住肉胞
子虫 *Sarcocystis* 属由来の下痢誘発性毒素
15kDa タンパク質の病原性解析(第 159 回
日本獣医学会学術集会)、国内野生ニホ
ンジカに存在する *Sarcocystis* spp.の疫学
的調査および遺伝学的解析(第 159 回日本
獣医学会学術集会)

Sarcocystis 属における定量的 Real time
PCR 法の確立と野生ニホンジカにおける
感染状況(第 37 回日本食品微生物学会学

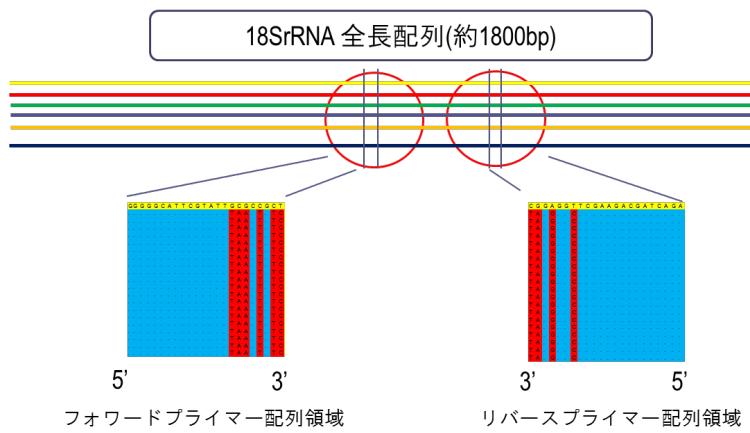


図26.住肉胞子虫18SrRNA定量用プライマー配列

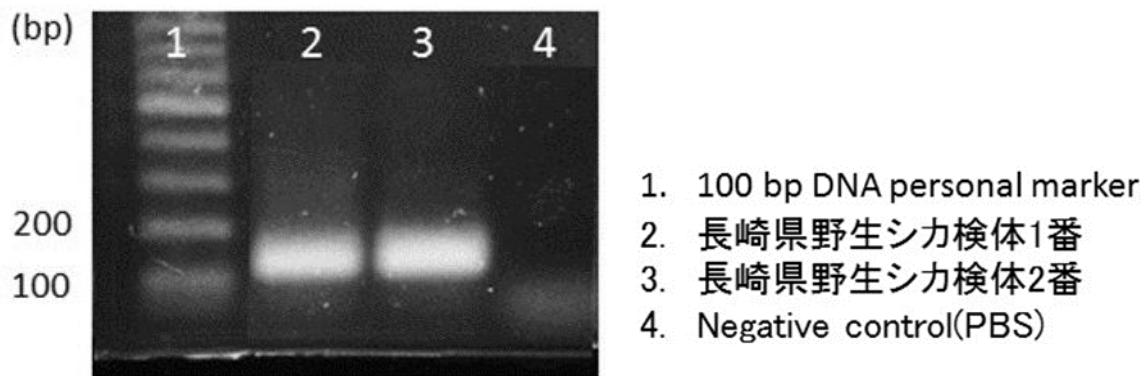


図27. 住肉胞子虫18SrRNA定量用プライマー配列を用いたPCRの結果

表18. 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	55	30 秒間
45 cycles		

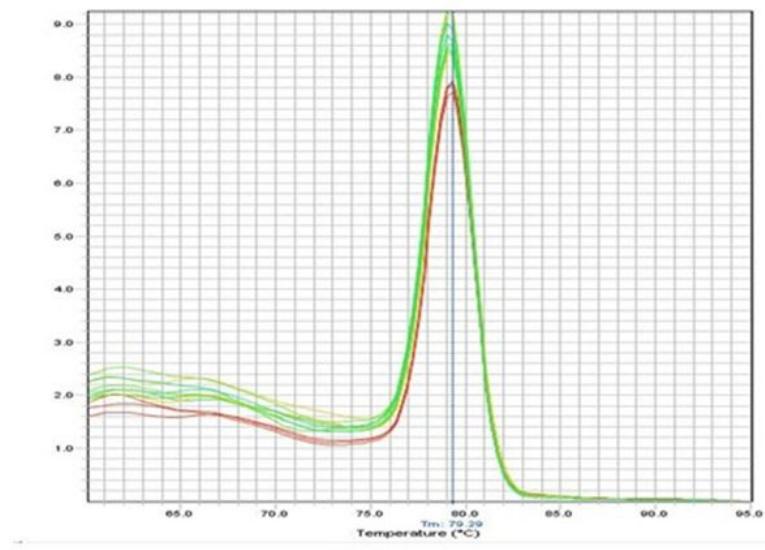


図 2 8 . 野生ニホンジカ用新規定量的リアルタイム PCR 法による融解曲線

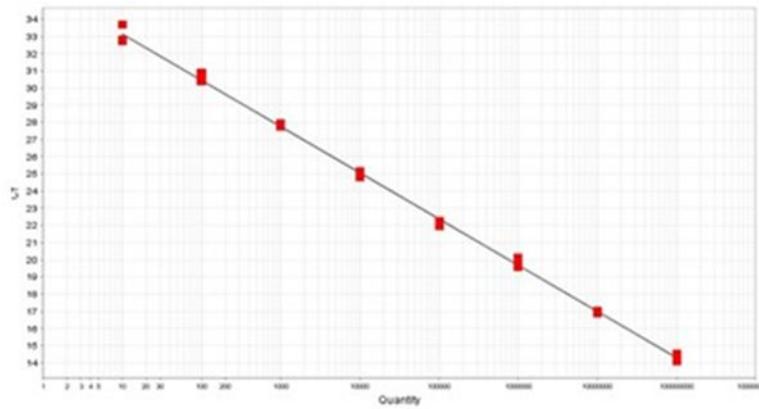


図 2 9 . 野生ニホンジカ用新規定量的リアルタイム PCR 法の陽性対照による検量線

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、本州、九州に生息する各地の野生ニホンジカを対象とした疫学調査

研究要旨

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。

D. 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、我が国の野生ニホンジカではまだ多くの点が不明なままである。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つ原因としていた。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かった。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性的試験法および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、一個体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、前項で確立した定性的・定量的試験法を用い、国内の野生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。

