

厚生労働省科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

野生鳥獣保有微生物種の網羅的解析による喫食リスク低減化に関する研究

平成28年度～29年度 総合研究報告書

研究代表者 福本 晋也

平成30(2108)年 5月

目 次

I . 総合研究報告		
野生鳥獣保有微生物種の網羅的解析による喫食リスク低減化に関する研究 --	1	
福本 晋也		
II . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
（総合）研究報告書

野生鳥獣保有微生物種の網羅的解析による喫食リスク低減化に関する研究

研究代表者 福本 晋也 帯広畜産大学准教授

研究要旨

微生物学的リスク要因を明確にすることで、野生鳥獣肉の食品衛生管理向上に資することを目的として、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施した。エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施し、微生物核酸由来配列の検出を行った。食中毒関連病原微生物の疫学調査の結果、住肉孢子虫：95%以上、肝蛭：約 10%、腸管出血性大腸菌：約 15%の陽性率であった。解析対象とした原虫・ウイルスについては人への病原性が高い種ではないものが多いことが示唆されたが、病原性が不明かつ高度に感染しているものもあり注意が必要である。腸管出血性大腸菌については 15 種の 0 抗原型が検出されエゾシカジビエ利用における懸念材料であることが確認された。

A．研究目的

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

野生動物による農林水産業被害の爆発的増大が懸念されているが、狩猟者減少による捕獲圧低下、生息密度上昇による感染症リスク上昇など、厳しい実態がある。野生鳥獣を食肉として有効利用し、付加価値によりその需要を高めることで、結果的に野生動物の生態管理を目指す動向がある。そこで問題となるのが、野生動物という特

殊性に起因する食品衛生リスクである。自治体による野生鳥獣肉衛生管理ガイドラインの策定と周知・徹底などの安全性確保への努力が払われている。結果、条例等に基づき適切な処理を経た野生鳥獣肉の流通が拡大してきてはいるが、依然として捕獲鳥獣の一割程度を占めるにすぎず、その利用は限定的である。その遠因として処理場への運び込み時間・着弾部位制限など、狩猟者への負担が大きいことがあげられる。

結果として、正規の処理経路を経ない野生鳥獣肉が、レストラン等で商業利用されている実態が散見される。このような安易な取り扱いが喫食リスクに対する知識浸透が不十分な事が原因の一つと考えられる。ガイドライン等の「どのような病原体を保有しているか不明であること等から

生食はするべきでなく」の文言から理解されるように、具体的なリスク要因が不明なため明確な注意喚起が出来ないことが、一般消費者・飲食業者・狩猟者のリスク意識向上への妨げとなっていると考えられる。

そこで本申請では、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施する。平成 28 年度では、エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施しデータの集積を行う。平成 29 年度では、次世代シーケンサーデータ解析により食品衛生リスク要因病原微生物種の同定、新興感染症発生要因候補微生物種候補の同定、微生物種毎に疫学情報の解析を実施する。以上の研究の実施により、基礎データ集積によりリスク要因と施策提言根拠を明確化し、野生鳥獣肉食品衛生行政に資することを目的とする。

B. 研究方法

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

(1)エゾシカサンプルの収集

十勝地方において100個体以上の狩猟捕獲エゾシカ由来サンプルの採集を目標としてサンプリングを実施した。採集サンプルは、血液を主体として、主たる喫食部位である筋肉・肝臓、さらに糞便を採集した。採集時期は、捕獲個体の食肉流通利用が最も盛んな猟期前半（10月から12月）を主体として、狩猟期間後期（1月から3月）、有害鳥獣捕獲が実施される夏期捕獲サン

ル（4月から9月）の収集にも努めた。エゾシカ処理事業者に協力を依頼することで大部分のサンプルを確保した。エゾシカ由来サンプルについては、採集地域・性別・年齢等の個体情報をトレーサブルサンプルな形で収集することを目指した。得られたサンプルについては解析まで冷凍保存した。

