

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全性確保推進研究事業

「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究」

令和2年度 総括研究報告書

研究代表者 高 井 伸 二
北里大学獣医学部

令和3（2021）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究 「研究の総括」	高井 伸二
-----	1

II. 分担者・協力者の研究報告

1. 野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況に関する研究	前田 健
-----	18
2. 野生鳥獣が保有する病原体（寄生虫）の汚染状況に関する研究 「わが国に分布する旋毛虫 <i>Trichinella</i> T9 の殺滅に有効な加熱条件の検討」 「北東北3県のクマおよびイノシシにおける旋毛虫の寄生状況調査」 「イノシシの筋肉から検出した肺吸虫幼虫とイノシシの感染源に関する検討」	杉山 広
-----	31
3. わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された枝肉の拭き取り調査	壁谷 英則
-----	41
4. 食品製造や調理段階における食品リスクの軽減に関する研究 「猪肉製品における真菌酵母菌叢の探知に向けた研究」 「低温加熱処理を通じた E 型肝炎ウイルスの不活化条件検討に関する研究」	朝倉 宏
-----	55

「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究」

研究代表者 高井 伸二（北里大学獣医学部 教授）

研究要旨 野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況、処理施設における解体処理工程での微生物汚染防止、食品製造や調理段階における食品リスクの軽減に関する研究を目的として、令和2年度は4つの研究事業を展開し、以下の成果を得た。

「1. 野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況に関する研究（前田 健）」では、E型肝炎ウイルスに対する抗体保有状況およびE型肝炎ウイルス感染状況の調査をイノシシおよびシカにおいて実施した。これまでに15県のイノシシ2,363頭と13道県のシカ1,822頭を調査した。その結果、イノシシにおいては360頭（15.2%）が抗体陽性であった。一方、シカにおいては1頭（0.1%）が陽性であった。遺伝子検出に関しては、イノシシ1,471頭中25頭（1.7%）、シカ1,380頭中1頭（0.1%）が陽性であった。イノシシにおける抗体陽性率に関しては、性別における違いは認められなかったが、体重が30kg以下の個体は有意に陽性率が低かった。一方、遺伝子検出率は30kg以下の個体が有意に高かった。このことは、30kg以下の個体がE型肝炎ウイルスに感染していること、すなわち、子猪がHEVを保有しているリスクが高いことが示された。また、培養細胞に馴化した増殖性の速いHEV株の作出にも成功した。マダニ媒介性感染症で致死率が極めて高い重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルスのイノシシとシカにおける感染リスクを調査した結果、15府県のイノシシ2,110頭中12県の626頭（29.7%）、28道府県のシカ3,443頭中23府県の864頭（25.1%）から抗SFTSウイルス抗体が検出された。狩猟者はHEVのみならずSFTSVに関しても注意が必要である。

「2. 野生鳥獣が保有する病原体（寄生虫）の汚染状況に関する研究（杉山広）」

わが国で発生した旋毛虫食中毒の原因物質である *Trichinella* T9 の幼虫に対して、75℃で1分間以上の加熱（厚労省が野生鳥獣の安全な喫食に求める条件）を直接的に加えた上で、好適終宿主のマウスに経口投与したところ、一部の幼虫はマウスに感染するとの結果が得られたことから、この成績を追試験した。その結果、同様の実験系では同じく本虫のマウスへの感染性が完全には消失しないことが追認された。本虫の幼虫に対して直接的に加熱するのではなく、肉の調理法と同様の条件で虫体に熱を加えて耐性を検討し、野生鳥獣の喫食による旋毛虫食中毒の予防法を確認する必要があることが示された。

北東北3県で捕獲されたツキノワグマ22頭について旋毛虫の寄生状況を調べたところ、岩手県で2020年12月に捕獲されたツキノワグマ1頭の舌から、旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫が検出された。その他の検体は旋毛虫陰性であった。また秋田県から提供を受けたイノシシの検体・5件も同様に検査したが、旋毛虫陰性であった。

肺吸虫症は現在も症例報告が続く重要な寄生虫症で、淡水産のカニやイノシシ肉が感染源となる。今回の調査検討により、鹿児島県産だけでなく大分県産のイノシシの筋肉からも、ウエステルマン肺吸虫の幼虫が検出された。鹿児島県では、陽性イノシシが生息する地区の河川から、本虫のメタセルカリア陽性のサワガニとモクズガニが採集され、イノシシへの感染源にな

っていると考えられた。

「3. 処理施設における解体処理工程での微生物汚染防止に関する研究（壁谷英則）」

令和2年度は、過年度から引き続き、わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された鹿、ならびに猪枝肉の枝肉拭き取り調査を実施した。さらに、本研究事業最終年度であることから、本研究期間中に実施した全ての拭き取り検査材料の成績を集計し、枝肉の衛生状態に影響を与える処理工程における要因を検討した。わが国の野生鳥獣肉処理施設のうち、鹿5施設（新規2施設）、猪3施設でそれぞれ処理された洗浄前の鹿枝肉59検体、および猪枝肉計9検体について、それぞれ胸部、および肛門周囲部から拭き取りを実施し、一般細菌数、大腸菌群数、大腸菌数、および黄色ブドウ球菌数を計測した。

その結果、1)「剥皮」と「内臓摘出」の作業順別では、鹿および猪において、「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理されたものは、「内臓摘出」→「剥皮」の順に処理されたものに比べ有意に高度に一般細菌が検出された。2)猪では、剥皮時に「のせ台」を用いた場合には、懸吊する場合に比べ、全ての指標細菌が多く検出された。わが国の野生鳥獣肉処理施設A、Bで処理された鹿計5頭について、各処理工程における作業員、器具、と体等から拭き取りを行い、衛生指標細菌数を計測した。その結果、①主要な細菌汚染源は、蹄、肛門周囲、胃内要物、剥皮・内臓摘出時の手指、ナイフであること、②表皮洗浄は菌数減少に効果的であること、③大腸菌は肛門周囲の他、蹄からも検出されることが明らかとなった。

わが国の野生鳥獣肉処理施設Aで処理され、熟成した鹿枝肉について、熟成前後の衛生指標細菌数の計測と、病原細菌の検出を行ったところ、熟成により一般細菌数は増加したが、有意差は認められなかった。検討した全ての病原細菌は分離されなかった。以上のことから、本研究で対象とした施設Aにおいては、衛生的な解体処理、ならびに熟成処理が行われているものと考えられた。

「4. 食品製造や調理段階における食品リスクの軽減に関する研究（朝倉 宏）」

食肉を含む食品や食品加工・製造環境には真菌が多く存在し、異常増殖を呈した場合には、異味・異臭等を伴う腐敗を齎すことが知られる。特に熟成工程では真菌・酵母の増殖は不可避であり、そのリスク管理の在り方を検討する上では汚染実態の把握は欠かせない。利活用が推進されるジビエ食肉での真菌酵母汚染実態の多くは不明であることから、今後の効率的な真菌調査の実施に向けて、本年度は猪肉製品におけるハイスループットな真菌叢解析手法の確立に関する検討を行った。猪肉製品計25検体を対象として、従来手法である培養法、及び次世代シーケンス手法（NGS法）による真菌叢解析を実施し、両者の成績を比較した。その結果、従来の培養法に比べ、NGS法は簡便かつ難培養性の菌種であっても検出される効果的な手法であることが示されたほか、供試検体では酵母の占有率が極めて高く、*Malassezia*属菌等の医真菌学上必要な真菌種も高率に分布する特徴が明らかとなった。今後、本手法の活用により、真菌酵母汚染に関する実態把握をジビエ食肉の種別毎に把握することで、危害要因分析の充実に資するほか、リスク管理方法の妥当性評価、並びにジビエ食肉加工従事者の健康被害防止等に波及することが期待される。

昨年度より、猪肉製品を用いた添加回収試験により、E型肝炎ウイルスの不活化に関する検討を開始した。本年度は、昨年度未検討の低温加熱条件によるE型肝炎ウイルスの不活化効果を検討すると共に、「厚生労働省 食肉の加熱条件に関するQ&A」で示される低温加熱処理を通じたE型肝炎ウイルスの感染力価を求めることで、供試した低温加熱条件の妥当性を評価することとした。まず、スチームコンベクションオーブンをを用いて猪肉を低温加熱調理（70℃3分、69℃4分、67℃8分、66℃11分）に供した際のE型肝炎ウイルスの不活化をリアルタイムPCR法により評価したところ、陽性対照（非加熱群）では平均 2.68×10^6 コピー数の同ウイルス遺伝

子が検出されたのに対し、供試した全ての低温加熱群では RNase 処理後には同ウイルス遺伝子は検出されず、これらの加熱条件は概ね 10^4 コピー以上の同ウイルス不活化効果を示したことが想定された。また、低温加熱処理後の E 型肝炎ウイルス懸濁液を Alexander 細胞に接種し、4 週間培養したところ、全ての加熱処理群から同ウイルス遺伝子は検出されず、また、蛍光免疫染色によってもウイルス抗原が検出されなかったことから、供試した低温加熱処理により E 型肝炎ウイルスは生残性を喪失したと考えられた。猪肉における E 型肝炎ウイルスのように、病原微生物汚染実態については定量性をはじめ、依然として不明な点が多いため、定性・定量の両面から汚染実態に係る更なる情報の蓄積が必要と考えられる。また、野生鳥獣肉の加工・調理にあたっては、一定時間から成る塩蔵やマリネ等の前処理が行われる場合もあることから、こうした加工調理工程を通じた微生物の挙動についても安全性確保の観点から更に検討を進める必要がある。

尚、研究成果の詳細は、それぞれの担当者の研究報告書（後出）に譲る。

研究組織

研究代表者

高井 伸二 北里大学獣医学部

研究分担者

前田 健 国立感染症研究所
壁谷 英則 日本大学生物資源科学部
杉山 広 国立感染症研究所
朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者

安藤 匡子 鹿児島大学獣医学部
岡林 佐知 新薬リサーチセンター (株)
宇根 有美 岡山理科大学獣医学部
立本 完吾 山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室
Milagros Virhuez Mendoza 山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室
森田 聡志 日本大学生物資源科学部
山原 絹子 日本大学生物資源科学部
石井 香菜 日本大学生物資源科学部
鈴木 綾乃 日本大学生物資源科学部
田中 裕梨 日本大学生物資源科学部
森嶋 康之 国立感染症研究所寄生動物部
村上 正樹 国立感染症研究所寄生動物部
常盤 俊大 日本獣医生命科学大学獣医学部獣医寄生虫学研究室
笹森 公人 青森県深浦町農林水産課
金萬 誠志 秋田県生活環境部自然保護課
山口なつみ 秋田県山本地域振興局農林部
小林 勝 秋田県雄勝地域振興局農林部
小林 直樹 麻布大学生命・環境科学部
伊澤 和輝 東京工業大学大学院
八木 欣平 北海道立衛生研究所
池田 徹也 北海道立衛生研究所
入江 隆夫 宮崎大学農学部
米満 研三 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
平井 和也 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
山田 研 学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
秋元 真一郎 学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
迫井 千晶 学校法人辻料理学館辻調理師専門学校

A. 研究の目的

近年、ニホンジカやイノシシなど野生動物の生息数が急速に増加したことから、自然生態系・農林水産業・生活環境への被害が深刻となっている。一方で捕獲鳥獣のジビエ利用は大きな可能性を秘めており、外食や小売等を始め利活用が拡大している。野生鳥獣肉の衛生管理は食品衛生法に基づき、条例に則した自治体の「ジビエ衛生管理ガイドライン・衛生マニュアル」によって指導されてきたが、国は野生鳥獣肉に関する一定の衛生管理レベルの確保を目的に、2014年秋にガイドラインを策定し、狩猟者・食肉処理業者・飲食店・販売店が守るべき衛生措置を明示した。しかし、捕獲（供給現場）から処理・加工・調理・需要（消費）の各段階において、科学的根拠に基づいた捕獲者・処理者・消費者の安全性（人獣共通感染症のリスク）とジビエの食としての衛生管理技術に関する情報・知見の蓄積は十分ではない。適切な処理技術を有する狩猟者・処理施設従事者・事業者の養成、流通・消費段階における食肉としてのジビエの基礎知識の普及などが喫緊の課題である。

本研究では、1) 野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況に関する研究、2) 処理施設における解体処理工程での微生物汚染防止に関する研究、3) 食品製造や調理段階における食品リスクの軽減に関する研究を、それぞれ細菌・ウイルス・寄生虫感染症と病理学の専門家、公衆衛生学の専門家、食中毒の専門家から構成される3つの研究班が、全国の協力研究者の支援を得て、3年の研究期間に、1) 全国で捕獲されたイノシシとシカにおける病原体汚染状況調査、2) 狩猟・捕獲・解体の際に発生する様々な人獣共通感染症の病原体（細菌・ウイルス・寄生虫）ならびに抗体保有状況の調査、3) 異なる処理方法を実施する施設で処理された枝肉の衛生状態の調査、並びに熟成処理された鹿肉の精製状態、4) 食品製造や調理段階における衛生管理実態の把握を真菌酵母に焦点を絞って検討し、低温加熱調理法に伴う微生物消長の定量的検証を行う。その成果として、1) 全国規模の病原体保有状

況の把握、2) 狩猟者、解体処理者のバイオセキュリティ、3) カラーアトラスの充実、4) 処理施設の衛生管理指針の充実、5) ジビエ肉の加工調理ガイドライン等の提供が可能となる。

B. 研究方法

令和2年度の研究方法の概要は以下の通りである。

1) 平成30-令和2年度の3年間は過去6年間の情報収集を補完する形で全国調査を展開する。特に野生動物の死因に関する情報は少なく、診断ネットワークを構築した。さらに、野ウサギ、アナグマ、クマ、野鳥等、食用の可能性が高い動物における感染症調査も開始した。令和2年度は、血清試料として日本各地より狩猟および有害鳥獣として捕獲された野生獣から回収した。その血清サンプルから抗HEV抗体とHEV遺伝子並びに抗SFTSウイルス抗体検出を行った（前田）。

2) 野生獣における異常所見の収集を処理施設に依頼し、イノシシおよびシカの解体の際に異常所見が認められた場合、写真撮影と材料採取をお願いし、病理組織学的検索も実施した（前田、安藤、岡林、宇根）。

3) HEVの細胞馴化：遺伝子型3の13代継代したG3-HEV83-2-27株をヒト肝がん由来培養細胞Alexander細胞（PLC/PRF/5細胞）へ感染させ、2%FCS加培地を1週間に2回培地の半分を交換しながら感染細胞を維持した。2年半かけて、合計20代の継代に成功し、P34ウイルスとした。

4) わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因*Trichinella* T9を用いて、本虫の感染性を消失させる加熱条件（75℃で1分間）を、マウスモデルを用いた感染試験で検討した。北東北3県で捕獲されたツキノワグマ22頭の舌について旋毛虫の寄生状況を旋毛虫検査キット（PrioCHECK *Trichinella* AAD, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ, 米国）を用いて検索した。線虫の幼虫が検出された場合は、幼虫の形態学的特徴の詳細、特に食道における食道腺細胞（ステイ

コサイト)の有無を確認した。形態観察のあと、幼虫からDNAを調製し、リボソームDNAのITS2領域を対象とする既報のプライマーペア(Kanai et al, 2006)でPCR増幅した。鹿児島県と大分県で捕獲されたイノシシ(それぞれ24頭と6頭)から肺吸虫幼虫の検出を試みた。鹿児島県阿久根市で、イノシシへの肺吸虫の感染源となる淡水産カニを採集し、肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を調べた(杉山)。

5) わが国の野生鳥獣肉処理施設において処理された鹿肉や猪肉の拭き取り検体を用いて、衛生指標細菌(一般細菌、大腸菌群、大腸菌、ならびに黄色ブドウ球菌)数を計測して衛生状態を評価した。さらに、異なる条件で解体処理された枝肉の衛生状態に関わる要因を検討した。さらには、わが国の野生鳥獣肉処理施設Aで熟成処理された猪肉を用いて、熟成前後における衛生状況を検討した。令和2年度は2019年6月~2021年2月の間に、鹿20施設、猪20施設で処理された鹿枝肉224検体、猪枝肉計99検体について実施した。(壁谷)。

6) 真菌酵母による汚染が食品を介したヒトへの健康被害リスクとなりうる可能性を探索するための手法構築を目的として、一般流通する猪肉製品25製品を購入収集し、次世代シーケンシング法(以下、NGS法)による真菌叢解析を実施した。更に、低温加熱調理を通じた、猪肉におけるE型肝炎ウイルスの生残性について検討した。本年度は、昨年度未検討であった加熱条件(70°C3分、69°C4分、67°C8分、66°C11分)についての同ウイルスに対する不活化効果を評価した(朝倉)。

倫理面への配慮

イノシシ・シカに関しては、狩猟期に捕獲あるいは有害鳥獣として捕獲されたものについて調べた。

検出された微生物の中には、野生動物が自然感染しており、ヒトへの病原性が認められる可能性がある場合があるが、その微生物の最終同定を行い、その不活化方法もしくは安全な可食部分の採取方法について適切なマニ

ュアルを確立するまでは、情報の取扱いに留意し、協力機関において、風評被害等の影響が出ないように配慮した。

C. 研究成果

研究は4名の分担研究者と27名の研究協力者並びにそれぞれの所属機関のご厚意によって実施された。

「1.野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況に関する研究(前田 健)」

1)イノシシにおける抗HEV抗体保有率

日本全国15県のイノシシ2363頭中360頭が抗HEV抗体陽性となり陽性率は15.2%であった。2020年度は1県検査地域が増えた。イノシシにおいては、検査数が少ない沖縄県と青森県を除いてすべての都道府県で陽性の個体が見つかった。多くの県が20%前後の抗体陽性率であるのに対して、関東地方の千葉と群馬のイノシシは49%、42%と抗体陽性率が高かった。