E. 研究方法

1 . 試験検体

北海道、千葉県三重県、長崎県で採取された野生ニホンジカの検体を供試した。

2 . 遺伝学的検査法

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。検査法は、前項で確立した新規定性的検査法、および定量的検査法を用いて行った。各検体試料について試料中の住肉胞子虫を定量し、作製したスタンダードを用い、StepOnePlus Real Time PCR System(Applied Biosystems)を使用して野生ニホンジカ筋肉 1 gあたりの *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子コピー数を算出した。

3 . 住肉胞子虫のシークエンス解析法

PCRにより得られた反応物を用いて、アガロース電気泳動を行い、1,800 bp のバンドを確認した後、バンド部分のアガロ

ースゲルを切り出し、Nucleospin(TaKaRa)を用いて増幅産物を精製した後、in-fusion cloning 反応により、遺伝子クローニング用ベクターである T-vector pMD20(TaKaRa)に導入した。反応液と PCR 反応物を混合後、50 、15 分間インキュベートしたのち、直ちに氷上で急冷した。5 µl の in-fusion 反応液を 50 µl の大腸菌 DH5 (TaKaRa)懸濁液に加えて、42 、45 秒間インキュベートした。続いて 900 µl の SOC 液体培地(BD)を添加し、37 、1 時間インキュベートした後、終濃度 100 µg/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地(BD)に播種した。培養大腸菌コロニーを確認した後に、単コロニーを 10 ml の終濃度 100 µg/ml アンピシリン含有 LB 培地(BD)に接種し、37 、一晩培養した後に innu PREP Plasmid MIDI Direct Kit(analytikjena)を用いてプラスミド溶液(以下 pMD20/18S rRNA_ *Sarcocystis*)を精製した。精製した pMD20/18S rRNA_ *Sarcocystis*

をサンプル DNA とし、ABI3500(Applied biosystems)を用いて 18S rRNA 遺伝子全長の塩基配列を決定した。PCR により得られた反応物に、3 M sodium acetate(TaKaRa)と、125 mM EDTA(和光純薬)をそれぞれ 1 μ l ずつ添加した後、99.8%エタノール(和光純薬)を 25 μ l 加え、混和し、15,000 rpm、30 分間、4 の条件で遠心分離した。その後、上清を捨て 70%エタノールを 70 μ l 加え、再び 15,000 rpm、5 分間、4 の条件で遠心分離後、上清を取り除き 20 分間室温に静置、風乾した。沈殿した DNA に 15 μ l の Hi-Di ホルムアルデヒドを加え溶解後 96 、5 分間インキュベートし直ちに氷上に静置した。その後、溶液をシークエンス用 96-well プレート(Applied biosystems)

に移し、シークエンサー(ABI3500、Applied Biosystems)にて塩基配列を取得した。得られた塩基配列について NCBI の Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)を用いて相同性検索を行つ

た。また、同様の塩基配列を既存の *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子塩基配列と比較するため、クリスタル W を用いてマルチプルアライメントを行った後、最小尤法を用いて系統樹を作製した。

4 . 統計的手法による疫学的解析

国内野生ニホンジカ肉検体 1g 当たりの *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子コピー数を用いて、地域別、年齢別、性別、部位別に分散分析を行った。統計解析には R software を用いた。正規性検定は、Kolmogorov-Smirnov 検定(以下 K-S 検定)、分散性検定は F 検定、Bartlett 検定を用いた。続いて検定された正規性、分散性に従って分散分析検定法を選出した。

F. 研究結果

1 . 国内野生ニホンジカにおける *Sarcocystis* 属の陽性率

この定性的遺伝学的検査法を用いて国内各地から採取した野生ニホンジカ供試

験検体を検査した結果、三重県では 100%(17/17 : 陽性検体数/試験検体数)、北海道では 100%(114/114)、長崎県では 98.7%(76/77)、千葉県では 97.9%(47/48)、滋賀県の検体では 100%(4/4)の割合で陽性が確認された（表 19）。

2. 国内野生ニホンジカに寄生する

Sarcocystis 種の遺伝学的同定

国内野生ニホンジカ筋肉検体から得られた *Sarcocystis* 種のプラスミド群と、既知の *Sarcocystis* 種 21 種について 18S rRNA 遺伝子塩基配列に基づき、系統樹を作製した（図 30）。長崎県では *S. tarandi*、*S. elongata* と相同性が 99% のものと、既存種との相同性が 97% 以下である *S. spp.* が検出された。千葉県の検体から得られたプラスミド群は、*S. pilosa*、*S. tarandi* および *S. elongata* と一致するグループが検出された。北海道の検体から得られたプラスミド群は、*S. tarandi*、*S. elongata* と相同性が 99%

一致した。三重県の検体から得られたプラスミド群は *S. truncata*、*S. sp. HM0506*、*S. silva*、*S. tarandi* および *S. elongata* との相同性が 99% であった（図 31）。

3. 国内野生ニホンジカ筋肉寄生 *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子コピー数の測定

検量線を用いて算出した筋肉組織 1 g 当たりの遺伝子コピー数は、検体全体で $10^4 \sim 10^9$ コピー/g であった。北海道では、中央値 3.4×10^7 コピー/g、平均 1.3×10^8 コピー/g、千葉県では中央値 1.8×10^8 コピー/g、平均値 5.4×10^8 コピー/g、三重県では中央値 3.8×10^7 コピー/g、平均値 2.1×10^8 コピー/g、長崎県では中央値 4.6×10^6 コピー/g、平均値 2.9×10^7 コピー/g であった（図 32、33）。また、年齢別では、1 歳群では中央値、 6.4×10^7 コピー/g、平均値 2.97×10^8 コピー/g、2 歳群では中央値、 8.32×10^8 コピー/g、平均値 1.09×10^9 コピー/g、3 歳群では中央