(2)次世代シーケンサーによるデータ集積

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

(3)データ解析によるエゾシカ保有微生物種の網羅的同定

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

(4) 同定微生物種毎の疫学調査

住肉孢子虫については岩手大学山崎朗子助教との共同研究によりPCR法を用いて感染率の調査を実施した。肝蛭については肝臓内虫体直接検出法により感染率の調査を実施した。また、糞便由来DNAについて、TAKARA腸管系病原細菌遺伝子検出キットを用いて、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、赤痢菌の陽性率を検証した。また、TAKARA O-157 (ベロ毒素1型、2型遺伝子) PCR Typing Setを用いてVT遺伝子のタイピングを行った。また、糞便サンプルよりEHECの分離培養をクロモアガーSTECもしくはBHI 培地により帯広畜産大学・山崎栄樹准教授との共同研究により実施した。また、分離株のO抗原型についてO genotyping PCR法により推定した。

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

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

C. 研究結果

(1) エゾシカサンプルの収集

十勝地方を中心として平成28年4月よりエゾシカサンプル(筋肉・肝臓・血液)の採集を開始した。主に有害鳥獣駆除期間である4月から9月については、4月1検体・5月9検体・6月7検体・7月3検体・8月19検体・9月25検体の合計64検体を収集した。食味が高いことから最も食利用が盛んな猟期前半の10月から12月については、10月53検体・11月17検体・12月25検体の合計95検体、猟期後半の1月から3月については、1月8検体・2月10検体・3月12検体の合計30検体を収集した。28年度に採集したエゾシカサンプルは合計189検体であった。捕獲は研究代表者所属機関が位置する十勝地方帯広市、そして、芽室町、幕別町、清水町、大樹町、足寄町、豊頃町、忠類町、広尾町、

浦幌町、池田町、更別村また、隣接地域である釧路市音別町、えりも町などエゾシカが高密度に生息する十勝地方内の日高山脈沿い自治体および十勝地方から釧路地方にまたがる太平洋沿岸自治体においてなされた。捕獲エゾシカ個体の年齢については外貌推定法により、当歳から5歳までの個体であり、その内訳は一歳34頭・二歳42頭・三歳79頭・四歳14頭・五歳10頭、年齢不明が10頭であった。性別はオス86個体、メス99個体、4個体については性別情報を得られなかった。また9月末から翌3月までについては直腸内糞便についても個体トレーサブルな形で採集し、当該期間内において130個体分の糞便サンプルを収集した。糞便サンプルについてはDNA抽出に供したほか、腸管内細菌分離のため20%グリセロール溶液懸濁液としても凍結保存した。このサンプリングはH29年度においても継続的に実施し、合計約350検体の糞便サンプルを収集した。

(2) 次世代シーケンサーによるデータ集積

筋肉・肝臓については捕獲地・捕獲時期・年齢・性別の項目について無作為に40検体を抽出しDNAおよびRNAを抽出後、次世代シーケンサーによる解析に供した。肝臓、筋肉由来DNA、RNAそれぞれについてイルミナHiSeqを用いた解析により100bpペアエンドで4Gb(2000万リードペア/検体)のデータを取得した。また、60個体分のサンプルより血清由来DNA・RNAを抽出した。これらについても肝臓・筋肉由来核酸と同様にイルミナHiSeqを用いた解析により100bpペアエンドで4Gb(2000万リードペア/検体)のデータを取得した。また糞便由来DNAでの16Sメタゲノム解析については48個体分のサンプルをプールしイルミナMiSeqを用いて300bpペアエンドで37.5万リードペアのデータ取得を行い、得られた配列についてTaxonomy解析を実施した。また、一部個体の肝臓・筋肉・脾臓よりDNAを抽出し糞便由来DNAと同様に16Sメタゲノム解析を実施し各臓器毎に7.5万リードペアのデータ取得を行い、得られた配列についてTaxonomy解析を実施した。また、24個体分の糞便由来DNAを用いて18Sメタゲノム解

析を実施した。250bpペアエンドで総計約120万リードペアのデータを取得し、得られた配列についてTaxonomy解析を実施した。以上の様に平成28年度において取得した。

(3) データ解析によるエゾシカ保有微生物種の網羅的同定

エゾシカの血液、筋肉、肝臓由来核酸を用いた、RNA-Seq・DNA-Seqにより網羅的な感染微生物の検出を行った。De novo assemblyの結果得られたcontig数は血清RNA:3,156、血清DNA:322,753、肝臓RNA:225,100、肝臓DNA:581,567、筋肉RNA:72,968、筋肉DNA:601,973であった。参照配列へのマッピングの結果、非マップcontig数は血清RNA:263、血清DNA:891、肝臓RNA:291、肝臓DNA:1,245、筋肉RNA:9,693、筋肉DNA:1,520であった。RNA-Seqにおいて非マップcontig割合が筋肉RNAで著しく高いことが特徴的な結果であった。これらの全contigについてnrデータベースを用いてBLAST解析を実施した(E-valueを1.0E-3以下で設定)。その結果、サンプルに毎に