2)イノシシにおける抗HEV抗体保有率

HEVに対する抗体保有率を性別で比較した結果、雄15.2%、雌19.3%の陽性率で雌雄差は認められなかった。一方、体重別で比較した結果、30kg以下の個体では陽性率が5.8%であったのに対して30kg以上50kg以下の個体では19.0%、50kgより大きな個体では24.1%であった。体重30kg前後のイノシシがHEVに感染し、抗体が陽転していた。

3)イノシシにおけるHEV遺伝子検出

イノシシの血清からHEV遺伝子の検出を試みた結果、1,471頭中25頭の1.7%からHEV遺伝子が検出された。特に、抗体陽性率が高い千葉県と群馬県、中程度の抗体保有率であった兵庫県、山口県、香川県、大分県で遺伝子が検出された。それ以外の抗体保有率が低程度から中程度の岐阜県、富山県、愛媛県からはHEV遺伝子は検出されなかった

4)イノシシにおけるHEV遺伝子検出

性別では雄の方が2.4%と雌の陽性率の1.2%より2倍ほど陽性率が高かった。また、

体重別では 30kg 未満で 3.6%、30-50kg で 1.5%、50kg より大きい個体で 0.4%と体重が増加するにつれて陽性率が減少した。

5) シカにおける抗 HEV 抗体と HEV 遺伝子検出 :シカからの抗体検出の結果、全体では 1,822頭中 1頭(0.1%)抗体のシカが抗体陽性であることが判明した。遺伝子検出もこれまで 1,380頭調べたが 1頭(0.1%)からしか検出されていない。イノシシの陽性率に比べると依然として低いものの、シカも HEV の感受性動物であることが確認された。実際、E 型肝炎食中毒の原因食品としてシカ肉は多数報告されている。

6) 動物から検出された HEV 遺伝子の系統解析 :2020 年度は香川県のイノシシから新たに遺伝子型 3 型の HEV 遺伝子が検出された。千葉県・山口県ではほぼ毎年同じクラスターを形成するウイルスが検出された。これらは HEV が野外では維持されていることを示している。また、山口県においては下関市では遺伝子型 4 が、岩国では遺伝子型 3 のウイルスが検出され、県単位ではなく地域単位で流行しているウイルスが異なることが判明した。

7) 迅速診断のための HEV の細胞馴化

分与ウイルスは Alexander 細胞で 13 代継代したものであったが、感染後 28 日目ようやく 25 サイクルの PCR でバンドが検出された。Real-time PCR でも感染後 21 日目に検出されるのみであった。最初の頃は 6 週間に 1 回の継代などを繰り返し、2 年半で 20 回の継代に成功した。その過程で、P13 から P17 のウイルスは 25 サイクルの RT-PCR で検出されるのは、感染後 28 日であったが、P18-P30 は感染後 21 日、P31-34 は感染後 14 日目に検出されるようになった。感染後 7 日目に検出されるウイルス株樹立を理想としたが、これ以上は難しいと判断し、20 代継代を加えた P34 で解析を進めることとした。P34 と P15 の Alexander 細胞での増殖性を定量 RT-PCR で比較した結果、P34 では 7 日目より 10^4 コピー/mL のウイルスが検出された。一方、P15

では 14 日目までウイルスは検出されなかった。馴化によるウイルスへの影響を比較した結果、カプシド蛋白の P ドメインに集中的に変異が観察された。この領域が培養細胞での増殖に重要である可能性が示唆された。

8) シカ・イノシシにおける抗重症熱性血小板減少症候ウイルス (SFTSV) 抗体保有率の再評価:イノシシ及びシカの SFTSV 感染状況を ELISA により継続調査してきたが、ウイルス中和試験と ELISA との比較により、ELISA 試験にはかなり非特異反応が認められることが確認された。より詳細な解析により、これまで 0.5 と設定していた Cut-off 値をシカで OD 0.390、イノシシで OD 0.160 と設定することが最適であることが示された。これまでの検査結果を全て評価し直した。その結果、流行地と考えられていた山口県でも徐々に陽性率が上昇していることが認められた。そして、山口県の 2015 年以降の陽性率は 80%となり、ほぼすべてのシカが感染していることが明らかとなった。イノシシもシカに比べれば陽性率は低い、シカと同様に陽性率の上昇が観察された。山口県で 2012 年に国内初の SFTS 患者が報告されたが、陽性率が上昇し始めた時期と一致しており、SFTS のヒトでの発生は、野生動物で流行し始める時期と一致していることが明らかとなり、野生動物での調査がヒトへのリスクを知る上で極めて重要であることが明らかとなった。

9) シカにおける抗 SFTSV 抗体保有率

28 道府県のシカ 3,443 頭の抗 SFTSV 抗体保有率の調査で、23 府県のシカ 864 頭に陽性が認められ、全体では 25.1%のシカが陽性であった。一方、北海道、岩手、福島、栃木、群馬は陰性であった。宮崎、山口、広島、島根、和歌山県では 50%以上のシカに陽性が認められた。また、千葉、兵庫、愛媛、高知では 20%以上の陽性個体が見られ、西日本で陽性率が高いこと、東日本にも陽性率が高い地域が存在することが明らかとなった。

陽性率において、雌雄差 (雄 26.7%、雌

23.3%) は認められなかったものの、体重が重い 30kg 以上の個体で高い陽性率 (25.3%) が認められている。関東で陽性率が高い千葉県での推移を比較した結果、2016 年以降約 20%、2018 年以降 30%以上の陽性率となり、シカでの感染率が上昇していることが明らかとなっている。

10) シカにおける SFTSV 遺伝子検出

これまで 6 県 470 頭のシカから SFTSV の遺伝子検出を試みたが、陽性個体は認められていない。

11) イノシシにおける抗 SFTSV 抗体保有率

15 府県のイノシシ 2,110 頭の血清から抗 SFTSV 抗体の検出を試みたところ、12 県の 626 頭(29.7%)から抗 SFTSV 抗体陽性が認められた。10 頭以上の検査が実施された県では、熊本県で 71.4%、山口、和歌山、香川、大分、愛媛で 20%以上の陽性率となっている。一方、栃木、千葉、岐阜、富山では低い陽性率となった。イノシシにおける性別 (雄 31.3%、雌 31.25)、体重別 (30kg 未満 31.1%、30-50 kg 30.4%、50kg より大きい個体 32.5%) で有意な差は認められなかった。

12) イノシシにおける SFTSV 遺伝子検出

これまで 9 県 615 頭から SFTSV 遺伝子の検出を試みたところ、香川県と愛媛県のイノシシから SFTSV 遺伝子が検出された。全体の陽性率は 0.3%と非常に低く、愛媛県や香川県でも 1%であり、イノシシでの陽性率は低い。

13) イノシシとシカにおける異常所見の収集：異常個体について研究協力者から継続的に収集し、カラーアトラスの内容の充実に努めた。また、新たな構成でのアトラス構成についても検討した(前田、安藤、岡林、宇根：別添)。

「2. 野生鳥獣が保有する病原体 (寄生虫) の汚染状況に関する研究 (杉山広)」では、

1) わが国に分布する旋毛虫 *Trichinella* T9 の殺滅に有効な加熱条件の検討：(1) 加熱処理群 (群 1：75℃で 1 分間の加熱) で旋毛虫

幼虫が検出された。検出虫体数は 1 頭平均にすると 176 隻であった。(2) 非加熱処理群 (群 2：陽性対照) においても旋毛虫幼虫が検出された。検出虫体数は 1 頭平均にすると 9,640 隻であった。

2) 北東北 3 県のツキノワグマにおける旋毛虫の幼虫寄生状況調査：岩手県紫波郡紫波町で 2020 年 12 月に捕獲されたツキノワグマ(雌、年齢不詳) の舌から旋毛虫幼虫が検出された (写真 1)。検出された虫体には、いずれも食道腺細胞 (スティコサイト) が縦列して連続するステイコゾーム構造が明らかであった。検出虫体を用いた分子同定の結果、この幼虫はわが国固有の旋毛虫種である *Trichinella* T9 と同定された。一方、青森県の 4 検体および秋田県の 16 検体、さらに岩手県の残りの 1 検体は、旋毛虫の幼虫陰性であった。秋田県のイノシシからの旋毛虫幼虫検出の試みたところ、今回検査した 5 頭のイノシシの舌検体は、旋毛虫の幼虫陰性であった。

3) イノシシからの肺吸虫幼虫の検出

鹿児島県では検査した 24 検体のうち 6 検体から、肺吸虫の幼虫が計 11 隻検出された。大分県では検査した 6 検体のうち 3 検体から、肺吸虫の幼虫が計 6 隻検出された。虫体はいずれも体長が 1~2mm で、検出時には生理食塩水中で伸縮しながら活発に運動した。これらの虫体は ITS2 領域のシーケンシングの結果、すべてウェステルマン肺吸虫と同定された。さらにミトコンドリア DNA・16S リボソーム DNA のシーケンシング結果から、鹿児島県から検出されたウェステルマン肺吸虫はすべて 3 倍体型で、大分県から検出されたウェステルマン肺吸虫はすべて 2 倍体型であることが明らかになった。

淡水産カニからの肺吸虫メタセルカリアの検出を試みたところ、鹿児島県阿久根市で採集されたサワガニは 941 匹で、15 匹 (寄生率 1.6%) から合計 24 個の肺吸虫メタセルカリアが検出された。モクズガニは 95 匹が採取され、21 匹 (22%) から合計 84 個のメタセルカリア

アが検出された。これらのメタセルカリアは、すべてウェステルマン肺吸虫の3倍体型と分子同定された。

「3. 処理施設における解体処理工程での微生物汚染防止に関する研究（壁谷英則）」

1) わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された枝肉の拭き取り調査：本研究で対象とした施設（鹿 21 施設、猪 20 施設）では、それぞれ「剥皮」と「内臓摘出」の順番が異なるものであった。鹿では、21 施設中 16 施設で、「剥皮」→「内臓摘出」の順で作業していたが、5 施設は「内臓摘出」→「剥皮」の順であった。これに対して、猪の処理では、20 施設中 12 施設で、「剥皮」→「内臓摘出」の順、8 施設は「内臓摘出」→「剥皮」の順であった。

剥皮時のと体は、鹿は全て懸吊していたが、猪では、のせ台、懸吊、および湯剥ぎの施設がそれぞれ 4 施設であった。また、剥皮方法は、鹿では、ウィンチによる牽引が 5 施設、手剥ぎが 6 施設であったが、猪では、1 施設を除き、全て手剥ぎであった。

洗浄前において、鹿と猪の枝肉胸部・同肛門周囲部、における一般細菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数について Mann-Whitney U 検定した。剥皮と内臓摘出の作業順別に枝肉洗浄前の鹿胸部、肛門周囲部における各衛生指標細菌数の中央値を比較した結果、肛門周囲部の一般細菌数において、「剥皮」→「内臓摘出」では、「内臓摘出」→「剥皮」に比べ、有意 ($p<0.01$) に高値であった。一方、猪でも「剥皮」→「内臓摘出」は胸部、肛門周囲部において有意 ($p<0.01$) に高い値となった。黄色ブドウ球菌数はいずれの作業順においても有意差は認められなかった。

剥皮時に、枝肉を「のせ台」に乗せて剥皮する施設と、「懸吊」して剥皮する施設に分けて、猪枝肉の洗浄前の胸部;肛門周囲部における一般細菌数・黄色ブドウ球菌の中央値を比較した結果、「のせ台」で処理した枝肉の肛門周囲部は、「懸吊」のそれに比べ、有意 ($p<0.01$)

に高値であった。一方、鹿では、検討した全ての施設において、「懸吊」により剥皮を行っていたため、比較はできなかった。

剥皮時に、「ウィンチ」を使用する施設と、「手剥ぎ」により実施する施設に分け、鹿枝肉の洗浄前の胸部；肛門周囲部における一般細菌数・大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌の中央値を比較したところ、「ウィンチ」に対し、「手剥ぎ」では有意 ($p<0.01$) に低値を示した。一方、猪では、胸部;肛門周囲部における一般細菌数の中央値は、「ウィンチ」「湯剥ぎ」に比べ、「手剥ぎ」は有意 ($p<0.05$) に低値を示した。「湯剥ぎ」の大腸菌群は他に比べ有意 ($p<0.05$) に高い値を示した。

2) 処理工程における拭き取り検体を対象とした衛生指標細菌数

「止め刺し現場」、施設 B で拭き取り検査を実施した。「表皮洗浄前・後」の「蹄」、「腹側正中」、「肛門周囲部」・「胃内容物」の一般細菌数・大腸菌数を比較した。

「剥皮後」と「内臓摘出後」の「作業者の手指」と「ナイフ」の一般細菌数・大腸菌数を比較した。「枝肉洗浄前・後」の「床」「壁」「胸部」「肛門周囲部」の一般細菌数・大腸菌数を比較した。詳細は各論に記載する。

3) 野生鳥獣由来熟成肉の衛生評価

「熟成前・後」の一般細菌数・大腸菌数を比較したところ有意差は認められなかった。また、検討した全ての検体から病原細菌は分離されなかった。

「4. 食品製造や調理段階における食品リスクの軽減に関する研究（朝倉 宏）」

では、1) 培養法による真菌分布実態解析

猪肉製品供試検体を培養法で真菌酵母分布状況検討したところ、全検体で酵母が総真菌数に対して、大きな比率を占め (73.6-100%)、総真菌数が多い検体ほどこの傾向は顕著であった。産地や部位、形状による菌数分布傾向に差異は認められなかったものの、同一事業

者由来の製品検体間では菌数分布は概ね一致を示した。真菌が非検出の検体または非常に少ない (<10 cfu/g) の検体は全体の 44% を占めた。高い菌数分布を示した検体は冷凍前段階で高い汚染菌数であった可能性が考えられた。

2) NGS 法による真菌酵母菌叢解析結果

計 25 検体の DNA 抽出物を鋳型として、ITS 領域を増幅するための PCR 反応に供した結果、7 検体からのみ約 100-800 bp の増幅産物が得られた。PCR 増幅が認められなかった検体の多くは付着真菌酵母数が元来少なかったためと想定された。

次に NGS 法により得られた真菌酵母菌属の存在比率を比較したところ、加工施設環境或いは同環境での作業工程が真菌叢を決定づける一因である可能性が示唆された。全検体で酵母が占める割合は 58.4-97.6% と非常に高かった。この傾向は培養法の結果と概ね一致し、従来手法である培養法との間での相関性を裏付ける結果と捉えられた。

検出された真菌属のうち、酵母類としては、*Naganishia* 属菌、*Kurtzmonia* 属菌及び *Debaryomyces* 属菌等環境に広域に分布し、水、土壌、植物、魚肉、家畜肉等からの検出報告のある酵母菌属が高い占有率をもって検出された。また、*Malassezia* 属菌、*Candida* 属菌、*Cryptococcus* 属および *Trichosporon* 属菌といったアレルギーや感染症を引き起こす医真菌学上重要な酵母も 50-100% と高頻度に検出され、中でも *Malassezia* 属菌および *Candida* 属菌は占有率が高い傾向にあることが確認された。真菌については、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属といった通常環境に多く分布する真菌や、昨年度までの調査結果において猪肉解体加工施設環境から多く検出された *Cladosporium* 属菌は、37.5-62.5% の頻度で検出されたが、菌叢全体に占める占有率は低い状況にあったため、これらの真菌が猪肉表面において異常発育した可能性は低いと考えられた。

3) 低温加熱調理を通じた E 型肝炎ウイルスの生残性に関する遺伝学的評価

「厚生労働省 野生鳥獣肉に関する Q&A」で示される低温加熱調理条件のうち、昨年度未検討であった条件 (70°C3 分、69°C4 分、67°C8 分、66°C11 分) による E 型肝炎ウイルスの消長を評価した。RNase 処理後の陽性対照 (非加熱群) における E 型肝炎ウイルスの遺伝子コピー数は 2.68×10^6 であったのに対し、上記の 4 条件で低温加熱調理を行った検体では、何れも同ウイルス遺伝子が検出されなかった。

4) 低温加熱調理を通じた E 型肝炎ウイルスの生残性に関する生物学的評価

上述の加熱条件に加え、「厚生労働省 野生鳥獣肉に関する Q&A」で示される低温加熱調理条件で処理を行った検体懸濁液を Alexander 細胞に接種し、28 日間培養を行った。その後、培養上清及び細胞中の RNA 抽出し、リアルタイム PCR 法に供したところ、陽性対象 (非加熱群) は上清・細胞中よりそれぞれ 2.4×10^4 コピー/反応、 1.8×10^6 コピー/反応として検出されたが、低温加熱処理検体を接種した群はいずれも同ウイルス遺伝子不検出を示した。加えて、培養 14 及び 28 日後に免疫蛍光染色法によるウイルス抗原の検出を試みたところ、全ての低温加熱処理検体はリアルタイム PCR 法と同様にウイルス抗原は不検出となったが、陽性対象は培養 14 日後の段階であっても検出され、同法による感染力価測定が培養時間の短縮に有用となる可能性が示された。