値、 1.6×10^7 コピー/g、平均値 1.2×10^8 コピー/g、4 歳群では中央値、 1.13×10^7 コピー/g、平均値 5.22×10^7 コピー/g、5 歳以上群では中央値、 1.06×10^7 コピー/g、平均値 2.28×10^8 コピー/g であった(図 3 4)。性別では、雌個体群では中央値 1.5×10^7 コピー/g、平均値 9.72×10^7 コピー/g、雄個体群では中央値 2.98×10^7 コピー/g、平均値 4.55×10^8 コピー/g となった(図 3 5)。部位別では、横隔膜群では中央値 4.12×10^8 、平均値 8.35×10^8 、骨格筋群では中央値 1.09×10^8 、平均値 6.12×10^8 となった(図 3 6)。

4. 国内野生ニホンジカ筋肉寄生 *Sarcocystis* 属 18S rRNA 遺伝子コピー数を用いた寄生密度の統計的手法による疫学的解析

Sarcocystis 属 18S rRNA 遺伝子コピー数について R software を用いた統計学的解析を行った。国内 4 地域から得られた野生ニホンジカ検体中の *Sarcocystis* 属

遺伝子コピー数について正規性検定である K-S 検定を行ったところ、長崎県は p-value = 2.2×10^{-16} 、千葉県は p-value = 5.55×10^{-16} 、三重県は p-value = 2.22×10^{-16} 、北海道は p-value = 4.44×10^{-16} であった。4 地域群間における分散の比較のため、F 検定を拡張した Bartlett 検定を選択して分散性を検定したところ、p-value = 2.2×10^{-16} であった。K-S 検定による正規性、Bartlett 検定による分散性の検定結果から、Kruskal-Wallis 検定を選択し、4 地域間における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の分散分析を行った。その結果、p-value = 1×10^{-9} であった。さらに、ポストホックテストとして、Scheffe 検定を用いた多重比較検定を行った。その結果、各地域間における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数は、長崎県と他地域間のみで p-value が 0.05 以下となった(図 3 3)。次に捕獲ニホンジカ年齢別の *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数を比較し

た。各年齢群における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の正規性を K-S 検定により検定した結果、1 歳群は p-value=2.2 × 10⁻¹⁶、2 歳群は p-value=2.2 × 10⁻¹⁶、3 歳群は p-value=3.33 × 10⁻¹⁶、4 歳群は p-value=2.6 × 10⁻¹⁶、5 歳以上群は p-value=2.8 × 10⁻¹⁶、であった。3 群間以上の比較であることから、F 検定を拡張した Bartlett 検定を選択して年齢別に分類した 5 群間での *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の分散性を検定した結果、p-value=0.012 となった。K-S 検定の正規性、Bartlett 検定による分散性の検定結果から、Kruskal-Wallis 検定を選択して各年齢群間における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の分散分析を行った。その結果、シカの年齢のいずれの群間でも p-value=0.2 となった（図 34）。

性別ごとの *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数について、雌雄群での正規性を K-S 検定により検定した結果、雌は

p-value=5.55 × 10⁻¹⁶、雄は p-value=9.99 × 10⁻¹⁶ であった。分散性については F 検定を用いた。その結果、p-value=0.0024 であった。F 検定による分散性の検定結果から、Mann-Whitney 検定を選択し、雌雄群間における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の分散分析を行った。その結果、p-value=0.12 となつた（図 35）。

ウマ寄生 *Sarcocystis* 属は横隔膜に多く寄生するとされていたことから、横隔膜とその他の骨格筋における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数を比較した。K-S 検定を用いて横隔膜由来群とその他の骨格筋由来群における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の正規性を検定した結果、骨格筋は p-value=2.22 × 10⁻¹⁶、横隔膜は p-value=2.22 × 10⁻¹⁶ であった。分散性検定には F 検定を用いた結果、p-value=0.0067 であった。K-S 検定の正規性、F 検定による分散性の検定結果から、Mann-Whitney 検定を選択し、横隔膜

由来群とその他の骨格筋由来群における *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数の分散分析を行った。その結果、 $p\text{-value}=0.68$ となった（図36）。上記より、95%信頼区間においては、長崎県と他の地域間のみ遺伝子コピー数に有意差があると採択され、性別、年齢および寄生部位に関しては遺伝子コピー数に有意差がないと示された。

D. 考察

本研究で行った野生ニホンジカ調査では、国内4地域とも *Sarcocystis* 属の高率な寄生が確認された。このことから、調査地域においては、野生ニホンジカ生息環境中の *Sarcocystis* 属生活環が十分に保持されていると推察される。捕獲時の推定年齢が1歳の検体にも高率に *Sarcocystis* 属が寄生していることが確認されたことから、垂直感染の可能性が推測された。

ノルウェーのアカシカから検出された

Sarcocystis 属の報告から、野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属も1種ではない可能性が示唆されたため、種の遺伝学的同定には18S rRNA 遺伝子のダイレクトシーケンシングではなく、プラスミドシーケンシングを行った。18S rRNA 遺伝子塩基配列解析から、国内4地域の野生ニホンジカには *S. tarandi*、*S. elongata* が共通して寄生していることが判明した。

千葉県のホンシュウジカ肉検体から検出された *S. pilosa* は、リトニアの動物園で飼育されていたニホンジカから発見された新種で、ニホンジカ固有種の可能性が高い。

三重県のホンシュウジカ検体からは *S. silva* と *S. sp. HM050622* が同定された。*S. sp. HM050622* は、北海道(酪農学園大学)のエゾシカの調査で登録された種であるが、近年新種として登録された *S. truncata* と 18S rRNA 遺伝子塩基配列が 99%一致するため、同種ではないかと考え

られる。

長崎県のキュウシュウジカ検体から、現在 NCBI に登録されている既存種の 18S rRNA 遺伝子とは一致しない *S. spp.* が検出された。九州地方に生息するキュウシュウジカは、ニホンジカ亜種の中でも、エゾシカおよびホンシュウジカと比較して形態的変異が大きいことが知られており、エゾシカおよびホンシュウジカと異なる *Sarcocystis* 種が寄生している可能性が推測される。