RNA-Seq・DNA-Seq解析で検出された微生物種

Nucleic Acid Source	Blast Top Hit Taxonomy Name	E-Value	Length	Alignment Length	Similarity	
Serum RNA	Escherichia coli	2.40E-78	205	116	100.00%	
	Brugia malayi	2.10E-75	790	151	90.07%	
	Hemophilus influenzae	2.10E-30	139	125	63.20%	
	Streptococcus pneumoniae	8.50E-09	91	83	61.45%	
	Vibrio cholerae	4.00E-41	73	71	100.00%	
	Histoplasma capsulatum NAm1	5.10E-12	801	97	50.52%	
	Hepatitis A virus	2.60E-56	335	97	94.95%	
	Serum DNA	Anaplasma phagocytophilum	1.50E-10	86	90	57.78%
		Babesia bigemina	1.70E-29	211	71	90.14%
		Brachyspira hampsonii	1.20E-19	67	46	93.88%
Enterococcus faecalis		2.90E-14	92	49	87.76%	
Escherichia coli		3.30E-10	88	48	75.00%	
Hemophilus influenzae		2.20E-27	139	137	57.68%	
Mycobacterium sp. WCM 7299		1.20E-22	404	118	59.32%	
Pseudomonas syringae pv. actinidiae		3.90E-25	82	82	85.37%	
Streptococcus pneumoniae		1.30E-19	130	43	95.35%	
Liver RNA		Babesia bigemina	7.60E-25	125	44	77.27%
	Hepatitis A virus	3.60E-88	2251	156	97.44%	
	Norine latent virus	1.10E-92	135	132	100.00%	
	Rodent hepatitis virus	0.00E-00	2463	1059	90.52%	
	Vibrio cholerae	8.20E-131	293	221	100.00%	
	Escherichia coli	2.90E-62	104	102	98.04%	
Liver DNA	Anaplasma phagocytophilum	1.90E-23	155	127	99.84%	
	Babesia bigemina	4.00E-29	331	127	69.29%	
	Brachyspira hampsonii	6.90E-19	67	58	94.48%	
	Hemophilus influenzae	1.20E-40	139	124	68.55%	
	Mycobacterium sp. WCM 7299	1.70E-35	404	135	71.85%	
	Nematostella vectensis	8.70E-34	288	289	41.87%	
	Salmonella phage Stitch	3.60E-75	161	115	97.39%	
	Streptococcus pneumoniae	9.00E-15	189	80	73.75%	
	Meat DNA	Anaplasma phagocytophilum	1.90E-20	86	83	71.08%
		Babesia bigemina	4.00E-40	329	178	72.47%
Corynebacterium diphtheriae		2.20E-13	105	58	74.14%	
Eggerthia cotteniformis		1.30E-15	82	80	75.00%	
Escherichia coli		1.20E-29	77	61	93.44%	
Enterococcus faecalis		5.70E-29	92	76	88.94%	
Hemophilus influenzae		3.70E-33	139	130	58.46%	
Hammondia hammondi		1.90E-29	333	84	89.29%	
Hemonchus contortus		3.60E-12	233	34	94.12%	
Hemophilus influenzae		2.80E-34	139	119	62.18%	
Histoplasma capsulatum G186AR		3.00E-05	859	108	47.22%	
Nisseria polysaccharae		3.70E-12	123	80	65.00%	
Sarcocystis neurona		1.50E-63	303	181	87.29%	
Streptococcus pneumoniae		1.30E-44	130	125	74.40%	
Toxoplasma gondii		6.30E-147	565	343	83.67%	
Enteric nasal tumour virus of goats		0.00E-00	612	633	75.93%	
Meat RNA		Cyrtospora caytanensis	3.70E-84	707	123	85.37%
		Eimeria acervulina	5.00E-66	245	215	70.23%
		Eimeria brunetti	5.40E-41	193	94	90.43%
		Eimeria maxima	3.60E-57	350	107	62.52%
	Eimeria mitis	2.90E-61	445	97	98.97%	
	Eimeria necatrix	6.10E-62	435	120	92.52%	
	Eimeria praecox	1.50E-12	567	79	70.89%	
	Eimeria tenella	2.30E-25	122	50	100.00%	
	Escherichia coli	8.20E-86	176	123	100.00%	
	Hammondia hammondi	0.00E-00	673	555	95.32%	
	Mesopora caninum Liverpool	0.00E-00	705	442	95.61%	
	Sarcocystis muris	0.00E-00	394	397	96.55%	
	Toxoplasma gondii	3.40E-170	363	304	90.13%	
	Vibrio cholerae	4.00E-41	73	71	100.00%	