D. 考察

「1. 野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況に関する研究 (前田 健)」

これまでの結果から、我が国における HEV の自然宿主はイノシシであり、1.7% が捕獲時にウイルスを保有しており、特に子猪が保有している可能性が高い。同じ地域において長年同じウイルスが保持されており、関東に生

息するイノシシの感染率が高い傾向にある。

SFTSVは西日本の多くのイノシシ・シカが感染しており、感染率が上昇している地域があった。東日本でも低いながらも野生動物で感染している。また、陽性率は低いながらも捕獲時に血液中にウイルスを保有しているイノシシも存在した。従って、狩猟者はイノシシの60頭に1頭(高い地域では20頭に1頭)が捕獲時・解体時にHEVウイルスを保有していること、SFTSのリスクは西日本で高いこと、患者の発生していない関東でもSFTS陽性率が高い地域が存在することなどを理解しておくべきである。

HEVは非常に培養細胞での増殖が遅く、非常に解析が困難であったが、増殖が速いHEV株の作製に成功し、後の、HEV研究に大きく貢献すると期待される。

「2.野生鳥獣が保有する病原体(寄生虫)の汚染状況に関する研究(杉山 広)」今年度の研究結果から、今回の検討の結果、わが国で旋毛虫食中毒の原因物質となった*Trichinella T9*の幼虫に75℃で1分間の加熱を直接的に加えた場合、一部の幼虫はマウスに感染し、その腸管内で雄成虫あるいは雌成虫に発育、そして雌成虫は雄成虫と交接して幼虫を産出し、その幼虫が筋肉から検出されるとの結果が追認された。今後の課題として、虫体に直接的に加熱するのではなく、喫食前の調理条件と同じように、筋肉中の虫体に例えば75℃で1分間の加熱を施し、その条件が守られているかを中心温度で確認しつつ、加熱に対する本虫の耐性を改めて検討する必要がある。旋毛虫食中毒の予防に必要な加熱の条件を、調理の現場を想定して確認する必要があると示唆されたことから、現在、その検討に向けての準備を進めている。

北東北3県で捕獲されたツキノワグマ22頭のうち、岩手県で2020年12月に捕獲されたツキノワグマ1頭の舌から、旋毛虫*Trichinella T9*の幼虫が検出された。岩手県のツキノワグマに旋毛虫*Trichinella T9*の幼虫が寄生することは、2003年および2006年に捕獲されたクマ試料の検査で既に明らかにさ

れていたが、同県のクマには現在も本虫の寄生が継続していることが明らかとなった。しかもクマから検出された旋毛虫の種類は*Trichinella T9*の幼虫であり、加熱に対してある程度の耐性を有する。クマ肉の喫食にあたっては十分加熱するように啓発を強化する必要がある。

わが国の野生動物からの旋毛虫検出に関しては、クマ(ツキノワグマおよびヒグマ)以外からも報告がある。動物種および検出された地域は、キツネ(北海道)、タヌキ(北海道、山形県)、アライグマ(北海道)である。山形県に隣接する秋田県では、クマに加えて、イノシシの試料提供も受け、旋毛虫の検査を試みた。しかし検体数が5件に留まったこともあり、検査結果は総て陰性であった。イノシシとシカは東北地方でも、野生鳥獣として肉の積極的な利用が図られている。今後も検査材料の提供を要請し、旋毛虫の寄生状況についての検査を継続する予定である。

今回の肺吸虫の検討により、鹿児島県(3倍体型)と大分県(2倍体型)には異なる染色体型のウェステルマン肺吸虫が分布して、イノシシに感染していることが分かった。鹿児島県産だけではなく大分県産のイノシシの肉喫食によっても、ウェステルマン肺吸虫感染の危険性はある。ただし症状はイノシシの捕獲地(染色体型)により異なるので、このような詳細な情報を医療関係者に提供する必要性が示唆された。

今回の調査により、イノシシから3倍体型のウェステルマン肺吸虫が検出された鹿児島県阿久根市の流行地で、モクズガニおよびサワガニから本虫のメタセルカリアが検出された。淡水産カニを対象に、肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を調べる検査は容易であり、ジビエの安全性を保証する有用で簡便な代替法にならないか、今後は大分県のイノシシの捕獲地などでも検討したいと考えている。

「3.処理施設における解体処理工程での微生物汚染防止に関する研究(壁谷英則)」

本研究では、特に、「剥皮」と「内臓摘出」の作業順、剥皮時の設備(のせ台、あるいは

懸吊)、ならびに剥皮方法(ウィンチ、手剥ぎ、猪では湯漬け)の違いに着目し、鹿、および猪枝肉の汚染指標細菌数を比較することにより、各工程の作業順や方法が枝肉の衛生状況に与える影響について検討した。

剥皮と内臓摘出の作業順では、ガイドラインで指示されている「剥皮」→「内臓摘出」の順番と、「内臓摘出」→「剥皮」の順番でそれぞれ処理された枝肉について比較した結果、本研究では、鹿、猪ともに「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理された枝肉からは、「内臓摘出」→「剥皮」の順で処理された枝肉に比べ、一部(鹿の胸部)を除き、有意に高い一般細菌数の値を示した。これは、剥皮を先に行うことで、作業者が剥皮後の枝肉に、汚染した手指で直接、あるいは間接的に接触する機会が多くなったためである可能性がある。剥皮後に枝肉と接触することにより細菌に汚染する可能性について、改めて作業者に啓蒙する必要がある。

「のせ台」を使用して剥皮する場合には、「懸吊」して剥皮を行う場合に比べ、より高頻度に作業中に汚染した手指や表皮などを介して枝肉に細菌が汚染する可能性が考えられた。懸吊装置の導入を推進するとともに、「のせ台」で剥皮をする際には、より一層細菌汚染を回避するように意識して作業するよう、指導する必要があると考えられた。

剥皮法別の比較では、鹿、猪ともに、「ウィンチ」を用いて剥皮する方法で剥皮した枝肉は、「手剥ぎ」で剥皮したものに比べ、高度に汚染していた。「ウィンチ」を用いた場合には、剥皮の際に、表皮に汚染した土壌や細菌が舞い散る可能性が考えられ、土壌由来の細菌や、表皮に由来する黄色ブドウ球菌がより高度に汚染した可能性が考えられる。また、猪を処理する一部の施設では、「湯剥ぎ」が行われている。厳密には、「湯剥ぎ」では、剥皮されておらず、表皮は残存しており、表皮表面の被毛が取り除かれるものの、残存する表皮表面の毛穴や皮膚の小さな溝などに、細菌が残存する可能性がある。このため、「湯剥ぎ」した枝肉では、高度に一般細菌数が検出されたも

のと考えられた。

本研究により、一連の処理工程における細菌汚染源として、蹄、表皮、胃内要物、肛門周囲部が明らかとなった。また、表皮洗浄前に比べ、表皮洗浄後では、各箇所において、一般細菌数、大腸菌数の著しい減少が認められたことから、鹿や猪の解体処理施設への搬入前に、十分な洗浄を行うことの重要性が、改めて示された。また、肛門周囲部には多くの細菌が残存することを考慮しながら剥皮を行うことが重要である。さらに、剥皮作業中、ならびに内臓摘出作業中では、各作業により作業者の手指、ならびに使用したナイフ表面に多くの細菌が汚染することも確認され、各作業中の汚染ごとの温湯消毒、ならびに手指洗浄が重要であることが確認された。

糞便汚染の指標となる大腸菌については、特に肛門周囲部から多く検出されることが改めて確認された。特に蹄からも多く検出されたことから、剥皮作業前には、蹄を除去することが重要であると思われた。

本研究で対象とした施設では、4℃でおよそ2週間静置するにより熟成を行っている。熟成前後には大腸菌・病原細菌全て検出されなかったから熟成工程において病原細菌の増殖は起こっていないものと考えられた。しかし、多くの一般細菌、ならびに黄色ブドウ球菌が検出された検体も認められたことから、熟成後には十分トリミングを行う必要がある。

当該施設における熟成の条件は2℃で7~9日間処理であるが、2℃条件下でも、低温細菌の一部は増殖している可能性があり、今後、熟成前に検出された細菌叢を解析し、汚染の由来を検討する必要がある。特に食肉の腐敗に関与する *Pseudomonas* 属菌は低温細菌であり、昨年度の本研究において、今回の対象とは異なる施設で処理された枝肉から検出されている。今後、このような腐敗細菌の汚染状況について検討する必要がある。

「4. 食品製造や調理段階における食品リスクの軽減に関する研究(朝倉 宏)」
本分担研究では、猪肉製品における真菌酵母汚染実態を調査するための手法として、NGS

法の正確性を従来の培養法と比較検討したところ同一事業者由来の製品検体間では菌数分布は概ね一致し、本解析手法が猪肉製品表面に付着する真菌酵母菌叢探知手法として安定性を示すものと考えられた。

一方、今回供試した猪肉製品における真菌叢全体の傾向として、*Cladosporium* 属菌や *Aspergillus* 属菌などの解体・加工環境で高頻度に検出される真菌の占有率は低く、猪肉表面で異常増殖した可能性は低いと考えられた。今後は、チルド状態、特に熟成工程を経て二次加工・出荷される猪肉加工製品を対象とした検証を行う必要がある。また、検出真菌の一部には、作業従事者の健康被害を招き得ると想定される *Malassezia* 属菌等も含まれていた。この他、*Trichosporon* 属をはじめとして、感染性やアレルギー性のある真菌属も今回の NGS 法により高頻度に検出される実態が初めて確認された。酵母は培養法による簡易同定が概して困難であり、本研究で構築した NGS 法を、ジビエ食肉及び同施設環境における真菌・酵母の汚染実態調査へと活用することは、危害要因分析の対象として検討を進め、更に加工従事者及び消費者の健康被害予防に向けて取るべきリスク管理策の構築へと波及すると期待される。

猪肉における E 型肝炎ウイルスの汚染可能性は数多くの同動物生体における侵淫状況から示唆されている。こうした背景から、猪肉の喫食にあたっては十分な加熱調理が求められている。一方、野生鳥獣肉の調理に際しては、低温度帯での加熱調理が汎用されている実態を鑑み、本研究では猪肉を低温加熱調理した場合の E 型肝炎ウイルスの消長を評価し、結果として「厚生労働省野生鳥獣肉に関する Q&A」で示される低温加熱条件は何れも E 型肝炎ウイルスの不活化に一定の有効性を示すことが明らかとなった。

過去の文献情報では用いるウイルス株により耐熱性には差異があることも想定されるため、異なるウイルス株を用いた同様の評価を行うことも今後必要と思われる。こうした評価にあたって、最終的には生物活性である感

染力価の評価は必須と考えられるが、その評価には感染時間が長い本ウイルスの性質を考慮すると、より増殖能の高いウイルス株の調整や、高感度な評価方法の設定等が今後検討すべき事項と思われる。その意味において、本研究で見出された、免疫蛍光染色法の有用性は後者の事項に寄与するものと考えられる。

また、野生鳥獣肉の加工調理にあたっては、塩蔵やマリネ等といった前処理が行われることも多い。従って、こうした前処理過程を通じた病原微生物の動態についても今後精査することが、総合的な生物的危害要因の制御にあたって求められる科学的知見になるものと考えられる。

E. 結論

1. ①15 県のイノシシ、13 道県のシカの E 型肝炎ウイルス抗体並びにウイルス遺伝子調査から、体重 30 kg 以下のイノシシのウイルス保有率が高く、狩猟・解体時の血液の飛散に注意する必要がある。②SFTS の野生動物における分布は 15 県中 12 県が陽性となったが西日本中心ではあり、中国・四国・九州では陽性率が高かったが、関東地方でも陽性率が上昇している地域が明らかとなり、狩猟・解体時の血液の飛散に注意する必要がある。③培養細胞に馴化した HEV の作製に成功した。④カラーアトラスの充実をすべく、協力者の拡大に努めている。

2. わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因物質 *Trichinella* T9 を用いて、本虫の感染性を消失させる加熱条件を、マウスを用いた感染試験で再検討した。その結果、幼虫を直接的に 75℃ で 1 分間加熱する条件では、マウスへの感染性が完全には消失しないことが追認された。

3. 北東北 3 県で捕獲されたツキノワグマ 22 頭について旋毛虫の寄生状況を調べたところ、岩手県で 2020 年 12 月に捕獲されたツキノワグマ 1 頭の舌から、旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫が検出された。しかし青森県と秋田県の

クマ検体は、いずれも旋毛虫陰性であった。また秋田県ではイノシシの試料・5検体も提供を受けたので検査したが、いずれも陰性であった。

4. 大分県のイノシシの筋肉を調べたところ、ウェステルマン肺吸虫 2 倍体型の幼虫が検出された。鹿児島県で陽性イノシシが生息する地区のサワガニおよびモクズガニから、ウェステルマン肺吸虫 3 倍体型メタセルカリアが検出されたことから、これらのカニがイノシシへの感染源になっていると考えられた。

5. ①鹿、猪ともに「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理された枝肉からは、「内臓摘出」→「剥皮」の順で処理された枝肉に比べ、一般細菌数が多く検出された。②猪では、剥皮の際「のせ台」を用いた場合は、「懸吊」する場合に比べ、各種衛生指標細菌数が多く検出された。③鹿、猪ともに、剥皮の際に「手剥ぎ」に比べ、「ウィンチ」を用いて行くと、細菌汚染を受けやすいことが明らかとなった。④解体処理工程において、搬入前の表皮洗浄は極めて効果的に細菌数を減少させた。⑤解体処理工程における細菌汚染源として、表皮、蹄、肛門周囲、胃内容物などが考えられた。⑥一連の工程の内、特に、「剥皮工程」、「内臓摘出工程」では、作業者の手指、およびナイフに高度に細菌汚染されることが確認された。

6. ①猪精肉の真菌叢の調査手法として、NGS法を構築し、簡便かつ難培養性の菌種も確実に検出できる効果的な手法であることを示した。本分担研究で供試対象とした猪肉製品では全体に占める酵母の割合は総じて高く、また *Malassezia* 属菌等の医学上重要な真菌も高頻度に分布する実態をはじめて把握できた。今後は、NGS法を用いたジビエ食肉における真菌叢の網羅的な把握に資する研究を通じ、衛生管理上、真菌・酵母に由来する健康リスクを把握し、その管理に努めることが必要と思われる。②低温加熱調理を通じた猪肉中での E 型肝炎ウイルスの消長を検討し、「厚生労

働省野生鳥獣肉に関する Q&A」で示される低温加熱条件は何れも E 型肝炎ウイルスの不活化に一定の有効性を示すことが明らかとなった。また、同ウイルスの感染力価を評価するための手法として蛍光免疫染色法の有用性を示唆する知見を得た。今後は合理的なウイルス評価系の設定に係る検討を進めると共に、加工調理工程での病原微生物の動態把握のための検討を進めることで、野生鳥獣肉の安全性確保に向けた総合的な科学的知見の集積にあたりたい。

F. 健康危険情報

「なし」

G. 研究発表

1) Irie T., Uraguchi K., Ito T., Yamazaki A., Takai S., Yagi K. First report of *Sarcocystis pilosa* sporocysts in feces from red fox, *Vulpes vulpes schrencki*, in Hokkaido, Japan IJP: Parasites and Wildlife 11 (2020) 29-31.

2) Suzuki Y. Hisaya K. Ono Y. Shimojima H. Kubota, R. Kato, T. Kakuda, S. Hirose, Dong-Liang. Hu, A. Nakane, S. Takai, K. Sadamasu A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004. Food Microbiol. 92 December 2020, 103588.