今回 *Sarcocystis* 種に関して遺伝学的同定を実施した野生ニホンジカ個体は、計 10 個体であるが、ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* 属の種の多様性および多様な種ごとの毒性解析の必要性、また、それらが寄生する国内に分布するニホンジカの亜種の多様性を鑑みると、さらに多くの野生ニホンジカ個体に寄生する *Sarcocystis* 種の調査が必要である。

国内野生ニホンジカ筋肉中の *Sarcocystis* 属の定量法については、こ

れまで顕微鏡検査でのシカ筋肉中サルコシスト計数によって行われていたが、この検査法では、計数者によってサルコシストの計数に偏りが出ることが予想された。そこで本研究では遺伝学的手法から Real-time PCR 法を用いた *Sarcocystis* 属の定量法を開発した。Real-time PCR 法の定量に用いる標準試料は本来 *Sarcocystis* 属のみの単一 DNA 溶液が望ましいが、*Sarcocystis* 属は筋肉中に存在するため、シカ肉の組織断片の混入は避けられない。単一の DNA 溶液が用いられない場合のスタンダードには PCR アンプリコンを用いる方法と、目的 DNA 断片をプラスミドに導入したものを用いる方法があるが、本研究では後者を用いた。作製した標準試料を用いて実施した *Sarcocystis* 属の Real-time PCR 法にて算出された遺伝子コピー数の差について R software を用いた統計学的解析を行った。

95%信頼区間に基づき、棄却検定を行った

ところ、長崎県と他の地域間のみ有意差が認められたが、顕微鏡による観察においても長崎県の検体中のシストは他の地域に比べ、発見が困難であることが多く、この結果は長崎県の検体は他の3地域より感染が軽度である可能性を補足する。しかしながら、*Sarcocystis* 属陽性率は98.7%と他の地域と同程度の高い寄生率であった。また、長崎県で同定された種のうち *S. tarandi* と *S. elongata* に分類されたのは20個中2個のプラスミドのみであり、その他の18個のプラスミドはすべて *Sarcocystis* spp. であった。以上のことから、長崎県のシカ検体において、*Sarcocystis* 属寄生率は高値であるが、寄生密度が低値であることは、長崎県でのみ遺伝学的に同定された *S. spp.* の感染能力に関係していると推測される。高率な寄生率から、生活環は十分に保持されていると示唆されるため、他種と異なる条件は体内動態であると考えられる。性別の遺伝子コピー数には有意差が認め

られなかったことは、雌雄に *Sarcocystis* 属の暴露回数および感染抵抗力に雌雄差がないと考えられる。ス ポロシストの感染経路は経口摂取が主であるため、常食している草や土壤などに点在するスポロシスト数に地域差がなければ、寄生密度には変化がないと考えられる。

Sarcocystis 属は横隔膜に多く寄生しているという報告があったため、千葉県の骨格筋と横隔膜検体を用いて *Sarcocystis* 属遺伝子コピー数を比較したところ、この2群間での有意差は認められなかった。元となった報告は顕微鏡下でのサルコシスト計数によるもので、横隔膜は筋纖維の方向が一定であり、また厚みも他の骨格筋と比べ薄いことから、顕微鏡検査での発見が容易であったと考えられる。通常、骨格筋は扁平ではなく丸みを帯びており、筋纖維の方向も一定ではないため、顕微鏡による *Sarcocystis* 属の探索が困難である。報

告者は *Sarcocystis* 属を見つけやすい条件が整っているシカ横隔膜の観察を実施した結果、他の骨格筋と比べ、多くのシストがいると判断した可能性が考えられる。本研究で確立した検査法は、筋肉試料 10 g を均一化し、核酸抽出したものを使用しているため、作業者の熟練度による *Sarcocystis* 属検出率の偏りは最大限り取り除けると考えられる。

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。

G. 学会発表

- (1) 国内 5 件
- ジビエ(野生鳥獣肉)とくに野生シカ肉を汚染する住肉胞子虫の危害性分析(第 27 回日本臨床寄生虫学会大会)、住肉胞子虫 *Sarcocystis* 属由来の下痢誘発性毒素 15kDa タンパク質の病原性解析(第 159 回日本獣医学会学術集会)、国内野生ニホンジカに存在する *Sarcocystis* spp. の疫学的調査および遺伝学的解析(第 159 回日本獣医学会学術集会)
 - Sarcocystis* 属における定量的 Real time PCR 法の確立と野生ニホンジカにおける感染状況(第 37 回日本食品微生物学会学術総会)
 - ニホンジカ寄生 *Sarcocystis* spp. の宿主生息地域における疫学的相違の解析(平成 28 年度獣医学術東北地区学会 日本獣医公衆衛生学会東北地区)

表19. 地域別国内野生ニホンジカの *Sarcocystis* 属寄生率

地域	長崎県	三重県	千葉県	北海道	合計
PCR陽性(頭)	76	17	48	114	255
検体(頭)	77	17	49	114	257
寄生率(%)	<u>98.7</u>	<u>100</u>	<u>97.9</u>	<u>100</u>	<u>99.2</u>