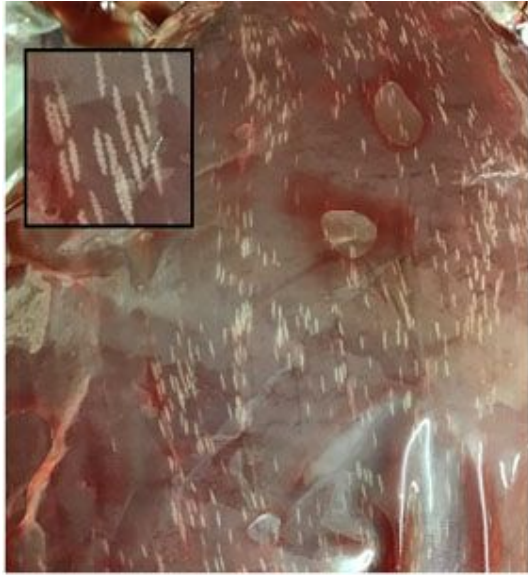
各サンプルにおいて3 contig以上がヒットした生物種を抜粋し、その内の1 contigの情報を記載

割合は異なるが、30~60%程度のcontigについてBLAST結果を得ることができた。その内の約半数程度がエゾシカに起因すると思われる哺乳動物に対する結果であった。これらを除外すると、寄生虫・細菌・ウイルスに対する配列へのヒットが確認された。非マップcontig数が著しく多かった筋肉由来RNAにおいては、ハモンディア・トキソプラズマなどのコクシジウム属の原虫とされたが、個別に配列を相同性の解析を行った結果、データベースが整備されていない住肉胞子虫由来配列が、データベースの整備されている上記の原虫DNAに高い相同性を示していることが示唆された。すなわち住肉胞子虫由来Contigがエゾシカ筋肉からは多数検出された。BLAST検索でヒットしたウイルスでヒトへの病原性が示唆されるものとして、肝臓RNAサンプルより検出されたA型肝炎ウイルスがあった。

(4) 同定微生物種毎の疫学調査

肝蛭、住肉胞子虫、腸管出血性大腸菌、赤痢菌、サルモネラなどの食中毒関連病原体について解析を行った。肝蛭については肝臓からの直接虫体検出法により解析した。外観の肉眼的観察による一次スクリーニングにより異常が確認された肝臓について、切開肝臓直接虫体検出法により肝蛭の検出を実施することにより、肝蛭の感染の検出を実施した。平成28年度に採集した189個体のうち、17個体から肝蛭虫体が検出された。1個体から分離された肝蛭虫体数は1から20虫体であった。肝蛭陽性個体は幕別町・豊頃町・広尾町・大樹町・浦幌町・釧路市で捕獲された個体であった。肝蛭分離個体の性別はオス4頭、メス13頭であった。年齢は一歳から四歳であった。また、岩手大学関まどか助教との共同研究により本研究課題開始前からも継続的に収集を行っている肝蛭の遺伝子型解析を実施した。住肉胞子虫についてはPCR法による遺伝子検査の結果95%以上の陽性率であった(岩手大学・山崎朗子助教の協力による)。筋肉サンプル採取時に肉眼的サーベイは継続的に実施した。その結果、100シスト/10平方センチメートル程度と、高密度に感染しているエゾシカが存在して