3) Suzuki Y, K. Takahashi, F. Takase, N. Sawada, S. Nakao, A. Toda, Y. Sasaki, T. Kakuda and S. Takai Serological epidemiological surveillance for vapN-harboring *Rhodococcus equi* infection in goats in Okinawa, Japan CIMID 73 (2020) 101540

4) Takai, S., N. Sawada, Y. Nakayama, S. Ishizuka, R. Nakagawa, G. Kawashima, N. Sangkanjanavanich, Y. Sasaki, T. Kakuda, and Y. Suzuki Reinvestigation of the virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. Lett Appl

- Microbiol. 2020 Dec;71(6):679-683. doi: 10.1111/lam.13386.
- 5) Kawase J, Hirai S, Yokoyama E, Hayashi F, Kurosaki M, Kawakami Y, Fukuma A, Sakai T, Kotani M, Asakura H. Phylogeny, prevalence, and Shiga toxin (Stx) production of clinical *Escherichia coli* O157 clade 2 strains isolated in Shimane prefecture, Japan. 2021. Curr Microbiol. 78 : 265–273.
 - 6) Rattanatumhi K, Prasertsincharoen N, Naimon N, Kuwata R, Shimoda H, Ishijima K, Yonemitsu K, Minami S, Supriyono, Tran NTB, Kuroda Y, Tatemoto K, Virhuez Mendoza M, Hondo E, Rerkamnuaychoke W, Maeda K, Phichitraslip T. A serological survey and characterization of Getah virus in domestic pigs in Thailand, 2017-2018. Transbound Emerg Dis. 2021 Feb 22. doi: 10.1111/tbed.14042. Epub ahead of print. PMID: 33617130.
 - 7) Kirino Y, Ishijima K, Miura M, Nomachi T, Mazimpaka E, Sudaryatma PE, Yamanaka A, Maeda K, Sugimoto T, Saito A, Mekata H, Okabayashi T. Seroprevalence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Small-Animal Veterinarians and Nurses in the Japanese Prefecture with the Highest Case Load. Viruses. 2021 Feb 2;13(2):229. doi: 10.3390/v13020229. PMID: 33540629; PMCID: PMC7912989.
 - 8) Tsuru M, Suzuki T, Murakami T, Matsui K, Maeda Y, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Shimada T, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S, Saijo M. Pathological Characteristics of a Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected with SFTS Virus through a Sick Cat's Bite. Viruses. 2021 Jan 29;13(2):204. doi: 10.3390/v13020204. PMID: 33572914; PMCID: PMC7912689.
 - 9) Morikawa M, Mitarai S, Kojima I, Okajima M, Hatai H, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Matsuu A, Yoshida A, Hayashi K, Ozawa M, Masatani T. Detection and molecular characterization of *Babesia* sp. in wild boar (*Sus scrofa*) from western Japan. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Feb 27;12(4):101695. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101695. Epub ahead of print. PMID: 33677233.
 - 10) Sakai Y, Kuwabara Y, Ishijima K, Kagimoto S, Mura S, Tatemoto K, Kuwata R, Yonemitsu K, Minami S, Kuroda Y, Baba K, Okuda M, Shimoda H, Sakurai M, Morimoto M, Maeda K. Histopathological Characterization of Cases of Spontaneous Fatal Feline Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan. Emerg Infect Dis. 2021 Apr;27(4):1068-1076. doi: 10.3201/eid2704.204148.
 - 11) Park ES, Fujita O, Kimura M, Hotta A, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals. PLoS One. 2021 Jan 28;16(1):e0238671. doi: 10.1371/journal.pone.0238671. PMID: 33507990; PMCID: PMC7842937.
 - 12) Tomino Y, Andoh M, Horiuchi Y, Shin J, Ai R, Nakamura T, Toda M, Yonemitsu K, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Kodera Y, Oshima I, Takayama K, Inadome T, Shioya K, Fukazawa M, Ishihara K, Chuma T. Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in wild Japanese deer (*Cervus nippon*) and boar (*Sus scrofa*). J Vet Med Sci. 2020 Sep 24;82(9):1287-1294. doi: 10.1292/jvms. 19-0265. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32655094; PMCID: PMC7538328.
 - 13) Masatani T, Hayashi K, Morikawa M, Ozawa M, Kojima I, Okajima M, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Matsuu A, Yoshida A.

- Molecular detection of tick-borne protozoan parasites in sika deer (*Cervus nippon*) from western regions of Japan. *Parasitol Int.* 2020 Dec;79:102161. doi: 10.1016/j.parint.2020.102161. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32569748.
- 14) Ishida-Kuroki K, Takeshita N, Nitta Y, Chuma T, Maeda K, Shimoda H, Takano A, Sekizaki T. 16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Five Species of Wild Animals in Japan. *Microbiol Resour Announc.* 2020 May 28;9(22):e00368-20. doi: 10.1128/MRA.00368-20. PMID: 32467273; PMCID: PMC7256260.
- 15) Ishida-Kuroki K, Takeshita N, Nitta Y, Chuma T, Maeda K, Shimoda H, Takano A, Sekizaki T. 16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Wild Deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Microbiol Resour Announc.* 2020 May 28;9(22):e00346-20. doi: 10.1128/MRA.00346-20. PMID: 32467271; PMCID: PMC7256258.
- 16) Lin TL, Ou SC, Maeda K, Shimoda H, Chan JP, Tu WC, Hsu WL, Chou CC. The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan. *Emerg Microbes Infect.* 2020 Jan 10;9(1):148-151. doi: 10.1080/22221751.2019.1710436. PMID: 31918622; PMCID: PMC6968498.
- 17) 前田健「Globalization と人獣共通感染症」日本臨牀 2021. 79 巻 2 号 124-132
- 18) 前田健「人獣共通感染症：動物から学ぶ」実験医学(羊土社)2021. 39 (2) 56-64
- 19) 前田健「ペットと野生動物における COVID-19」動物用ワクチンニュースレター-2020. 12.24 No.22 P32-39
- 20) 石嶋慧多、朴ウンシル、松鶴 彩、早坂大輔、桐野有美、岡林環樹、森川 茂、水谷哲也、松野啓太、前田 健「国内ではこれまで経験のない脅威：SFTS」ヒトと動物の共通感染症研究会ニュースレターNo.19、2020 年 8 月 p15-17
- 21) 前田健「4.7 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)」『犬の内科診療 Part 2』(石田卓夫総監修) 緑書房 2020 年 7 月 30 日
- 22) 前田健「1-6 ブーノース (人獣共通感染症)」『衛生動物の事典』pp12-13(朝倉書店、東京) 2020 年 5 月
- 23) Takahashi,T. Kabeya, H., Sato, S., Yamazaki, A., Kamata, Y., Taira, K., Asakura, H., Sugiyama, H., Takai, S., Maruyama, S. Prevalence of *Yersinia* among wild sika deer (*Cervus nippon*) and boars (*Sus scrofa*) in Japan. *J. Wildl. Dis.* 56(2):270-277, 2020.
- 24) Mizukami M, Sato S, Nabeshima K, Kabeya H, Ueda D, Suzuki K, Maruyama S. Molecular survey of *Bartonella rochalimae* in Japanese racoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). *J Wildl Dis.* 56(3):560-567, 2020
- 25) Nabeshima K, Sato S, Kabeya H, Kato C, Suzuki K, Maruyama S., Isolation and genetic properties of *Bartonella* in eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. *Infect Genet Evol* 83:104354. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104354. Epub 2020 May 5
- 26) Nabeshima K, Sato S, Kabeya H, Komine N, Nanashima R, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Suzuki K, Maruyama S. Detection and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from bat flies on eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 73:101570. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101570. Epub 2020 Oct 25.
- 27) Sato S, Kabeya H, Ishiguro S, Shibasaki Y, Maruyama S. Lipoptena fortisetosa as a vector of *Bartonella* bacteria in Japanese sika deer (*Cervus nippon*). *Parasitol Vectors.*:14(1):73. doi: 10.1186/s13071-021-04585-w. , 2021.
- 28) 杉山 広、森嶋康之、児玉文宏、北海道札幌市において 2019 年に発生した旋毛虫集

団食中毒事例、Clin Parasitol 2020. 31: 49-51.

29) Banzai A, Sugiyama H, Hasegawa M, Morishima Y, Kawakami Y. *Paragonimus westermani metacercariae* in two freshwater crab species in Kagoshima Prefecture, Japan, as a possible source of infection in wild boars and sika deer. J Vet Med Sci, 83(3): 412-418, 2021. doi: 10.1292/jvms.20-0576

2. 学会発表

1) 前田健「SFTS について考える」第 20 回人と動物の共通感染症研究会・学術集会令和 2 年 10 月 24 日 (金) 14:20-14:40 (WEB 開催)

2) 前田健「身の回りで何が起きているのか～犬猫、魚から環境まで～(オーバービュー)」第 69 回日本感染症学会東日本地方学術集会シンポジウム 13 身の回りに潜む耐性菌～犬猫、魚から環境まで～令和 2 年 10 月 22 日 16:40-18:10 (WEB 開催)

3) 前田健「伴侶動物と楽しく暮らしながら乗り越えよう」オンライン日本臨床獣医学フォーラム新興感染症シンポジウム令和 2 年 9 月 (LIVE 配信)

4) 前田健「SFTS の病態：マダニ以外の感染経路」第 94 回日本感染症学会学術集会講演会

シンポジウム 24 「重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) -明らかになった事実, 残された疑問-」2020 年 8 月 20 日 (木) 10:20-12:00 (グランドニッコー東京 台場)

5) 鍋島 圭、佐藤 真伍、壁谷 英則、丸山 総一 高速シーケンサーを用いたコウモリ由来 *Bartonella* の病原関連遺伝子の探索 第 163 回日本獣医学会学術集会 (山口大学 (web 開催)、2020 年 9 月 8～10 日)

6) 坂西梓里、杉山 広、森嶋康之、川上 泰. 鹿児島県阿久根市の淡水産カニにおける肺吸虫幼虫の寄生状況調査と試験感染ネコから得た成虫の形態, 第 89 回日本寄生虫学会大会, 2020/05/30 (とかちプラザ, 帯広, 誌上報告)

講演会

1) 前田健「野生動物を介したマダニ媒介感染症の拡大」福岡県” One Health” 国際フォーラム 2021. 2021 年 1 月 30 日 (土) 18:00 から配信開始

2) 前田健「動物由来感染症について」日本ペストコントロール協会 令和 2 年度防除技術研修会・感染症対策講習会 2020/12/03-13

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和2年度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）
「野生鳥獣由来食肉の安全性確保とリスク管理のための研究」
分担研究報告書

野生鳥獣が保有する病原体の汚染状況に関する研究

分担研究者 前田 健 （国立感染症研究所獣医科学部）
研究協力者 立本完吾 （山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）
Milagros Virhuez Mendoza （山口大学共同獣医学部獣医微生物学教室）

研究要旨 E型肝炎ウイルスに対する抗体保有状況およびE型肝炎ウイルス感染状況の調査をイノシシおよびシカにおいて実施した。これまでに15県のイノシシ2363頭と13道県のシカ1822頭を調査した。その結果、イノシシにおいては360頭（15.2%）が抗体陽性であった。一方、シカにおいては1頭（0.1%）が陽性であった。遺伝子検出に関しては、イノシシ1471頭中25頭（1.7%）、シカ1380頭中1頭（0.1%）が陽性であった。イノシシにおける抗体陽性率に関しては、性別における違いは認められなかったが、体重が30kg以下の個体は有意に陽性率が低かった。一方、遺伝子検出率は30kg以下の個体が有意に高かった。このことは、30kg以下の個体がE型肝炎ウイルスに感染していること、すなわち、子猪がHEVを保有しているリスクが高いことが示された。また、培養細胞に馴化した増殖性の速いHEVの作出にも成功した。マダニ媒介性感染症で致死率が極めて高い重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルスのイノシシとシカにおける感染リスクを調査した結果、15府県のイノシシ2110頭中12県の626頭（29.7%）、28道府県のシカ3443頭中23府県の864頭（25.1%）から抗SFTSウイルス抗体が検出された。狩猟者はHEVのみならずSFTSVに関しても注意が必要である。

A. 研究目的

リスク評価及びリスク管理に活用可能な国内のシカ、イノシシ等の野生鳥獣が保有するヒトへの病原体（ウイルスを中心として）の汚染状況データを継続して蓄積する。国内の野生獣由来感染症を把握することにより感染リスク分析が可能となり、野生獣肉の消費者のみならず、狩猟・捕獲・解体に携わる人々への対策および提言へと結びつく。

B. 研究方法

1) 血清試料

日本各地より狩猟および有害鳥獣として捕獲された野生獣から血清を回収した。

2) 抗HEV抗体の検出

2015年に作成したマニュアルに従った。

3) 血清からのHEV遺伝子検出

2015年に作成したマニュアルに従った。

4) HEVの細胞馴化

国立感染症研究所ウイルス第2部の李先生より分与していただいた遺伝子型3のG3-HEV83-2-27

株をヒト肝がん由来培養細胞 Alexander 細胞（PLC/PRF/5細胞）で増殖させ、実験に用いた。我々の使用ウイルスは分離から13代目のP13である。それをAlexander細胞へ感染させ、2%FCS加培地を1週間に2回培地の半分を交換しながら感染細胞を維持した。1週間に一回、培養上清からRNAを抽出し、RT-PCRを25サイクルで実施し、電気泳動にてウイルス特異バンドを検出し、2週続けて陽性になった場合、ウイルス液を回収した。2年半かけて、合計20代の継代に成功し、P34ウイルスとした。

5) 血清から抗SFTSウイルス抗体の検出

2018年に作成したマニュアルに従った。

6) 血清からのSFTSV遺伝子検出

2015年に作成したマニュアルに従った。

C. 研究結果

1) イノシシにおける抗HEV抗体保有率（表1）

我々の研究室では、これまでイノシシ及びシカのHEV感染状況を継続的に調査してきた。日本全国15県のイノシシ2363頭中360頭が抗HEV抗体

陽性となり陽性率は 15.2%であった。2020 年度は 1 県検査地域が増えた。イノシシにおいては、2 県を除いてすべての都道府県で陽性の個体が見つかった。陰性の沖縄では小さな島から回収したイノシシであるため特殊な環境のイノシシと考えていい。また、青森での検査数は 4 頭と少なかったことが原因であると考えている。本年度の興味深い結果として、これまで和歌山県ですべての検査が陰性であったのに対して、本年度陽性の個体が見つけた。多くの県が 20%前後の抗体陽性率であるのに対して、関東地方の千葉と群馬のイノシシは 49%、42%と抗体陽性率が高かった（表 1）。

2) イノシシにおける抗 HEV 抗体保有率(表 2)

HEV に対する抗体保有率を性別で比較した結果、雄 15.2%、雌 19.3%の陽性率で雌雄差は認められなかった。一方、体重別で比較した結果、30 kg 以下の個体では陽性率が 5.8%であったのに対して 30 kg 以上 50kg 以下の個体では 19.0%、50kg より大きな個体では 24.1%であった。体重 30 kg 前後のイノシシが HEV に感染し、抗体が陽転していた。

3) イノシシにおける HEV 遺伝子検出(表 1)

イノシシの血清から HEV 遺伝子の検出を試みた結果、1471 頭中 25 頭の 1.7%から HEV 遺伝子が検出された。特に、抗体陽性率が高い千葉県と群馬県、中程度の抗体保有率であった兵庫県、山口県、香川県、大分県で遺伝子が検出された。それ以外の抗体保有率が低程度から中程度の岐阜県、富山県、愛媛県からは HEV 遺伝子は検出されなかった。

4) イノシシにおける HEV 遺伝子検出(表 3 と表 5)

性別では雄の方が 2.4%と雌の陽性率の 1.2%より 2 倍ほど陽性率が高かった。また、体重別では 30kg 未満で 3.6%、30-50kg で 1.5%、50kg より大きい個体で 0.4%と体重が増加するにつれて陽性率が減少した。

5) シカにおける抗 HEV 抗体と HEV 遺伝子検出(表 4、表 5)

シカからの抗体検出の結果、全体では 1822 頭中 1 頭(0.1%)抗体のシカが抗体陽性であることが判明した。遺伝子検出もこれまで 1380 頭調べたが 1 頭(0.1%)からしか検出されていない。イノシシの陽性率に比べると依然として低いものの、シカも HEV の感受性動物であることが確認された。実際、E 型肝炎食中毒の原因食品としてシカ肉は多数報告されている。

6) 動物から検出された HEV 遺伝子の系統解析(表 5、図 1)

検出された HEV 遺伝子の塩基配列を決定し、系統樹を作製した。2020 年度は新たな香川県のイノシシから HEV 遺伝子が検出され、遺伝子型 3 型であった。千葉県・山口県ではほぼ毎年同じクラスターを形成するウイルスが検出されていることがわかる。これらは、HEV が野外では維持されていることを示している。また、山口県においては、下関市では遺伝子型 4 が流行しているにもかかわらず、岩国では遺伝子型 3 のウイルスが検出されている。県単位ではなく、地域単位で流行しているウイルスが異なることが判明した。

7) 迅速診断のための HEV の細胞馴化(表 6、図 2、図 3)

HEV に関する研究や診断が進まないのは HEV の増殖が非常に遅いためである。分与していただいたウイルスは Alexander 細胞で 13 代継代したものであったが、感染後 28 日目ようやく 25 サイクルの PCR でバンドが検出された。Real-time PCR でも感染後 21 日目に検出されるのみであった(図 2)。最初の頃は 6 週間に 1 回の継代などを繰り返した。2 年半で 20 回の継代に成功した。その過程で、P13 から P17 のウイルスは 25 サイクルの RT-PCR で検出されるのは、感染後 28 日であったが、P18-P30 は感染後 21 日、P31-34 は感染後 14 日目に検出されるようになった。理想は感染後 7 日目に検出されるウイルスの作製を目指したが、これ以上は難しいと判断し、20 代継代を加えた P34 で解析を進めることとした。P34 と P15 の Alexander 細胞での増殖性を定量 RT-PCR で比較した結果、P34 では 7 日目より 104 コピー/mL のウイルスが検出された。一方、P15 では 14 日目までウイルスは検出されなかった(図 2)。馴化によるウイルスへの影響を比較した結果、カプシド蛋白の P ドメインに集中的に変異が観察された。この領域が培養細胞での増殖に重要である可能性が示唆された(図 3)。

8) シカ・イノシシにおける抗 SFTSV 抗体保有率の再評価(表 6、表 7)

これまでイノシシ及びシカの SFTSV 感染状況を継続的に ELISA により調査してきた。この ELISA に関しては Cut-off 値を暫定的に OD 0.5 と設定してきた。しかし、ウイルス中和試験と ELISA との比較により、ELISA 試験にはかなり非特異反応が認められることが確認された。より詳細な解析により、シカで OD 0.390、イノシシで OD 0.160 を Cut-off 値と設定することが最適であることが示された。これにより、これまでのすべての検査結

果を評価しなおした。ウイルス中和試験により、より正確な検査結果が出た山口県のシカとイノシシでの抗体陽性率を比較した。その結果、流行地と考えられていた山口県でも徐々に陽性率が上昇していることが認められた。そして、山口県の2015年以降の陽性率は80%となり、ほぼすべてのシカが感染していることが明らかとなった。イノシシもシカに比べれば陽性率は低い、シカと同様に陽性率の上昇が観察された。山口県で2012年に国内初のSFTS患者が報告されたが、陽性率が上昇し始めた時期と一致しており、SFTSのヒトでの発生は、野生動物で流行し始める時期と一致していることが明らかとなり、野生動物での調査がヒトへのリスクを知る上で極めて重要であることが明らかとなった。