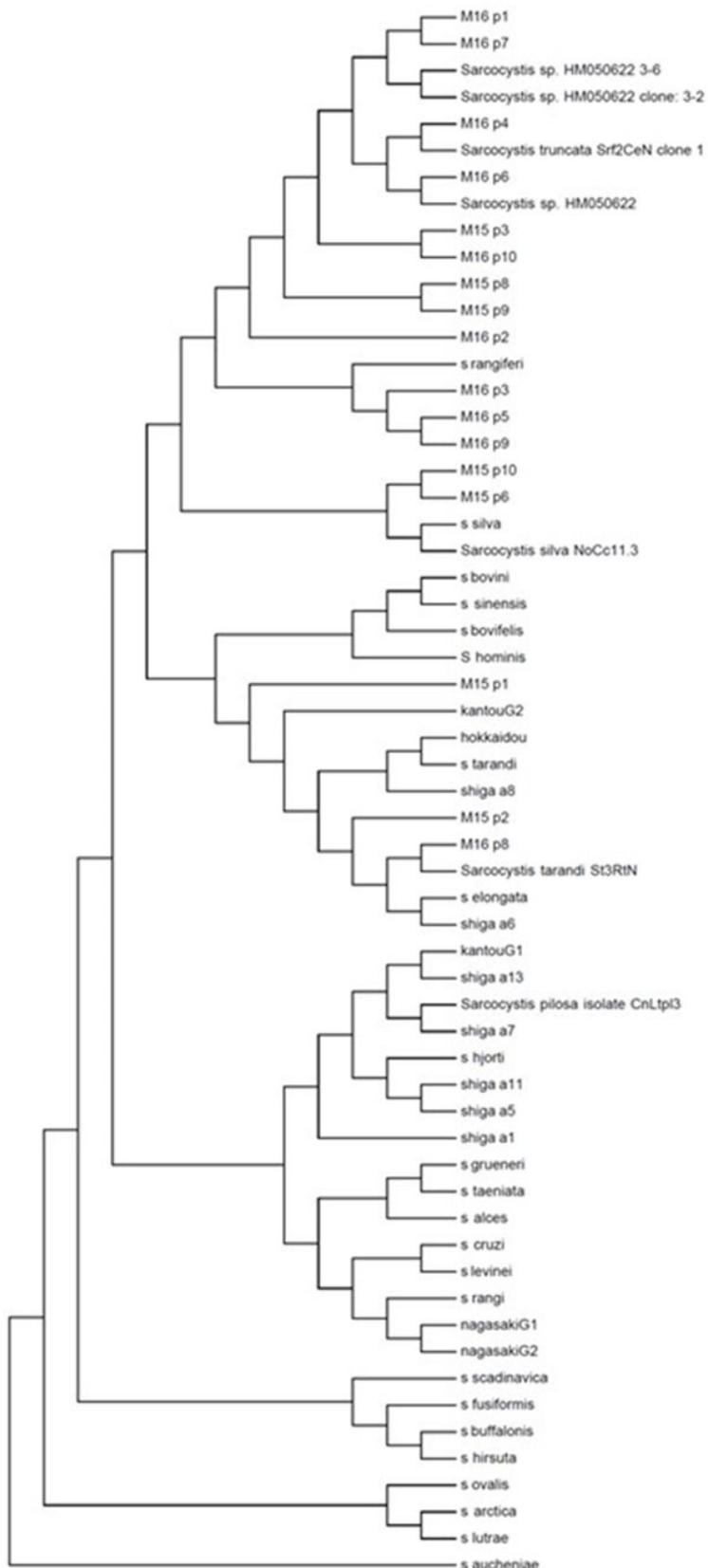
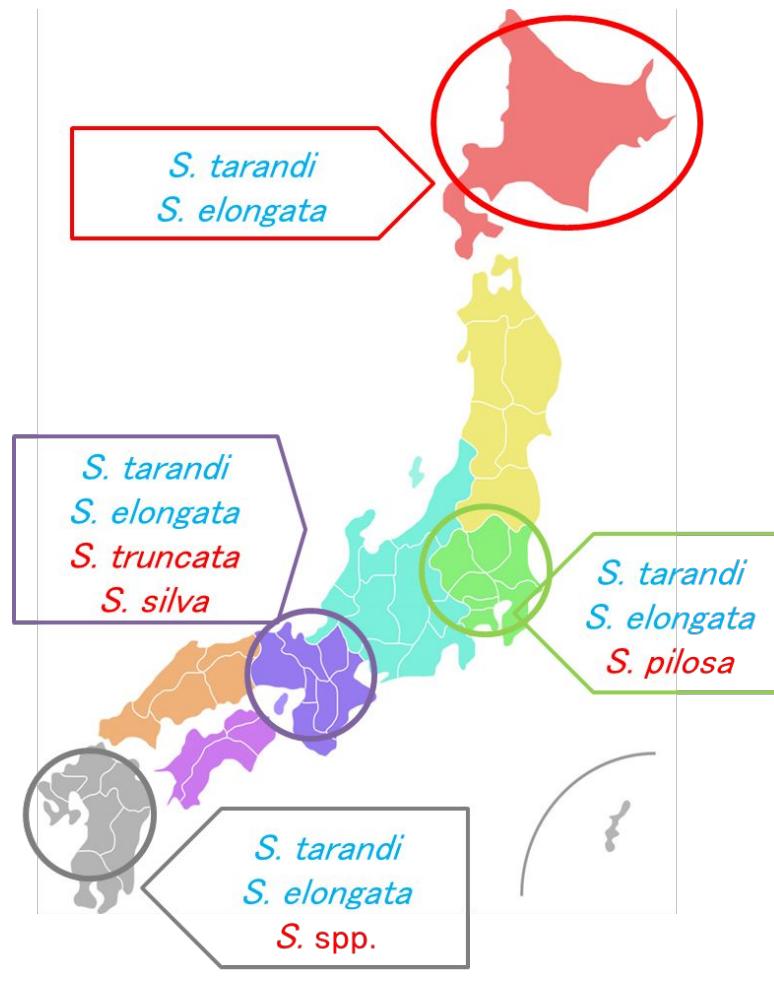