いることが確認された。



エゾシカ肉表面に肉眼的に認められる大量の住肉胞子虫シスト

平成28年度エゾシカの肝臓・住肉胞子虫サーベイランス

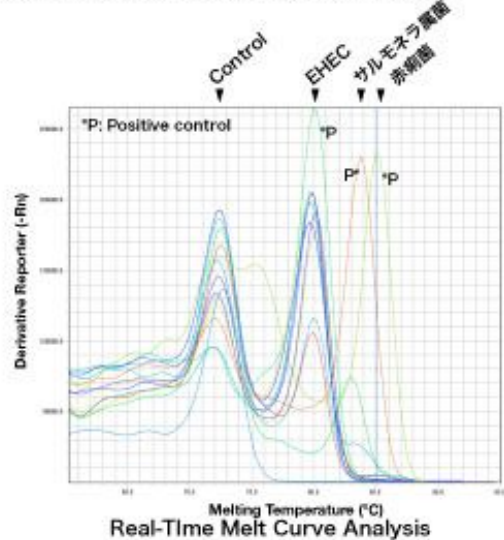
病原体	検出法	陽性率または陽性数/被検検体数
住肉胞子虫	PCR	95%以上
肝臓	虫体直接	17/189

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

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

18S メタゲノム解析の結果、常在性の生物を除くと、ヒトの下痢症および過敏性腸症候群で検出されることが知られている、*Blastocystis* が高頻度にエゾシカ糞便より検出されることが明らかとなった。また、*Blastocystis* と生物学的に近く、エゾシカからは未だ分離の報告がない、ヒトでの下痢症の原因となる *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) の OTU が散見された。そこで、

● TaKaRa腸管系病原細菌遺伝子検出キットによる解析



この2種の病原体に着目し、より詳細な解析をおこなった。*Cryptosporidium* ユニバーサル PCR を実施、塩基配列の解析を行うことで、本当に *C. parvum* がエゾシカに感染しているのが解析した。その結果、エゾシカから検出される *Cryptosporidium* は *parvum* 以外の種であった。また、*Blastocystis* の陽性率を PCR 法により解析したところ、47% (62/132) であり、遺伝子型を解析したところ、全検体とも ST14 であることが明らかとなった(第160回日本獣医学会にて発表)。現在、病原性等の性状について、より詳細に解明するため、奈良女子大学との共同研究により、5株の分離培養に成功している。

糞便より DNA を抽出し、TAKARA 腸管系病原細菌遺伝子検出キットを用いたリアルタイム法による解析の結果、赤痢菌、サルモネラ菌については現在のところ全個体において陰性を示した。腸管出血性大腸菌については約350検体中54検体が明確な陽性のピークを示した。陽性個体は5自治体由来であった。陽性検体については、stx 遺伝子のサブタイピングを PCR 法により実施した結果、stx1 および stx2 遺伝子の双方が確認された。また、陽性個体について、関東科学クロモアガー STEC を用いて、糞便より EHEC の分離培養を試みた結果、一部の PCR 陽性サンプルより stx 遺伝子陽性コロニーを分離することに成功した。分離株について PCR 法により O 抗原型の同定を試みた結果、それぞれ O22、O26、O89、O98 であ

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

分離培養に成功したエゾシカ由来EHECの性状

サンプルID	性別	年齢	VTサブタイプ	O抗原型
3	♀	2歳	VT2	O26
12	♀	1歳	VT1	O156
19	♀	2歳	VT1	O98
30	♀	3歳	VT2	O83
51	♀	3歳	VT2	O76
54	♂	2歳	VT1/VT2	O26
56	♂	2歳	VT2	O83
68	♀	3歳	VT2	O159
17-1	♂	3歳	VT2	O22
17-8	♀	3歳	VT2	O22
17-11	♀	3歳	VT2	O83
17-23	♀	3歳	VT2	O83
17-39	♀	3歳	VT2	O21
17-40	♂	2歳	VT2	O83
17-46	♂	5歳	VT2	O10
17-52	♂	2歳	VT2	O83
17-68	♂	3歳	VT2	O83
17-72	♂	1歳	VT2	O22
17-87	♀	3歳	VT2	O22
17-136	♀	3歳	VT2	O83
17-144	♀	3歳	VT2	O83
17-155	ND	ND	VT2	O10
17-157	♀	2歳	VT2	O117
17-160	♀	3歳	VT1	O7
17-163	♂	2歳	VT2	O79
17-164-1	♀	3歳	VT2	O181
17-183	♂	3歳	VT2	O10
17-192	♂	2歳	VT1	O149
17-195	♂	2歳	VT2	O75
17-205	♀	2歳	VT2	O22
17-207	ND	ND	VT2	O83
17-219	♀	3歳	VT2	O2Bac
17-228	♀	3歳	VT2	O83
18-2	♀	3歳	VT2	O83
18-12	ND	ND	VT2	O10