9) シカにおける抗 SFTSV 抗体保有率 (表 7、表 8、表 9)

我々の研究室では、これまで28道府県でシカ3443頭の抗SFTSV抗体保有率の調査を行ってきた。ELISAでの調査では、23府県のシカ864頭に陽性が認められ、全体では25.1%のシカに陽性が認められた。一方、北海道、岩手、福島、栃木、群馬で陽性は確認されなかった。宮崎、山口、広島、島根、和歌山県では50%以上のシカに陽性が認められた。また、千葉、兵庫、愛媛、高知では20%以上の陽性個体が見つけられた。これらの結果から、西日本で陽性率が高いこと、東日本にも陽性率が高い地域が存在することが明らかとなった(表7)。

陽性率において、雌雄差(雄26.7%、雌23.3%)は認められなかったものの、体重が重い30kg以上の個体で高い陽性率(25.3%)が認められている(表8)。

関東で陽性率が高い千葉県での推移を比較した結果、2016年以降約20%、2018年以降30%以上の陽性率となり、シカでの感染率が上昇していることが明らかとなっている(表9)。

10) シカにおける SFTSV 遺伝子検出 (表 7)

これまで6県470頭のシカからSFTSVの遺伝子検出を試みたが、陽性個体は認められていない(表7)。

11) イノシシにおける抗 SFTSV 抗体保有率 (表 10、表 11)

15府県のイノシシ2110頭の血清から抗SFTSV抗体の検出を試みた結果、12県の626頭(29.7%)から抗SFTSV抗体陽性が認められた。10頭以上の検査が実施された県では、熊本県で71.4%、山口、和歌山、香川、大分、愛媛で20%以上の陽性率と

なっている。一方、栃木、千葉、岐阜、富山では低い陽性率となっている(表10)。イノシシにおける性別(雄31.3%、雌31.25%)、体重別(30kg未満31.1%、30-50kg30.4%、50kgより大きい個体32.5%)で有意な差は認められなかった(表11)。

12) イノシシにおける SFTSV 遺伝子検出 (表 10)

これまで9県615頭からSFTSV遺伝子の検出を試みた。その結果、香川県と愛媛県のイノシシからSFTSV遺伝子が検出された。全体の陽性率は0.3%と非常に低く、愛媛県や香川県でも1%であり、イノシシでの陽性率は低い。

D. 考察

1) HEV のリスクについて

- HEVの自然宿主はイノシシである。
- イノシシの1.7%が捕獲時にウイルスを保有している。
- 子供のイノシシがウイルスを保有している可能性が高い。
- 地域において長年同じウイルスが保持されている。
- 関東の方がHEVの感染率が高い。

2) SFTSV のリスクについて

- 西日本の多くのイノシシ・シカに感染している。
- 感染率が上昇している地域がある。
- 東日本でも低いながらも野生動物で感染している。
- 陽性率は低いながらも捕獲時に血液中にウイルスを保有しているイノシシがいる。

3) 狩猟者への人獣共通感染症のリスク

- イノシシの60頭に1頭(高い地域では20頭に1頭)が捕獲時・解体時にHEVウイルスを保有している。
- SFTSのリスクは西日本で高い。
- 患者の発生していない関東でもSFTS陽性率が高い地域が存在する。

4) HEV 検査について

HEVは非常に培養細胞での増殖が遅く、適切な実験動物も存在していなかった。そのため、非常に解析が困難であった。我々は、細胞での増殖が速いHEVの作製に成功した。今後の、HEV研究に大きく貢献すると期待される。

E. 結論

1) HEV 遺伝子検出は血清から行なった。血清中にウイルスの遺伝子が存在するという事は、血管の分布する食肉も汚染されていると考えられるので、食中毒の危険を予測する上で血清から遺伝子検出することは非常に有用であると考えられる。

2) イノシシにおいては体重 30 kg前後の子供のころに感染することが示唆された。30 kg以下のウリ坊の解体並びに食用は特に注意する必要がある。なお、全体でも 60 頭に 1 頭は捕獲時にウイルスを保有しているので狩猟者並びに解体者並びに消費者においては注意が必要である。

3) イノシシとシカの両方を総合すると、西日本のほとんどの県で SFTS ウイルスが存在していることが確認された。特に、中国・四国・九州では陽性率が高かった。また、関東地方でも陽性率が上昇している地域が明らかとなった。リスクが高まっていると判断される。

4) SFTSV 遺伝子の検出率は低い。イノシシ 615 頭中 2 頭(0.3%)から遺伝子が検出されているのみである。遺伝子検出率は低いが、血液中にウイルスを保有している動物がいることは、この動物の血液により、解体者などが感染するリスクがあることを周知徹底すべきである。

5) 培養細胞に馴化した HEV の作製に成功した。これまでのウイルスよりも倍以上早く増殖することから、今後の研究に大きく貢献すると期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Rattanatumhi K, Prasertsincharoen N, Naimon N, Kuwata R, Shimoda H, Ishijima K, Yonemitsu K, Minami S, Supriyono, Tran NTB, Kuroda Y, Tatemoto K, Virhuez Mendoza M, Hondo E, Rerkamnuaychoke W, Maeda K, Phichitraslip T. A serological survey and characterization of Getah virus in domestic pigs in Thailand, 2017–2018. *Transbound Emerg Dis*. 2021 Feb 22. doi: 10.1111/tbed.14042. Epub ahead of print. PMID: 33617130.

Kirino Y, Ishijima K, Miura M, Nomachi T, Mazimpaka E, Sudaryatma PE, Yamanaka A, Maeda K, Sugimoto T, Saito A, Mekata H, Okabayashi T. Seroprevalence of Severe

Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Small-Animal Veterinarians and Nurses in the Japanese Prefecture with the Highest Case Load. *Viruses*. 2021 Feb 2;13(2):229. doi: 10.3390/v13020229. PMID: 33540629; PMCID: PMC7912989.

Tsuru M, Suzuki T, Murakami T, Matsui K, Maeda Y, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Shimada T, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S, Saijo M. Pathological Characteristics of a Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected with SFTS Virus through a Sick Cat's Bite. *Viruses*. 2021 Jan 29;13(2):204. doi: 10.3390/v13020204. PMID: 33572914; PMCID: PMC7912689.

Morikawa M, Mitarai S, Kojima I, Okajima M, Hatai H, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Matsuu A, Yoshida A, Hayashi K, Ozawa M, Masatani T. Detection and molecular characterization of Babesia sp. in wild boar (*Sus scrofa*) from western Japan. *Ticks Tick Borne Dis*. 2021 Feb 27;12(4):101695. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101695. Epub ahead of print. PMID: 33677233.

Sakai Y, Kuwabara Y, Ishijima K, Kagimoto S, Mura S, Tatemoto K, Kuwata R, Yonemitsu K, Minami S, Kuroda Y, Baba K, Okuda M, Shimoda H, Sakurai M, Morimoto M, Maeda K. Histopathological Characterization of Cases of Spontaneous Fatal Feline Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2021 Apr;27(4):1068–1076. doi: 10.3201/eid2704.204148.

Park ES, Fujita O, Kimura M, Hotta A, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K, Morikawa S. Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals. *PLoS One*. 2021 Jan 28;16(1):e0238671. doi: 10.1371/journal.pone.0238671. PMID: 33507990; PMCID: PMC7842937.

Tomino Y, Andoh M, Horiuchi Y, Shin J, Ai R, Nakamura T, Toda M, Yonemitsu K, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Kodera Y, Oshima I, Takayama K, Inadome T, Shioya K, Fukazawa M, Ishihara K, Chuma T. Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in wild Japanese deer

(Cervus nippon) and boar (Sus scrofa). J Vet Med Sci. 2020 Sep 24;82(9):1287-1294. doi: 10.1292/jvms.19-0265. Epub 2020 Jul 13. PMID: 32655094; PMCID: PMC7538328.

Masatani T, Hayashi K, Morikawa M, Ozawa M, Kojima I, Okajima M, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Matsuu A, Yoshida A. Molecular detection of tick-borne protozoan parasites in sika deer (Cervus nippon) from western regions of Japan. Parasitol Int. 2020 Dec;79:102161. doi: 10.1016/j.parint.2020.102161. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32569748.

Ishida-Kuroki K, Takeshita N, Nitta Y, Chuma T, Maeda K, Shimoda H, Takano A, Sekizaki T. 16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Five Species of Wild Animals in Japan. Microbiol Resour Announc. 2020 May 28;9(22):e00368-20. doi: 10.1128/MRA.00368-20. PMID: 32467273; PMCID: PMC7256260.

Ishida-Kuroki K, Takeshita N, Nitta Y, Chuma T, Maeda K, Shimoda H, Takano A, Sekizaki T. 16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Wild Deer (Cervus nippon) in Japan. Microbiol Resour Announc. 2020 May 28;9(22):e00346-20. doi: 10.1128/MRA.00346-20. PMID: 32467271; PMCID: PMC7256258.

Lin TL, Ou SC, Maeda K, Shimoda H, Chan JP, Tu WC, Hsu WL, Chou CC. The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan. Emerg Microbes Infect. 2020 Jan 10;9(1):148-151. doi: 10.1080/22221751.2019.1710436. PMID: 31918622; PMCID: PMC6968498.

前田 健「Globalizationと人獣共通感染症」日本臨床 2021. 79 巻 2 号 124-132

前田 健「人獣共通感染症：動物から学ぶ」実験医学(羊土社)2021. 39 (2) 56-64

前田 健「ペットと野生動物における COVID-19」動物用ワクチンニュースレター2020. 12. 24 No. 22 P32-39

石嶋慧多、朴ウンシル、松鶴 彩、早坂大輔、桐野有美、岡林環樹、森川 茂、水谷哲也、松野啓太、前田 健「国内ではこれまで経験のない脅威：SFTS」ヒトと動物の共通感染症研究会ニュースレターNo. 19、2020年8月 p15-17

前田 健「4.7 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)」『犬の内科診療 Part 2』(石田卓夫総監修) 緑書房 2020年7月30日

前田 健「1-6 ブーノーシス(人獣共通感染症)」『衛生動物の事典』pp12-13(朝倉書店、東京) 2020年5月

2. 学会発表

前田 健「SFTSについて考える」第20回人と動物の共通感染症研究会・学術集会令和2年10月24日(金)14:20-14:40(WEB開催)

前田 健「身の回りで何が起きているのか～犬猫、魚から環境まで～(オーバービュー)」第69回日本感染症学会東日本地方学術集会シンポジウム13 身の回りに潜む耐性菌～犬猫、魚から環境まで～令和2年10月22日16:40-18:10(WEB開催)

前田 健「伴侶動物と楽しく暮らしながら乗り越えよう」オンライン日本臨床獣医学フォーラム新興感染症シンポジウム令和2年9月(LIVE配信)

前田 健「SFTSの病態：マダニ以外の感染経路」第94回日本感染症学会学術集会講演会シンポジウム24「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)-明らかになった事実、残された疑問-」2020年8月20日(木)10:20-12:00(グランドニッコー東京 台場)

講演会

前田 健「野生動物を介したマダニ媒介感染症の拡大」福岡県”One Health”国際フォーラム 2021. 2021年1月30日(土)18:00から配信開始

前田 健「動物由来感染症について」日本ペストコントロール協会 令和2年度防除技術研修会・感染症対策講習会 2020/12/03-13

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1 全国イノシシ HEV 抗体検出、遺伝子検出

	抗体検出 (ELISA) Cut-off 値 0.437			遺伝子検出 (RT-PCR)		
	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)
青森	4	0	0	4	0	0
千葉	91	45	49	91	5	5
群馬	48	20	42	48	1	2
栃木	220	12	5.5	-	-	-
岐阜	144	8	5.6	140	0	0
富山	168	17	10.1	168	0	0
兵庫	111	23	20.7	77	2	3
和歌山	282	16	5.7	100	0	0
山口	701	151	21.5	586	14	2.4
愛媛	122	25	20.5	115	0	0
香川	96	19	20	96	1	1
大分	92	17	18	46	2	4
鹿児島	5	1	20	-	-	-
熊本	182	6	3.3	-	-	-
沖縄	97	0	0	-	-	-
計	2363	360	15.2	1471	25	1.7

表2 全国イノシシ抗 HEV 抗体検出 (ELISA)

	性別			体重 (kg)				計
	♂	♀	記録なし	<30	30-50	>50	記録なし	
検査頭数	984	938	441	603	709	561	490	2363
陽性頭数	150	181	29	35	135	135	55	360
陽性率 (%)	15.2	19.3	6.6	5.8	19.0	24.1	11.2	15.2

表3 全国イノシシ遺伝子検出 (RT-PCR)

	性別			体重 (kg)				計
	♂	♀	記録なし	<30	30-50	>50	記録なし	
検査頭数	712	693	66	362	522	462	125	1471
陽性頭数	17	8	0	13	8	2	2	25
陽性率 (%)	2.4	1.2	0	3.6	1.5	0.4	1.6	1.7

表4 全国シカ HEV 抗体検出、遺伝子検出

	抗体検出 (ELISA) Cut-off 値 0.5			遺伝子検出 (RT-PCR)		
	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)
北海道	79	0	0	-	-	-
青森	21	0	0	21	0	0
千葉	108	0	0	108	0	0
群馬	86	0	0	86	0	0
岐阜	294	0	0	294	0	0
長野	47	0	0	-	-	-
山梨	65	0	0	-	-	-
和歌山	106	0	0	-	-	-
山口	875	0	0	771	1	0
愛媛	45	0	0	45	0	0
香川	55	1	1.8	55	0	0
大分	12	0	0	-	-	-
鹿児島	29	0	0	-	-	-
計	1822	1	0.1	1380	1	0.1

表5 これまで検出された HEV 遺伝子

都道府県	年	ID	性別	体重(kg)	ELISA 吸光度
兵庫	2010	Hyogo W10178	♂	32	ND
山口	2010	Shimonoseki 52	♂	60	3.5
山口	2010	Shimonoseki 72	♀	26	3.5
山口	2010	Shimonoseki 74	♂	55	3.5
兵庫	2011	Hyogo W10192	♂	16	ND
山口	2011	Shimonoseki 97	♀	10	3.5
山口	2011	Shimonoseki 99	♀	10	0.03
山口	2012	Shimonoseki 2012-10	♂	41	0.23
山口	2013	Shimonoseki deer 2013-19	♀	40	-0.06
山口	2014	Shimonoseki 2014-174	♀	10	-0.03
山口	2014	Shimonoseki 2014-176	♂	10	0.81
千葉	2015	Chiba 116 (CF-P27001)	♂	50	-0.02
山口	2015	Shimonoseki 2014-265	♂	27.3	0.38
山口	2015	Shimonoseki 2014-267	♂	23	0.03
山口	2015	Shimonoseki 2014-276	♂	16	2.87
山口	2015	Shimonoseki 2015-90	♂	25	2.54
千葉	2016	Chiba 132 (CPK-27-18)	♂	30	3.5
千葉	2016	Chiba 237 (CF-P28004)	♀	35	1.86
群馬	2016	Gunma 202 (28-05)	♀	15	2.46
山口	2017	Shimonoseki 2017-52	♂	40	0.06
千葉	2018	Chiba 479 (CPK-4)	♂	26	0.68
山口	2018	Iwakuni 81	♂	31	0.2
千葉	2019	Chiba 934 (CKP-1-7)	♂	40	2.52
大分	2019	Oita 1206 (大分-40)	♂	N/A	0.23
大分	2019	Oita 1211 (大分-45)	♀	N/A	0.05
香川	2020	Kagawa 2-15	♀	10	0.02

表6 馴化ウイルスの検出の推移

継代数	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
P13 to P17	-	-	-	+
P18 to P30	-	-	+	N. D.
P31- P34	-	+	+	N. D.