図30 . BLASTによる98 %以上を示した相同性検索結果



各地域の共通種
S. tarandi
S. elongata

地域特有種
S. pilosa : 千葉
S. spp. : 長崎
S. truncata : 三重
S. silva : 三重

図31. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の地域分布

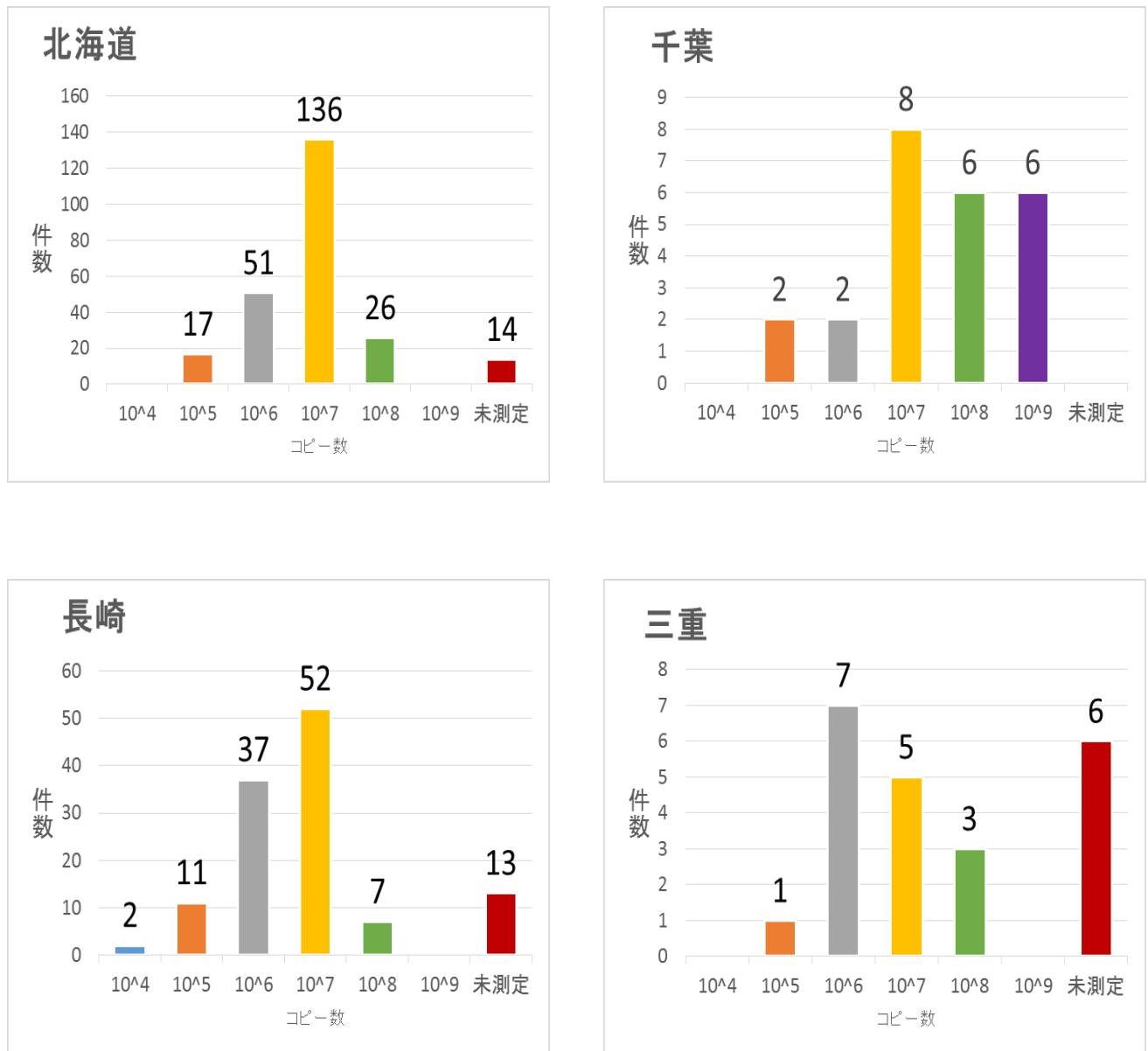


図32. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(全体)

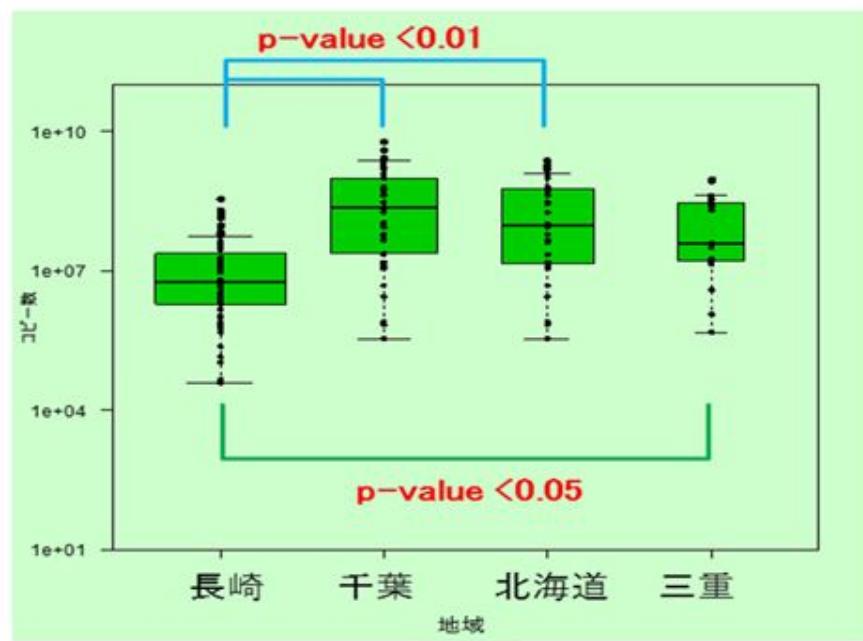


図33. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(地域)

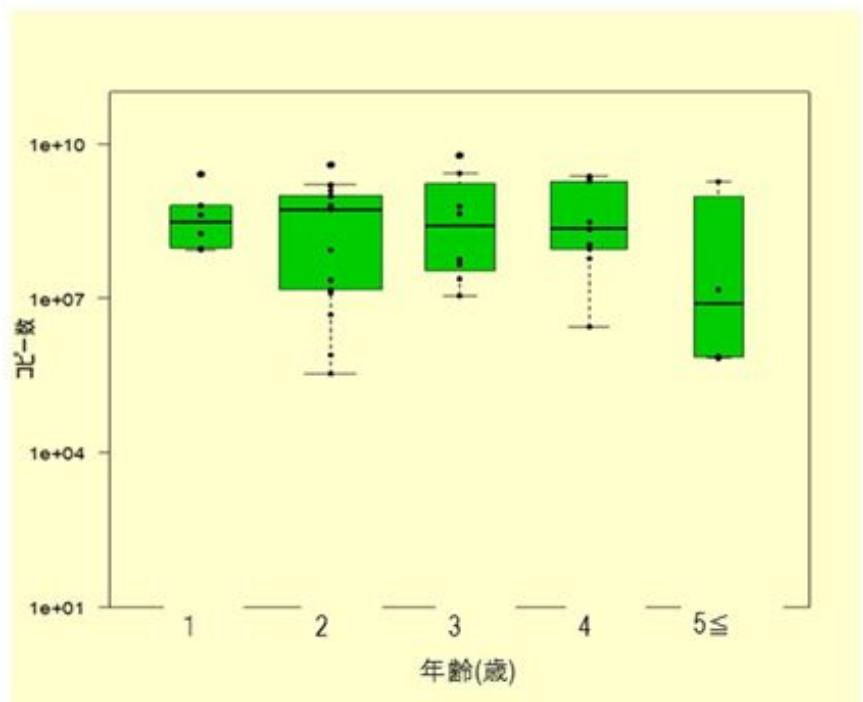


図34. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(年齢)