D. 考察

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

サンプリングについては当初計画にお

いて100個体分程度を想定していた。猟期開始前の秋期において十勝地方は台風による甚大な被害を受け、山間部の林道崩壊等の被害が多くあり、サンプリングの遂行が危ぶまれた。しかしながら各団体による協力のほか、本年度より北海道よりエゾシカ肉処理施設第一陣として認証を受けたELEZO社の全面的な協力を得ることができたため、3月末の時点で189サンプルの収集を終了、現在も継続中である。当初計画を上回るペースで効率的に推移しており、サンプリングについては計画していた目的を十分に達成することが出来ている。サンプルのトレーサビリティについては、およそ95%がトレーサブルな形で収集がなされた。一般ハンター等に協力を依頼する必要があることから、一定数のサンプルについては個体情報が曖昧になることが当初より想定されていたが、予想に反し95%程度のサンプルがトレーサブルな状態で回収されており、この結果は研究結果の精度に大きく寄与するものであった。サンプリングは当初の予定に加え29年度についても継続的に実施し、結果、約400サンプルを個体トレーサブルに収集することができた。

エゾシカサンプルのNGS解析については、サンプリングを目的どおりに達成することが出来たため、当初の予定通り、血清・筋肉・肝臓由来核酸の精製・解析を現在実施し、平成28年度内にデータ取得を終了し、平成29年度においてデータ解析を実施予した。次世代シーケンサーのデータ解析による微生物DNAの検出について特徴が大きかった点は、主たる喫食部位の核酸の解析、特にRNA-Seq解析において、住肉胞子虫由来と考えられるContigが数千得られたことである。一般的に次世代シーケンサーによる病原体等の検出については、大量に存在する宿主由来核酸によるマスクのため、微量にしか存在しない微生物核酸を検出するのは非効率的なため、病原体を含む確立が高い分画の使用等、なんらかのサンプル調整が必要な場合が多い。本研究課題についてはウイルス・細菌・寄生虫など特に微生物種を指定せず広範囲に検出するとの目的を達成するため、筋肉・血清・肝臓由来核酸を特に分画・調整すること無く

次世代シーケンス解析に供した。その結果、全サンプルとも微生物由来核酸を検出することができたことから、本研究で用いた方法を用いてもリード数を最低限担保することで、あるていど有意な解析データが得られることが明らかとなった。しかしながら、筋肉由来 RNA の解析では住肉孢子虫由来 Contig が極めて多く検出されており、なんらかの分画操作を行ったかのような高い検出率であった。すなわちこの結果は、極めて大量に住肉孢子虫がエゾシカ筋肉に含まれていることを示唆する結果であった。また、エゾシカ筋肉サンプルの肉眼的サーベイにより高度住肉孢子虫感染サンプルが発見されたことは、次世代シーケンサーによる解析から得られた知見を裏付けるものでもあった。住肉孢子虫については近年、馬刺しでの食中毒事例が問題となっている。エゾシカから検出される住肉孢子虫の人への病原性はまだ良くわかっておらず、その検証の必要性があると考えられる。また、エゾシカ肉のジビエ利用としてサラミや生ハム等の非加熱加工食品への利用がある。人への病原性はさておき、エゾシカから検出される住肉孢子虫種の不活化に関する明確な方法論・基準等が示されることが今後のジビエ利用において社会的に重要な知見となるものと考えられる。

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

真核生物メタゲノム解析においては人での下痢症等で検出されることが知られるプラストシスティスとクリプトスポリ

ジウムの存在が明らかとなっているため、詳細な解析を行った。クリプトスポリジウムについては OTU 解析の結果、人での病原性が問題となる *Cryptosporidium parvum* と推定されたが、コンベンショナル PCR 法とサンガーシーケンス法による解析の結果、エゾシカからは *C. parvum* は検出されず、*Cryptosporidium deer genotype* 等が主体であり、人への病原性野観点からは問題とされない種であった。したがって、エゾシカのクリプトスポリジウムについては、食品衛生リスク要因としては考慮必要性が低いことが示唆された。プラストシスティスについては現在のところ人の症例からは検出されていないサブタイプ 14 のみが検出された。また、培養法に本原虫を実際に分離検出可能であったことから、エゾシカがプラストシスティスの宿主として存在していることは確実であると考えられる。プラストシスティスについては今後、エゾシカ・人を含む様々な動物種のなかでどの様に維持され、どのような病原性を持つのかその詳細を明らかにすることが望ましいと考えられる。