表7 全国シカ SFTSV 抗体検出、遺伝子検出

	抗体検出 (ELISA) Cut-off 値=0.390			遺伝子検出 (RT-PCR)		
	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)	検査頭数	陽性頭数	陽性率 (%)
北海道	25	0	0	-	-	-
青森	22	1	5	21	0	0
岩手	66	0	0	-	-	-
宮城	135	21	15.6	-	-	-
福島	4	0	0	-	-	-
栃木	81	0	0	-	-	-
群馬	159	0	0	78	0	0
千葉	107	24	22.4	73	0	0
神奈川	37	2	5	-	-	-
山梨	171	15	8.8	-	-	-
長野	200	4	2.0	-	-	-
岐阜	401	5	1.2	204	0	0
静岡	138	15	10.9	-	-	-
三重	104	13	12.5	-	-	-
滋賀	141	17	12.1	-	-	-
京都	96	18	19	-	-	-
兵庫	155	40	25.8	-	-	-
和歌山	160	83	51.9	-	-	-
鳥取	42	6	14	-	-	-
島根	75	47	62	-	-	-
広島	37	24	65	-	-	-
山口	793	466	58.8	-	-	-
香川	55	1	2	52	0	0
愛媛	73	18	25	42	0	0
高知	36	8	22	-	-	-
大分	36	3	8	-	-	-
宮崎	30	22	73	-	-	-
鹿児島	64	11	17	-	-	-
計	3443	864	25.1	470	0	0

表 8 全国シカ抗 SFTSV 抗体検出(ELISA)

	性別			体重(kg)			計
	♂	♀	記録なし	<30	≥30	記録なし	
検査頭数	1878	1386	179	392	2763	288	3443
陽性頭数	502	323	39	65	699	100	864
陽性率(%)	26.7	23.3	21.8	16.6	25.3	34.7	25.1

表 9 千葉県における抗 SFTSV 抗体保有率の推移

	2014	2015	2016	2017	2018	2019	合計
検体数	10	14	15	21	19	28	107
陽性数	0	1	3	4	7	9	24
陽性率(%)	0	7	20	19	37	32	22

表 10 全国イノシシ SFTSV 抗体検出、遺伝子検出

	抗体検出(ELISA) Cut-off 値=0.160			遺伝子検出(RT-PCR)		
	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)	検査頭数	陽性頭数	陽性率(%)
青森	4	0	0	4	0	0
栃木	170	2	1.2	-	-	-
群馬	46	0	0	46	0	0
千葉	75	5	7	75	0	0
岐阜	144	4	2.8	68	0	0
富山	148	13	8.8	65	0	0
京都	2	0	0	-	-	-
和歌山	297	114	38.4	100	0	0
山口	676	267	39.5	-	-	-
香川	96	36	38	96	1	1
愛媛	122	33	27.0	115	1	0.9
大分	46	14	30	46	0	0
鹿児島	5	3	60	-	-	-
熊本	182	130	71.4	-	-	-
沖縄	97	5	10	-	-	-
計	2110	626	29.7	615	2	0.3

表 11 全国イノシシ抗 SFTSV 抗体検出(ELISA)

	性別			体重(kg)				計
	♂	♀	記録なし	<30	30-50	>50	記録なし	
検査頭数	917	937	256	588	677	538	307	2110
陽性頭数	287	292	47	183	206	175	62	626
陽性率(%)	31.3	31.2	18.4	31.1	30.4	32.5	20.2	29.7

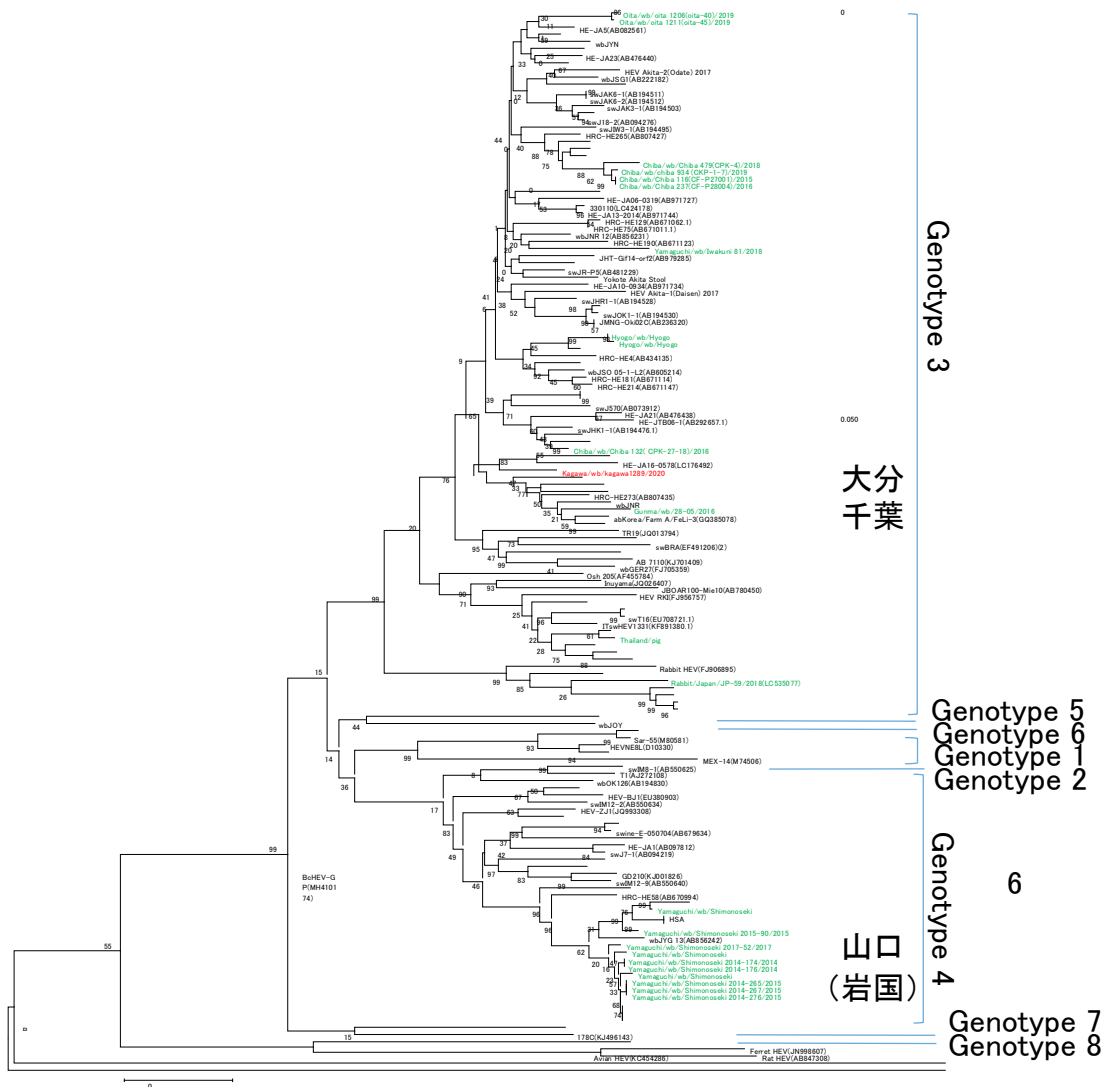


図1 国内の動物から検出された HEV 遺伝子を用いた系統樹
(緑色：本研究班、赤色：2020年)

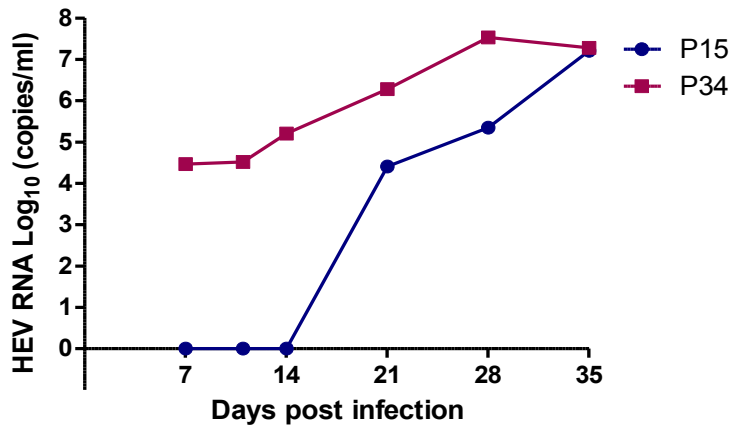


図2 20代継代(2年間)による細胞馴化 HEV の増殖の比較

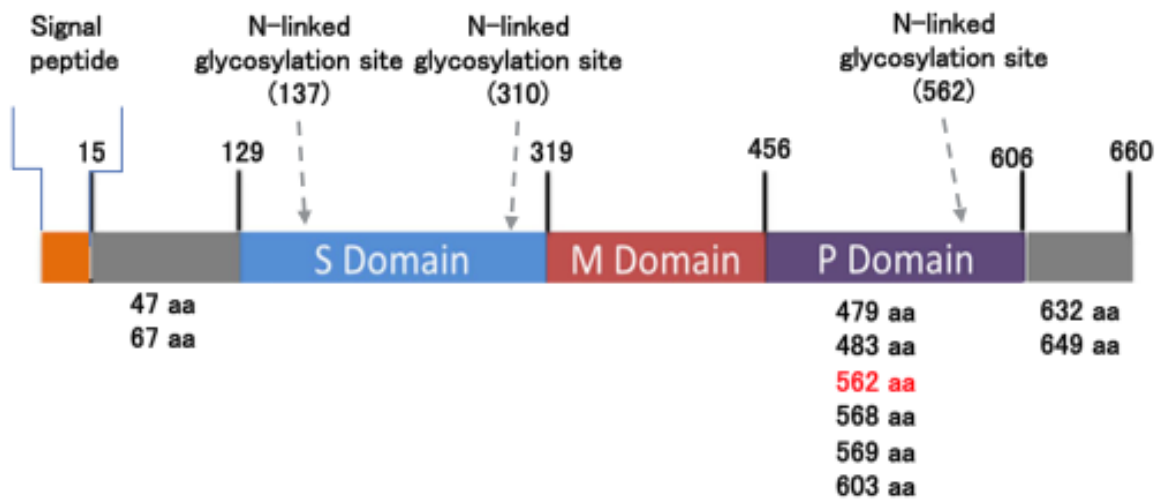


図3 馴化株 P34 のカプシド蛋白に認められた変異

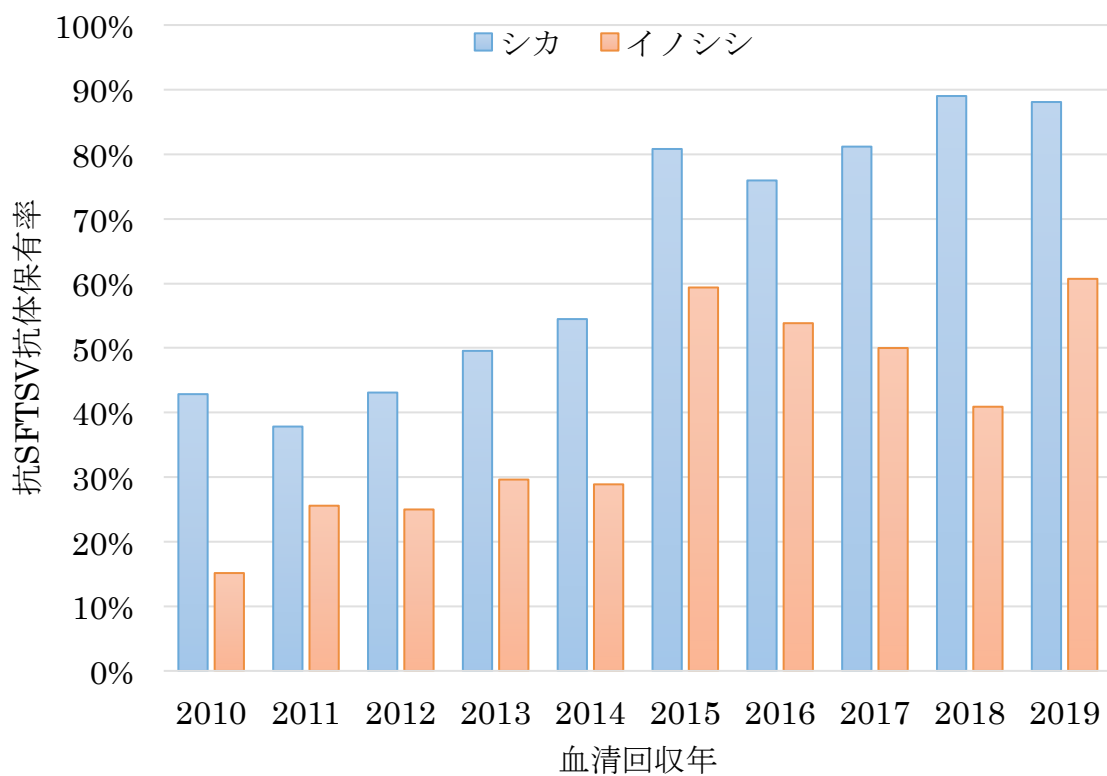


図4 山口県のシカ・イノシシにおける抗 SFTSV 抗体陽性率の推移（ウイルス中和試験）

令和 2 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）
「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究」
分担研究報告書

わが国に分布する旋毛虫 *Trichinella* T9 の殺滅に有効な加熱条件の検討

分担研究者	杉山 広	（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者	森嶋康之	（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者	村上正樹	（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者	常盤俊大	（日本獣医生命科学大学獣医学部）

研究要旨

わが国で発生した旋毛虫食中毒の原因物質である *Trichinella* T9 の幼虫に対して、75℃で 1 分以上の加熱（厚生省が野生鳥獣の安全な喫食に求める条件）を直接的に加えた上で、好適終宿主のマウスに経口投与したところ、一部の幼虫はマウスに感染するとの結果が得られたことから、この成績を追試験した。その結果、同様の実験系では同じく本虫のマウスへの感染性が完全には消失しないことが追認された。本虫の幼虫に対して直接的に加熱するのではなく、肉の調理法と同様の条件で虫体に熱を加えて耐性を検討し、野生鳥獣の喫食による旋毛虫食中毒の予防法を確認する必要があることが示された。

A. 研究目的

クマ肉を原因とする旋毛虫食中毒の集団事例が、わが国では最近、短期間のうちに 3 度発生した（2016 年 12 月に茨城県、2018 年 5 月および 2019 年 11 月に北海道）。これらの集団食中毒事例では、原因食品のクマ肉はすべて加熱された後に喫食されていた。この事実から、本邦に分布する旋毛虫は、加熱に対してある程度の耐性を有すると推定された。野生鳥獣肉の安全な喫食に資する加熱の条件に関し、厚生労働省は「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針（ガイドライン）について」（食安発 1114 第 1 号・2014 年 11 月 14 日）において、中心部の温度を 75℃以上で 1 分以上加熱するように指導している。既に本研究班で我々は、75℃で 1 分間（および 2 分間）の

加熱を旋毛虫 *Trichinella* T9（本邦に分布する日本固有の旋毛虫）の幼虫に直接的に加えた場合、マウスへの感染性が完全には消失しないことを明らかにした。この点を再確認するために、本試験を行った。

B. 研究方法

感染材料には、マウス（ddY 系，雄）を宿主に当研究室で実験室内継代している旋毛虫 *Trichinella* T9 を用いた（1974 年に青森県で発生した本邦初の集団人体感染事例に由来する虫体）。まず感染マウス 5 匹を剖検し、その筋肉をペプシン塩酸液（ペプシン、半井化学、1:10,000 が 1%、および塩酸が 1%）で人工消化して、本虫の幼虫を回収した。得られた幼虫は生理的食塩水（以下、生食水）で洗浄後、約 400 隻ず

つ PCR 用のプラスチックチューブ (Thin-wall、0.6 ミリリットル；以下、チューブ) 10 本に少量の生食水とともに分配した。さらに各チューブに生食水を加えて、チューブ内の液量を 0.4 ミリリットルにそろえた。その上で、計 10 本のチューブを 5 本ずつに分け、5 本は 75°C で 1 分間の加熱し (群 1)、残りの 5 本は未処理とした (群 2、陽性対象群)。

加熱処理したチューブは処理後速やかにクラッシュアイスを入れた容器に移した。幼虫を含むチューブ内の懸濁液は、加熱の有無にかかわらず、先端部にシリコンチューブを装着させたパスツールピペットを用いて、各マウスの胃内に注入した (マウス 1 頭当たりの投与数は上述のとおり約 400 隻)。投与マウスは経口投与後 69 日に剖検し、全身の骨格筋 (横隔膜および舌を含む) をまとめて細切後 (一部は骨格に付着したまま)、各群一括してプラスチック容器 (500 ミリリットル) に入れた。これに前述のペプシン塩酸液 (約 200 ミリリットル) を加え、37°C で 60 分間、振盪消化した。消化された筋肉は、目開きが 300 マイクロメートルの金属メッシュで濾過して骨片などの残渣を取り除いた。濾液はガラス製の円錐型液量計 (1.5 リットル) に集め、1 リットルの生食水を加えて、30 分間静置した。この上清を吸引除去し、そして除去と同量の生食水を加える洗浄操作を、上清が清澄となるまで 4 回繰り返した。そして、沈査をプラスチックシャーレ (径 9 cm) に移し、実体顕微鏡下に観察して、幼虫をパスツールピペットで回収した。

回収された幼虫は、全数を 500 ミリリットルの容器 (プラスチック製、蓋付き)

に移し、生食水を加えて液量を 200 ミリリットルとした。これをよく攪拌した後、2 ミリリットルをシャーレに移し、実体顕微鏡下に全幼虫を計数した。この作業を 4 回繰り返した (2 ミリリットルの幼虫含有液を別途に 4 個調製して、各溶液の虫体を計数したことになる)。得られた数値 (平均) は 5 頭分 (群 1) あるいは 4 頭分 (群 2、実験投与した 5 頭のうち 1 頭は試験中に衰弱・安楽殺した) に由来する値であるので、この数値を 20 倍 (100÷5 倍、群 1) あるいは 25 倍 (100÷4 倍、群 2) することで、各群のマウス 1 頭に寄生する全虫体数 (平均) を算出した。なお上述の人工消化と幼虫回収の術式は、食品衛生検査指針 (日本食品衛生協会、2018) を主な参考資料とした。また加熱のための具体的な手法に関しては、本研究班の令和元年度報告書に記載の方法を踏襲した。

C. 研究結果

(1) 加熱処理群 (群 1 : 75°C で 1 分間の加熱)

旋毛虫幼虫が検出された。検出虫体数は 1 頭平均にすると 176 隻であった (図 1)。

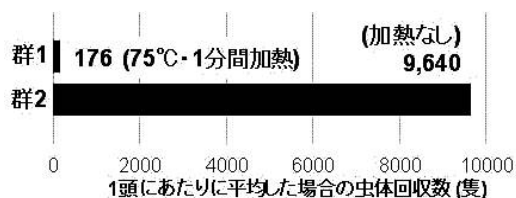
(2) 非加熱処理群 (群 2 : 陽性対照)

旋毛虫幼虫が検出された。検出虫体数は 1 頭平均にすると 9,640 隻であった (図 1)。

D. 考察

今回の検討の結果、わが国で旋毛虫食中毒の原因物質となった *Trichinella* T9 の幼虫に 75°C で 1 分間の加熱を直接的に加えた場合、一部の幼虫はマウスに感染し、

図 1. 加熱処理した旋毛虫 *Trichinella* T9 の感染試験・マウスからの回収幼虫数



a) ddY 系・雄・5 週齢のマウスを感染実験に使用した(剖検時の頭数は群 1 が 5 頭, 群 2 は 4 頭).

b) 幼虫投与後 69 日に剖検, 各群のマウスは全頭の骨格筋を一括してペプシン塩酸液で人工消化し, 虫体を回収した.