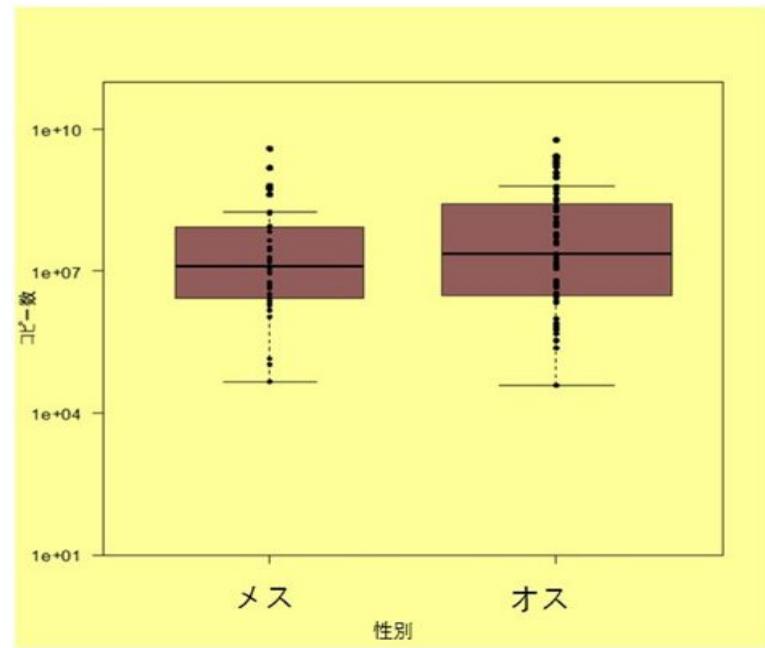


図35. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(性別)

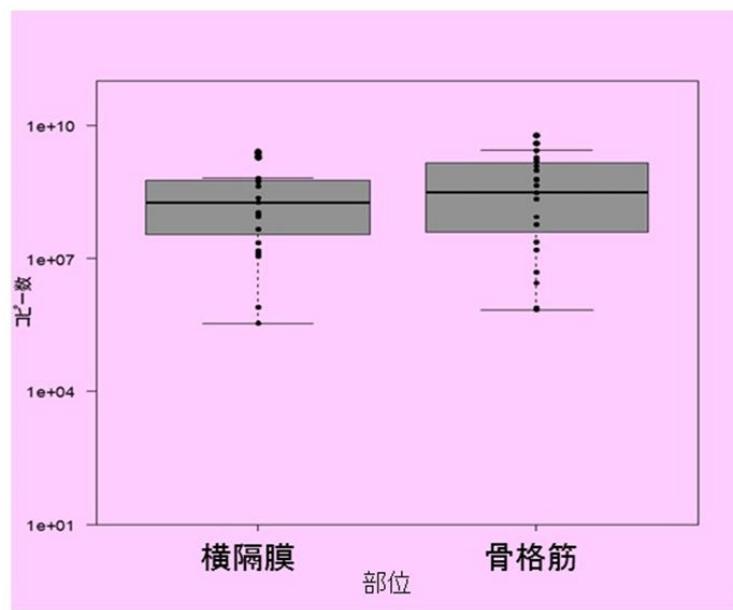


図36. 野生ニホンジカにおける住肉胞子虫遺伝子コピー数の分布(部位)

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食中毒性検査：

マウスを用いた腸管ループテスト

研究要旨

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。馬刺しの食中毒事例を引き起こした *S. fayeri* の病原症状は、下痢と嘔吐を主徴とする。下痢毒性については、*S. fayeri* を用いた in vivo、in vitro 試験によって腸管毒性の再現および機序の解明が試みられているが、野生ニホンジカに寄生する住肉胞子虫については、有症苦情事例の原因となったシカ肉に住肉胞子虫を確認したという現象にとどまり、下痢毒性の直接的な検証は行われていない。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たが、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。

本研究では、野生ニホンジカから分離した住肉胞子虫 *Sarcocystis* so. を用いて、マウスの腸管ループ試験によって腸管毒性の確認を試みた。その結果、ICR マウスの空回腸にて作製したループにつき、 1×10^6 ブラディゾイトの投与でループ内著類医が認められたことから、野生ニホンジカに寄生する *Sarcocystis* sp. も *S. fayeri* と同様に下痢症状を誘発する可能性が考えられた。

A. 研究目的

住肉胞子虫属は馬肉生食での大規模な食中毒事例に引き続き、野生ニホンジカの生食でも有症苦情事例を起こしている。消化器症状からの原因食品中の住肉胞子虫の発見に基づき、住肉胞子虫が原因として特定され、厚生労働省から検査法についての通知が出された。ウマ寄生の住肉胞子虫である *Sarcocystis fayeri* については、その後の調査により、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。また、プラディゾイトを用いた研究により、冷凍または過熱処理により虫を死滅させることができるために、冷凍処理を施す事によって生食用馬肉を出荷できることまでが策定された。ところが、同様に有症苦情事例を出したシカ肉の住肉胞子虫については、未だに公的な検査法および毒性確認は行われていない。そこで本研究では、野生ニホンジカに寄生する住肉胞子虫 *Sarcocystis* sp. の無毒化、および毒性の失活方法の確立を目的として、シカ肉に寄生している *Sarcocystis* sp. について腸管毒性の有無を検討した。