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

食中毒で問題となる腸管出血性大腸菌についてはリアルタイム PCR 法により 350 サンプル中、約 15% が明確に陽性を示した。VT 陰電子のサブタイピングの結果、VT1 と VT2 の両サブタイプが検出された。腸管出血性大腸菌の陽性個体については、研究代表者所属機関である帯広畜産大学の山崎准教授との共同研究により、菌株の分離実験を実施した。リアルタイム PCR 法によるスクリーニングで陽性を示した糞便サンプルのうち、

約60%程度から実際にEHECを分離培養することができた。O抗原型解析の結果、極めて多様なO抗原型のEHECが存在することが明らかとなった。宮崎大学・井口准教授らの2016年食品衛生動物学会大会等での報告によると、本州ニホンジカでの同様の解析では、分離されるO抗原型は限定的であることが示されている。この結果と比較すると、北海道十勝地方において多様なO抗原型が検出されることは、際だった特徴であり、今後日本の各地方との比較調査の実施が望まれるところである。エゾシカにおいて比較的高率に腸管出血性大腸菌が陽性となったことは、直接的なエゾシカの食利用以外にも農作物の汚染等についても考慮する必要があることが考えられる。家畜は一般的に管理された特定箇所での飼育されているため、家畜の糞便由来の病原体は家畜飼育場所以外に拡散しないよう、一定のコントロールがなされている。しかしながら、野生動物であるエゾシカはそのような制限を有しないため、糞便を多種多様な場所にまき散らすこととなる。事実、十勝地方においては農作物を荒らすことからエゾシカは有害鳥獣とされており、その姿を繁茂に畑で見ることが出来る。したがって、エゾシカの糞便による農作物への腸管出血性大腸菌の汚染は容易に起こりえると考えられ、特に生食の対象となる野菜等の衛生管理は重要であると考えられる。以上のことから、エゾシカの保有する腸管出血性大腸菌の疫学については、十勝地方だけでなくより広範囲に、その詳細を明らかにすることが重要であると考えられる。

E. 結論

食中毒関連病原体の疫学調査においては、多くの個体が住肉胞子虫・肝蛭を保有しており、従来情報どおりエゾシカ刺し、レバ刺し等の生食は危険であることが再確認された。高率で腸管出血性大腸菌が陽性となった結果は、エゾシカにおける腸管出血性大腸菌汚染の更なる詳細な解析の必要性を示唆するものであった。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Madoka Ichikawa-Seki, Tomoko Shiroma, Tatsuya Kariya, Ryo Nakao, Yuma Ohari, Kei Hayashi, Shinya Fukumoto. Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan. *Parasitology International*, 2017, 66:519-21

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

2. 学会発表

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

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

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

(4) 佐藤浩庸、平谷寛樹、福本晋也、山崎朗子、入江隆夫、松尾加代子、吉田彩子、鎌田洋一、関まどか、リコンビナント Cathepsin L1を抗原としたELISAを用いたエゾシカにおける肝蛭症の血清学的調査

(第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島
県鹿児島市鹿児島大学郡元キャンパス、
2017年9月13日-15日)

(5) 森下雄貴、白水貴大、瀧藤摩美、山崎
栄樹、福本晋也、北海道十勝地方のエゾシ
カにおける腸管出血性大腸菌保有状況の
調査(第38回日本食品微生物学会学術総会、
徳島県徳島市あわぎんホール、2017年10
月5日-6日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し

2. 実用新案登録
該当無し

3. その他
該当無し

別紙 4

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
該当無し							

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
Madoka Ichikawa-Seki, Tomoko Shiroma, Tatsuya Kariya, Ryo Nakao, Yuma Ohari, Kei Hayashi, <u>Shinya Fukumoto</u>	Molecular characterization of <i>Fasciola</i> flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan.	<i>Parasitology International</i>	66	519-21	2017
Shibata, S., Sivakumar, T., Igarashi, I., Umeyama-Shirafuji, R., Inokuma, H., <u>Fukumoto, S.</u> Yokoyama, N.	Epidemiological survey of a cervine <i>Theileria</i> in wild deer, questing ticks, and cattle in Hokkaido, Japan.	<i>Ticks Tick Borne Diseases</i>	In press		2018