その腸管内で雄成虫あるいは雌成虫に発育、そして雌成虫は雄成虫と交接して幼虫を産出し、その幼虫が筋肉から検出されるとの結果が追認された。今後の課題として、虫体に直接的に加熱するのではなく、喫食前の調理条件と同じように、筋肉中の虫体に例えば 75°C で 1 分間の加熱を施し、その条件が守られているかを中心温度で確認しつつ、加熱に対する本虫の耐性を改めて検討する必要がある。旋毛虫食中毒の予防に必要な加熱の条件を、調理の現場を想定して確認する必要があると示唆されたことから、現在、その検討に向けての準備を進めている。

E. 結論

わが国で発生したクマ肉喫食による旋毛虫食中毒の病因物質 *Trichinella* T9 を用いて、本虫の感染性を消失させる加熱条件を、マウスを用いた感染試験で再検討した。その結果、幼虫を直接的に 75°C で 1 分間加熱する条件では、マウスへの感染性が完全には消失しないことが追認された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

杉山 広、森嶋康之、児玉文宏、北海道札幌市において 2019 年に発生した旋毛虫集団食中毒事例、Clin Parasitol 2020. 31: 49-51.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 ; 2. 実用新案登録
ともになし

令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）
「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究」
分担研究報告書

北東北3県のクマおよびイノシシにおける旋毛虫の寄生状況調査

分担研究者	杉山 広	（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者	森嶋康之	（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者	村上正樹	（国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者	常盤俊大	（日本獣医生命科学大学獣医学部）

研究要旨

北東北3県で捕獲されたツキノワグマ22頭について旋毛虫の寄生状況を調べたところ、岩手県で2020年12月に捕獲されたツキノワグマ1頭の舌から、旋毛虫 *Trichinella* T9の幼虫が検出された。その他の検体は旋毛虫陰性であった。また秋田県から提供を受けたイノシシの検体・5件も同様に検査したが、旋毛虫陰性であった。

A. 研究目的

クマ肉の喫食を原因とする旋毛虫食中毒の集団事例が、わが国で最近連続して3件発生した（2016年12月に茨城県、2018年5月および2019年11月に北海道）。これらの事例では、いずれもクマ（ヒグマ）の肉が原因食品であった。一方、わが国で初めて発生した旋毛虫食中毒も、クマ（ツキノワグマ）の肉を原因食品とする患者数15名の集団事例であり、1974年に青森県から報告された。北東北からはその後の調査で、岩手県のクマから旋毛虫の幼虫が検出されている。したがって北東北に生息するクマも、北海道のクマと同様に、旋毛虫食中毒の原因となる危険性があると考えられた。本研究では北東北3県のツキノワグマを対象に、本虫の寄生状況を地域別に調べた。検査材料には本虫の好寄生部位である舌を用いた。また秋田県から提供されたイノシシの舌についても、同様の検査を実施した。

B. 研究方法

1) 北東北3県のツキノワグマにおける旋毛虫の幼虫寄生状況調査

青森県では深浦町農林水産課に要請し、また秋田県では地域振興局に要請して、合計20頭分（青森県4頭および秋田県16頭）の材料の提供を受けた。岩手県では猟友会に所属する協力者から2頭分の材料の提供を受けた（図1）。これらのツキノワグマは、2020年4月から12月に各地で捕獲された個体で、解体時に分離された舌が検査時まで冷凍保存された。検査にあたって検体は、個体別に人工消化し、舌中の旋毛虫幼虫の検出を試みた。なお検査は、本研究班の令和元年度報告書に記載した方法を踏襲し、舌の消化に当たっては旋毛虫検査キット（PrioCHECK *Trichinella* AAD, Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ, 米国）を使用した。

線虫の幼虫が検出された場合は、幼虫の形態学的特徴の詳細、特に食道における食

道腺細胞（スティコサイト）の有無を確認した。形態観察のあと、幼虫からDNAを調製し、リボソームDNAのITS2領域を対象とする既報のプライマーペア（Kanai *et al.*, 2006）でPCR増幅した。増幅産物は常法に従いダイレクト・シーケンシングし、得られた配列をblast検索して、旋毛虫種を決定した。

2) 秋田県のイノシシからの旋毛虫幼虫検出の試み

クマの舌と同様の方法でイノシシの舌・5頭分を検査し、旋毛虫の寄生状況を調べた。

C. 研究結果

1) 北東北3県のツキノワグマにおける旋毛虫の幼虫寄生状況調査

岩手県紫波郡紫波町で2020年12月に捕獲されたツキノワグマ（雌、年齢不詳）の舌から旋毛虫幼虫が検出された（写真1）。検出された虫体には、いずれも食道腺細胞（スティコサイト）が縦列して連続するステイコゾーム構造が明らかであった。

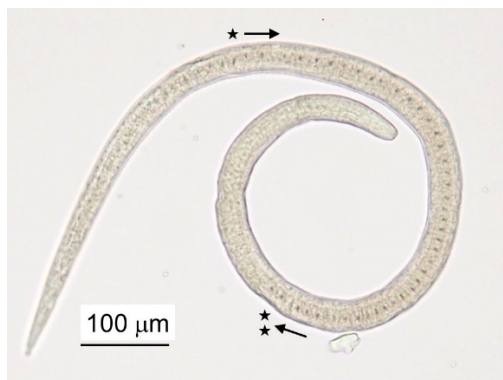


写真1 岩手県紫波郡紫波町で捕獲されたツキノワグマの舌から得た旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫。写真中の★から★★は、食道腺細胞（スティコサイト）が縦列して連続する「ステイコゾーム構造」を示す。

検出虫体を用いた分子同定の結果、この幼虫はわが国固有の旋毛虫種である *Trichinella* T9 と同定された。一方、青森県の4検体および秋田県の16検体、さらに岩手県の残りの1検体は、旋毛虫の幼虫陰性であった。

2) 秋田県のイノシシからの旋毛虫幼虫検出の試み

今回検査した5頭のイノシシの舌検体は、旋毛虫の幼虫陰性であった。

D. 考察

北東北3県で捕獲されたツキノワグマ22頭のうち、岩手県で2020年12月に捕獲されたツキノワグマ1頭の舌から、旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫が検出された。岩手県のツキノワグマに旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫が寄生することは、2003年および2006年に捕獲されたクマ試料の検査で既に明らかにされていたが、同県のクマには現在も本虫の寄生が継続していることが明らかとなった。しかもクマから検出された旋毛虫の種類は *Trichinella* T9 の幼虫であり、加熱に対してある程度の耐性を有する。クマ肉の喫食にあたっては十分加熱するように啓発を強化する必要がある。

わが国の野生動物からの旋毛虫検出に関しては、クマ（ツキノワグマおよびヒグマ）以外からも報告がある。動物種および検出された地域は、キツネ（北海道）、タヌキ（北海道、山形県）、アライグマ（北海道）である。山形県に隣接する秋田県では、クマに加えて、イノシシの試料提供も受け、旋毛虫の検査を試みた。しかし検体数が5件に留まったこともあり、検査結果は総て陰性であった。イノシシとシカは東北地方

でも、野生鳥獣として肉の積極的な利用が図られている。今後も検査材料の提供を要請し、旋毛虫の寄生状況についての検査を継続する予定である。

E. 結論

北東北3県で捕獲されたツキノワグマ22頭について旋毛虫の寄生状況を調べたところ、岩手県で2020年12月に捕獲されたツキノワグマ1頭の舌から、旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫が検出された。しかし青森県と秋田県のクマ検体は、いずれも旋毛虫陰性であった。また秋田県ではイ

ノシシの試料・5検体も提供を受けたので検査したが、いずれも陰性であった。

F. 健康危険情報

なし

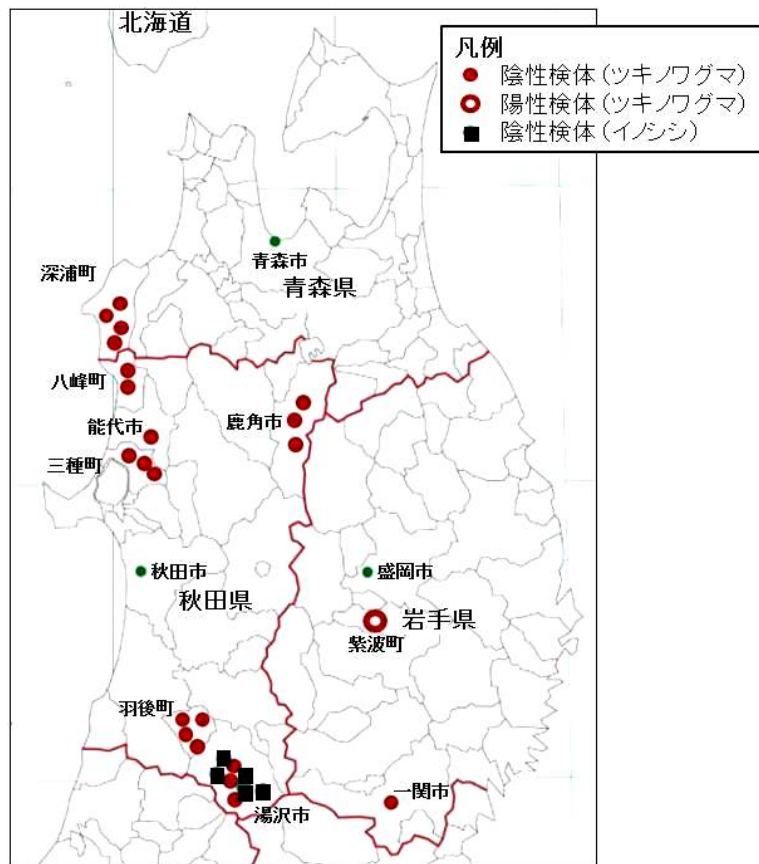
G. 研究発表

1. 論文発表；2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含む）

1. 特許取得；2. 実用新案登録 なし

図1 北東北3県の地図、ツキノワグマおよびイノシシの捕獲地を示す。岩手県紫波郡紫波町（中抜き丸印）で捕獲されたツキノワグマから旋毛虫 *Trichinella* T9 の幼虫を検出した。



令和2年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）
「野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究」
分担研究報告書

イノシシの筋肉から検出した肺吸虫幼虫とイノシシの感染源に関する検討

分担研究者 杉山 広 （国立感染症研究所寄生動物部）
研究協力者 森嶋康之 （国立感染症研究所寄生動物部）

研究要旨

肺吸虫症は現在も症例報告が続く重要な寄生虫症で、淡水産のカニやイノシシ肉が感染源となる。今回の調査検討により、鹿児島県産だけでなく大分県産のイノシシの筋肉からも、ウェステルマン肺吸虫の幼虫が検出された。鹿児島県では、陽性イノシシが生息する地区の河川から、本虫のメタセルカリア陽性のサワガニとモクズガニが採集され、イノシシへの感染源になっていると考えられた。

A. 研究目的

肺吸虫症は現在も症例報告が続く動物由来の食品媒介寄生虫症である。従来から患者が多い九州では、第2中間宿主の淡水産カニよりも、待機宿主であるイノシシの肉を喫食して感染する事例が多く、野生鳥獣肉の喫食に伴う健康被害の例となっている。我々は既に、鹿児島県で食用に捕獲されたイノシシの筋肉を調べ、ウェステルマン肺吸虫の幼虫の寄生を証明して、イノシシ肉を生や不十分な加熱で喫食することは非常に危険であると報告した (Sugiyama *et al.*, 2015)。しかしイノシシ肉の喫食による肺吸虫食中毒の事例は、その後も九州から報告がある。そこで鹿児島県に加えて、大分県で捕獲されたイノシシの筋肉も検査し、改めて肺吸虫幼虫の検出に取り組み、検出された幼虫の種同定に努め、健康被害に関連する情報の補強に努めた。さらに陽性イノシシが捕獲された鹿児島県阿久根市で、イ

ノシシへの肺吸虫の感染源となる淡水産カニを採集し、肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を調べた。淡水産カニの検査が、肺吸虫に対するイノシシの安全性を保証するための有力な方法にならないかを考察した。

B. 研究方法

検査材料のイノシシは、2014年9月から2016年1月までに鹿児島県で捕獲された24頭、および2015年1月から2016年5月までに大分県で捕獲された6頭で、その体幹部筋肉を検索対象とした。検査した肉の重量は1頭当たり70～1,200g（平均301g）であった。これらの筋肉を細切し、生理的食塩水（37℃）に浸漬して虫体の遊出を促す「遊出法」により、肺吸虫の幼虫の検出を試みた。検出された各幼虫からDNAを調製し、リボソームDNAのITS2領域を標的にPCR増幅を行い、アンプリコンを用いたダイレクト・シーケンシングで配列を解読、

blast 検索により肺吸虫の種類を決定した。ウェステルマン肺吸虫であった場合は、ミトコンドリア DNA の 16S リボソーム DNA を標的に PCR 増幅を行い、シーケンシングの結果から、染色体構成が 2 倍体型か 3 倍体型かを判別した。さらに陽性イノシシが捕獲された鹿児島県阿久根市の河川で、2014 年 9 月から 2019 年 9 月までにサワガニおよびモクズガニを採集して 1 匹ずつ検査し、肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を調べた。検出されたメタセルカリアは上述の方法を適用して、肺吸虫の種類と染色体型を決定した。

C. 研究結果

1) イノシシからの肺吸虫幼虫の検出

鹿児島県では検査した 24 検体のうち 6 検体から、肺吸虫の幼虫が計 11 隻検出された。大分県では検査した 6 検体のうち 3 検体から、肺吸虫の幼虫が計 6 隻検出された。虫体はいずれも体長が 1~2mm で、検出時には生理食塩水中で伸縮しながら活発に運動した。これらの虫体は ITS2 領域のシーケンシングの結果、すべてウェステルマン肺吸虫と同定された。さらにミトコンドリア DNA・16S リボソーム DNA のシーケンシング結果から、鹿児島県から検出されたウェステルマン肺吸虫はすべて 3 倍体型で、大分県から検出されたウェステルマン肺吸虫はすべて 2 倍体型であることが明らかになった (表 1)。

2) 淡水産カニからの肺吸虫メタセルカリアの検出

鹿児島県阿久根市で採集されたサワガニは 941 匹で、15 匹 (寄生率 1.6%) から合計 24 個の肺吸虫メタセルカリアが検出された。

モクズガニは 95 匹が採取され、21 匹 (22%) から合計 84 個のメタセルカリアが検出された。これらのメタセルカリアは、すべてウェステルマン肺吸虫の 3 倍体型と分子同定された (表 2)。

D. 考察

今回の検討から、鹿児島県産だけでなく大分県産のイノシシの肉からも、ウェステルマン肺吸虫の幼虫が検出された。しかし鹿児島県のは 3 倍体型であったのに対し、大分県のは 2 倍体型であった。染色体構成に応じて、ウェステルマン肺吸虫が人体感染した時に観察される主な呼吸器症状が異なることが指摘されている。すなわち、3 倍体型のウェステルマン肺吸虫が人体感染した場合は、肺に形成された虫嚢内で虫体が速やかに成熟することから、胸部 X 線等の画像では結節影や輪状影を認め、咳嗽や血痰が主徴となる。これに対して 2 倍体型のウェステルマン肺吸虫は、亜成虫として長期間にわたり胸腔内を移行するため、自然気胸、胸水貯留、胸痛などが主徴となる。同じウェステルマン肺吸虫に感染した場合でも、それが 2 倍体型か、3 倍体型かにより、観察される主な呼吸器症状が異なる点に注意する必要がある。今回の検討により、鹿児島県 (3 倍体型) と大分県 (2 倍体型) には異なる染色体型のウェステルマン肺吸虫が分布して、イノシシに感染していることが分かった。鹿児島県産だけではなく大分県産のイノシシの肉喫食によっても、ウェステルマン肺吸虫感染の危険性はある。ただし症状はイノシシの捕獲地 (染色体型) により異なるので、このような詳細な情報を医療関係者に提供する必要性が示唆された。

待機宿主のイノシシは、本虫の第2中間宿主である淡水産カニ（サワガニあるいはモクズガニ）を摂食して感染する。イノシシがメタセルカリア陽性のカニを摂食すると、虫体は肺に移行せず、幼虫のままで筋肉内に長期間寄生する（蓄積される）ことが知られている。このようなイノシシ体内での幼虫の移行や発育に関しては、染色体構成による差異はほとんど認められない。イノシシは人に対する本虫の感染源として、重要な役割を果たすことになる。