B. 研究方法

ニホンジカの試料検体肉から住肉胞子虫のシスト 50 程度を採取し、PBS に浮遊させ、バイオマッシャー II を用いて破碎してプラディゾイト浮遊液を調整した。ダイテスTにより、生存プラディゾイトを計測したところ、8.9 % であった。マウスは ICR マウス(13 週齢、♂42g BW)を使用した。実験動物規則に従い、麻酔の後、回復して空回腸部分を露出させ、絹糸で結紮してループを作製した。1 ループあたり 1.0×10^4 、 1.0×10^6 プラディゾイトを投与し、陰性対象として PBS、陽性対照として、ウェルシュ菌毒素を用いた。全ての溶液について 100ul ずつ投与し、ループを腹腔内に納めた後、閉腹した。麻酔が覚醒するのを待ってから 18 時間の後、安楽殺を行い、開腹してループを確認した。

C. 研究結果

18 時間後、ループテストを行ったマウスの生存を確認し、開腹した。その結果、陰性対象には変化が認められず、プラディゾイト投与ループに腫脹が認められた。しかし、1.0

$\times 10^4$ ブラディゾイト投与ループには腫脹は認められず、 1.0×10^6 ブラディゾイト投与マウスにのみループの腫脹が認められた。ループ内に貯留した内容物の対比ループ長を FA(Fluid Accumulation) 値で示したところ、陰性対象の 0.01 に対し 0.13 と 13 倍の値であった。腸管内貯留物と腸管内膜を観察したところ、非炎症性非出血性であった（図 37）。

D. 考察

Sarcocystis 属は世界中の多くの草食動物に寄生する原虫であるが、ヒトに対して食中毒を引き起こすことは知られていなかった。しかし、近年、我が国で起きたウマ肉喫食事例により *Sarcocystis* 属のもつ消化管毒性が初めて知られるようになった。続いて、2011 年にシカ肉の生食による有症苦情事例が発生し、*Sarcocystis* 属が原因と推察された。しかしながら、野生シカ肉に寄生する住肉胞子虫の毒性については、馬肉での食中毒事例と類似した症状であることと、同属の寄生虫が存在していたという現象論にとどまり、実質的な検証が行われていなかった。本

研究で示した腸管ループテストは、シカ肉からのシストの単離および回収をすることによって出来る限りシカ肉内に生存すると考えられる他の微生物を相対的に減らし、破碎によりブラディゾイトを遊離させた際に、作業中の処理によるブラディゾイトの損傷を確認するためにダイテストを行う事によって、住肉胞子虫の活性ブラディゾイトのみによる *in vivo* 試験に限りなく近づけた。本研究結果により、これまで「馬肉での食中毒事例から類推できる住肉胞子虫寄生シカ肉による食中毒症状」であったものを、シカ肉寄生性住肉胞子虫が持つ腸管毒性に引き起こされる食中毒と言える。しかし、本研究の前項疫学調査で明らかになったとおり、国内には数種の住肉胞子虫が混在して分布しているため、種によって腸管毒性の有無、または強弱が異なる可能性がある。本研究では、ブラディゾイトという一つの大きなくくりでの腸管毒性として証明されただけに過ぎず、この毒性がどのような分子機序で活性するのか、ひいてはどのように無毒化されるのかについてはまだ多くの不明な点が残されている。

将来的な目標として、安全なシカ肉の供給を目指すため、更なる腸管毒性の機序の解明と無毒化および失活化の方法を確立することが必要であると考えられる。

E. 結論

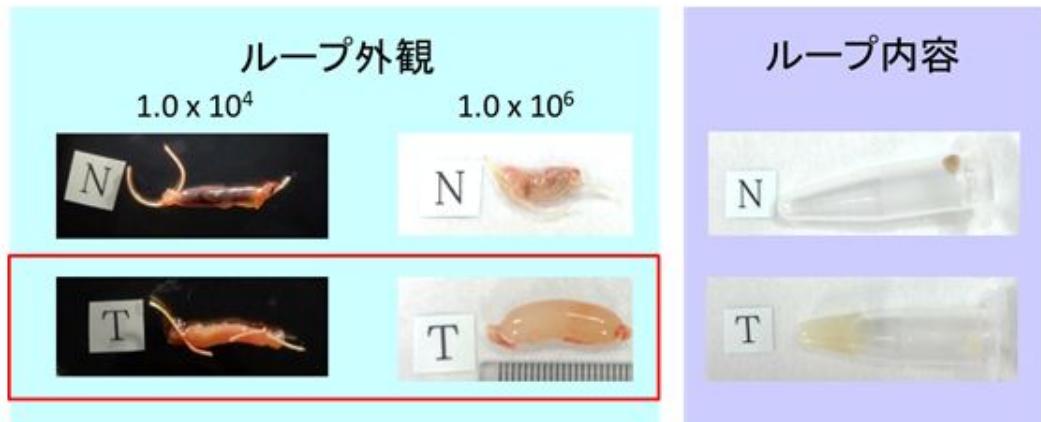
S. fayeri 感染馬肉と同様に *Sarcocystis* sp. 感染シカ肉の生食によって起こされる胃腸炎症状について、マウスを用いた腸管ループテストによる証明を試みた。その結果、1 ループあたり 1×10^6 のプラディゾイトを投与したマウスでループの腫脹が認められた。このことから、*S. fayeri* 同様に、シカ肉に寄生する *Sarcocystis* sp. も腸管毒性があることが初めて示された。

G. 学会発表

(2) 海外 2件

The enterotoxicity analysis of *Sarcocystis* spp. parasitized in wild deer in Japan. (The Society of Toxicology's 56th Annual Meeting and ToxExpo)

The enterotoxic activity of *Sarcocystis fayeri* actin depolymerizing factor (ADF). (The Society of Toxicology's 56th Annual Meeting and ToxExpo)



	FA値*	
	1.0 × 10 ⁴	1.0 × 10 ⁶
(N) NC	0.02	0.01
(T) Bradyzoites	0.01	0.13

*FA値 : Fluid accumulation Ratio 液体貯留値 内容重量(g)/ループ長(cm)

図 3 7

野生一ホンミジカから採取された住肉胸子中ブラディゾイドを

別紙4

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					