今回の調査により、イノシシから3倍体型のウェステルマン肺吸虫が検出された鹿児島県阿久根市の流行地で、モクズガニおよびサワガニから本虫のメタセルカリアが検出された。その地域のイノシシにおけるウェステルマン肺吸虫の寄生状況は、第2中間宿主である淡水産カニを調べることで推定できる可能性が示唆された。淡水産カニを対象に、肺吸虫メタセルカリアの寄生状況を調べる検査は容易である。淡水産カニのウェステルマン肺吸虫検査が、ジビエの安全性を保証する有用で簡便な代替法にならないか、今後は大分県のイノシシの捕獲地などでも検討したいと考えている。

E. 結論

大分県のイノシシの筋肉を調べたところ、ウェステルマン肺吸虫2倍体型の幼虫が検出された。鹿児島県で陽性イノシシが生息する地区のサワガニおよびモクズガニから、ウェステルマン肺吸虫3倍体型メタセルカリアが検出されたことから、これらのカニがイノシシへの感染源になっていると考えられた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Banzai A, Sugiyama H, Hasegawa M, Morishima Y, Kawakami Y. *Paragonimus westermani* metacercariae in two freshwater crab species in Kagoshima Prefecture, Japan, as a possible source of infection in wild boars and sika deer. J Vet Med Sci, 83(3): 412-418, 2021. doi: 10.1292/jvms.20-0576

2. 学会発表

1. 坂西梓里、杉山 広, 森嶋康之, 川上 泰. 鹿児島県阿久根市の淡水産カニにおける肺吸虫幼虫の寄生状況調査と試験感染ネコから得た成虫の形態, 第89回日本寄生虫学会大会, 2020/05/30 (とちぎプラザ, 帯広, 誌上報告)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 ; 2. 実用新案登録
ともになし

表 1. 鹿児島県および大分県産イノシシからの肺吸虫幼虫の検出成績(陽性例のみ抽出)

番号	検査年月	性別	体重(kg)	捕獲地	検体重量(g)	検出虫体数	同定結果*
1	2014. 9.	オス	30	鹿児島県	205	2	Pw(3n)
2	2014. 10.	メス	40		150	2	
3	2014. 10.	オス	59		210	1	
4	2015. 2.	メス	50		230	1	
5	2015. 2.	オス	36		300	1	
6	2016. 1.	オス	31		175	4	
7	2015. 10.	メス	25	大分県	870	2	Pw(2n)
8	2016. 3.	メス	50		1, 200	3	
9	2016. 5.	メス	25		400	1	

* Pw(2n): ウェステルマン肺吸虫(2倍体型) ; Pw(3n): 同(3倍体型)

表 2. 鹿児島県阿久根市で採集したサワガニおよびモクズガニからのウェステルマン肺吸虫 3 倍体型メタセルカリアの検出成績

カニの種類	検査数	陽性数	陽性率(%)	検出 Mc 総数
サワガニ	941	15	1.6	24
モクズガニ	95	21	22.1	84

Mc: メタセルカリア

令和2年度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)

「野生鳥獣由来食肉の安全性確保とリスク管理のための研究」

分担研究報告書

わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された枝肉の拭き取り調査

研究分担者 壁谷 英則 (日本大学生物資源科学部獣医学科)

研究協力者 森田 聡志、山原 絹子、石井香菜、鈴木綾乃、田中裕梨

(日本大学生物資源科学部獣医学科)

研究要旨

令和2年度は、過年度から引き続き、わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された鹿、ならびに猪枝肉の枝肉拭き取り調査を実施した。さらに、本研究事業最終年度であることから、本研究期間中に実施した全ての拭き取り検査材料の成績を集計し、枝肉の衛生状態に影響を与える処理工程における要因を検討した。わが国の野生鳥獣肉処理施設のうち、鹿5施設(新規2施設)、猪3施設でそれぞれ処理された洗浄前の鹿枝肉59検体、および猪枝肉計9検体について、それぞれ胸部、および肛門周囲部から拭き取りを実施し、一般細菌数、大腸菌群数、大腸菌数、および黄色ブドウ球菌数を計測した。その結果、1)「剥皮」と「内臓摘出」の作業順別では鹿、および猪において、「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理されたものは、「内臓摘出」→「剥皮」の順に処理されたものに比べ有意に高度に一般細菌が検出されたこと、2)猪では、剥皮時に「のせ台」を用いた場合には、懸吊する場合に比べ、全ての指標細菌が多く検出された。わが国の野生鳥獣肉処理施設A、Bで処理された鹿計5頭について、各処理工程における作業員、器具、と体等から拭き取りを行い、衛生指標細菌数を計測した。その結果、①主要な細菌汚染源は、蹄、肛門周囲、胃内要物、剥皮・内臓摘出時の手指、ナイフであること②表皮洗浄は菌数減少に効果的であること③大腸菌は肛門周囲の他蹄からも検出されることが明らかとなった。わが国の野生鳥獣肉処理施設Aで処理され、熟成した鹿枝肉について、熟成前後の衛生指標細菌数の計測と、病原細菌の検出を行ったところ、熟成により一般細菌数は増加したが、有意差は認められなかった。検討した全ての病原細菌は分離されなかった。以上のことから、本研究で対象とした施設Aにおいては、衛生的な解体処理、ならびに熟成処理が行われているものと考えられた。

A. 研究目的

近年、わが国では鹿や猪などの野生鳥獣の生息数増加に伴い、農作物や自然植生への被害が深刻化している。これに対して、国は野生鹿や猪の捕獲を推進し、令和元年度の環境省の統計では、鹿60万頭、猪64万頭が狩猟、

および有害鳥獣捕獲などその他で捕獲されている。このような捕獲頭数は近年右肩上がりに上昇して推進されている。これに伴い、令和元年度の農林水産省の報告によると、鹿や猪による被害額は、それぞれ53億円および46億円で、近年は減少傾向にある。さらに捕獲され

た鹿や猪を食用に活用する試みが進められているが、これら野生鳥獣肉を原因とする食中毒事例の発生が危惧される。厚生労働省は「野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドライン」を策定、令和2年5月には一部改正し、衛生管理の徹底を推進している。具体的な作業手順を示すための科学的データの蓄積が求められている。

これまでに我々は、平成30—令和元年度本研究事業において、①「剥皮」と「内臓摘出」の作業順別では鹿において、「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理されたものは、「内臓摘出」→「剥皮」の順に処理されたものに比べ有意に高度に一般細菌が検出されたこと、②猪では、剥皮時に「のせ台」を用いた場合には、懸吊する場合に比べ、一般細菌が多く検出されたこと、③熟成後の猪検体から、病原細菌は全く検出されなかったこと、④一般細菌と腸内細菌科菌群は、熟成後のトリミング片に高度に検出されたこと、⑤猪肉の熟成後に増殖した細菌のほとんどは *Pseudomonas* 属菌であったこと、を明らかとしてきた。

わが国の一部の野生鳥獣の処理施設では、野生鳥獣肉を用いて熟成を行う試みがある。その処理方法、設備、器具、作業従事者の経験などにおいて非常に多様であるが、熟成肉の衛生状態に関わる検討は全くされていない。

以上のことから、令和2年度は、引き続き、わが国の野生鳥獣肉処理施設において処理された鹿肉や猪肉の拭き取り検体を用いて、衛生指標細菌（一般細菌、大腸菌群、大腸菌、ならびに黄色ブドウ球菌）数を計測して衛生状態を評価することで、異なる条件で解体処理された枝肉の衛生状態に関わる要因を検討した。

さらに、捕獲から解体処理に至る一連の工程において拭き取りを行い、衛生指標細菌を計測することにより、細菌汚染の原因となる工程について検討した。さらには、わが国の野生鳥獣肉処理施設 A で熟成処理された鹿肉を用いて、熟成前後における衛生状況を検討した。

B. 研究方法

1) わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された枝肉の衛生評価

2019年6月～2021年2月の間に、わが国の野生鳥獣肉処理施設（鹿20施設（表1）、猪20施設（表2））で処理された鹿枝肉224検体、猪枝肉計99検体について、枝肉洗浄前において、それぞれ胸部、および肛門周囲部から拭き取りを実施した。対象とした施設における、「剥皮」と「内臓摘出」の作業順、剥皮時の設備、剥皮方法、食道結紮/肛門結紮の有無、表皮洗浄方法、枝肉洗浄方法について、表1,2に示す。

各検体について、「枝肉の微生物検査実施要領（平成26年度）」（厚生労働省）に従い、各衛生指標細菌数を計測した。すなわち、各拭き取り材料から10倍階段希釈液を調整した。各検体の1ml量を、各条件につき2枚のペトリフィルム（ACプレート：一般細菌数用、ECプレート：大腸菌・大腸菌群数用、STXプレート：黄色ブドウ球菌用）にそれぞれ接種した。EC、およびSTX各プレートは35℃で24時間、ACプレートは35℃で48時間培養し、それぞれ形成されたコロニー数を計測した。

各衛生指標細菌数の比較には、Anderson-Darling 検定による正規性の検定を行った後、Mann-Whitney U 検定により行った。

2) 処理工程における拭き取り検体を対象とした衛生指標細菌数

2020年10月～12月の間に、わが国の野生鳥獣肉処理施設A、Bに搬入された鹿計5頭について、止め刺し、表皮洗浄前、表皮洗浄後、剥皮後、内臓摘出後、枝肉洗浄前、枝肉洗浄後、において、周辺環境、作業者手指、ナイフ、と体蹄、表皮正中、肛門周囲部、からの拭き取り(100cm²)、ならびに直腸便を採取した(図1)。

各検体について、B-1)に示す方法により、各種衛生指標細菌数を測定した。

さらに、各検体について、病原細菌として、腸管出血性大腸菌、同O157、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌、リステリア属菌の分離を「食品衛生検査指針(2018)」に従って行った。

3) 野生鳥獣由来熟成肉の衛生評価

2021年1月～2月の間に、わが国の野生鳥獣肉処理施設Aにて解体処理、ならびに熟成処理された鹿肉10頭(熟成前後各1検体、計20検体)を使用した。熟成前後に同一の個体から頸部肉片を採取した。なお、熟成の条件は2℃、7もしくは9日間で処理した。

各検体についてスマッカーで処理した後、検体を抽出し、B-1)に示す方法により、各種衛生指標細菌数を測定した。

C. 研究結果

1) わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された枝肉の衛生評価

本研究で対象とした施設(鹿21施設、猪20施設)では、それぞれ「剥皮」と「内臓摘出」の順番が異なるものであった(表1、2)。鹿では、21施設中16施設で、「剥皮」→「内臓摘出」

の順で作業していたが、5施設は「内臓摘出」→「剥皮」の順であった。これに対して、猪の処理では、20施設中12施設で、「剥皮」→「内臓摘出」の順、8施設は「内臓摘出」→「剥皮」の順であった。

剥皮時のと体は、鹿は全て懸吊していたが、猪では、のせ台、懸吊、および湯剥ぎの施設がそれぞれ4施設であった。また、剥皮方法は、鹿では、ウィンチによる牽引が5施設、手剥ぎが6施設であったが、猪では、1施設を除き、全て手剥ぎであった。

洗浄前において、鹿枝肉胸部;同肛門周囲部における一般細菌数の平均値(cfu/cm²)は、 5.5×10^2 ; 1.2×10^3 であった。大腸菌群数(cfu/cm²)の平均値は 1.1×10^1 ; 1.9×10^1 、大腸菌数(cfu/cm²)は、 1.1×10 ; 1.5×10 であった。黄色ブドウ球菌数(cfu/cm²)は、 2.8×10^{-1} ; 8.0×10^{-1} であった。一方、各菌数の中央値は、肛門周囲部一般細菌において 2.7×10^0 (cfu/cm²)であったが、その他全ての指標細菌において、いずれも0であった。

猪枝肉胸部;同肛門周囲部における一般細菌数の平均値(cfu/cm²)は、 2.1×10^3 ; 2.8×10^3 であった。大腸菌群数(cfu/cm²)の平均値は 9.3×10^0 ; 6.4×10^1 、大腸菌数(cfu/cm²)の平均値は 6.9×10 ; 6.3×10^1 であった。黄色ブドウ球菌数(cfu/cm²)は、 1.4×10^0 ; 5.2×10^0 であった。一方、一般細菌数の中央値(cfu/cm²)は、 3.4×10^1 ; 4.0×10^1 であった。大腸菌群数、大腸菌数の中央値は、いずれもudであった。黄色ブドウ球菌数の中央値は、胸部、肛門周囲部ともに、 1.0×10^{-1} cfu/cm²であった。

本研究で算出された一般細菌数は、Anderson-Darling検定により、正規分布しないことが確認されたことから、以降の解析では、

いずれも Mann-Whitney U 検定により行った。

剥皮と内臓摘出の作業順別に枝肉洗浄前の鹿胸部、肛門周囲部における各衛生指標細菌数の中央値を比較した結果、肛門周囲部の一般細菌数において、「剥皮」→「内臓摘出」(7.5×10^0 cfu/cm²)では、「内臓摘出」→「剥皮」(0 cfu/cm²)に比べ、有意 ($p < 0.01$) に高値であった(表 3)。また、その他の衛生指標細菌では、いずれも作業順により有意差は認められなかった。一方、猪では、「内臓摘出」→「剥皮」では、胸部;同肛門周囲部における一般細菌数の中央値(cfu/cm²)は、 1.5×10^1 ; 1.8×10^1 であったのに対し、「剥皮」→「内臓摘出」では、 1.0×10^2 ; 2.9×10^2 で有意 ($p < 0.01$) に高い値となった(表 4)。大腸菌群数、大腸菌数の中央値はいずれも 0 であったが、胸部の大腸菌群数では、「内臓摘出」→「剥皮」に比べ、「剥皮」→「内臓摘出」で有意 ($p < 0.05$) に高い値となった。黄色ブドウ球菌数の中央値(cfu/cm²)は、胸部;同肛門周囲部、いずれの作業順においても 1.0×10^{-1} で、「剥皮」と「内臓摘出」の作業順別において有意差は認められなかった。

剥皮時に、枝肉を「のせ台」に乗せて剥皮する施設と、「懸吊」して剥皮する施設に分けて、猪枝肉の洗浄前の胸部;肛門周囲部における一般細菌数の中央値(cfu/cm²)を比較した結果、「のせ台」では、 3.7×10^1 ; 1.8×10^2 、「懸吊」では、 1.3×10^1 ; 9.6×10^0 で、「のせ台」で処理した枝肉の肛門周囲部は、「懸吊」のそれに比べ、有意 ($p < 0.01$) に高値であった(表 5)。大腸菌群数、大腸菌数の中央値(cfu/cm²)は、いずれも 0、胸部;肛門周囲部における黄色ブドウ球菌数の中央値(cfu/cm²)は、 2.0×10^{-1} - 3.0×10^{-1} でいずれも「のせ台」で処理した枝肉の肛門周囲部は、「懸吊」のそれに

比べ、有意 ($p < 0.01$) に高値であった。一方、鹿では、検討した全ての施設において、「懸吊」により剥皮を行っていたため、比較はできなかった。

剥皮時に、「ウインチ」を使用する施設と、「手剥ぎ」により実施する施設に分け、鹿枝肉の洗浄前の胸部;肛門周囲部における一般細菌数の中央値(cfu/cm²)を比較したところ、「ウインチ」では、 4.0×10^0 : 1.3×10^1 であったのに対し、「手剥ぎ」ではいずれも 0 と有意 ($p < 0.01$) に低値を示した(表 6)。大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌の中央値(cfu/cm²)は、いずれも 0 で、「手剥ぎ」は「ウインチ」に比べ、有意 ($p < 0.01$) に低値であった。一方、猪では、胸部;肛門周囲部における一般細菌数の中央値(cfu/cm²)は、「ウインチ」では、 1.0×10^2 ; 3.1×10^2 、「手剥ぎ」では、 1.3×10^1 ; 1.8×10^1 、「湯剥ぎ」では 4.1×10^2 : 5.9×10^2 で、「手剥ぎ」は、他に比べ有意 ($p < 0.05$) に低値を示した(表 7)。大腸菌群、大腸菌、黄色ブドウ球菌の中央値は、 $0 \sim 1.8 \times 10^0$ で、「湯剥ぎ」の大腸菌群は他に比べ有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。

2) 処理工程における拭き取り検体を対象とした衛生指標細菌数

「止め刺し現場」は、施設 B で 1 回の採材のみであったが、一般細菌数(cfu/cm²)は 2.3×10^2 、大腸菌(cfu/cm²)は 5.0×10^{-2} であった(表 8)。

「表皮洗浄前」では、「蹄」の一般細菌数(cfu/蹄)は $2.1 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^5$ 、大腸菌数は(cfu/蹄)は $0 \sim 2.4 \times 10^2$ であった。「腹側正中」の一般細菌数(cfu/cm²)は $2.2 \times 10^1 \sim 2.2 \times 10^4$ 、大腸菌数は(cfu/cm²)は $0 \sim 1.0 \times 10^{-1}$ であった。「肛門周囲部」の一般細菌数(cfu/cm²)は

1.9x10²~6.9x10³、大腸菌数は(cfu/cm²)は2.0x10⁰~1.2x10²であった。

「表皮洗浄後」では、「蹄」の一般細菌数(cfu/蹄)は0~5.2x10⁵、大腸菌数は(cfu/蹄)は0~1.2x10⁴であった。「腹側正中」の一般細菌数(cfu/cm²)は1.4x10⁰~5.4x10²、大腸菌数は(cfu/cm²)はすべて0であった。「肛門周囲部」の一般細菌数(cfu/cm²)は1.7x10¹~2.0x10⁴、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~4.6x10¹であった。「胃内容物」は、施設Bで1度、施設の汚染が確認され、一般細菌数(cfu/cm²)は6.4x10³、大腸菌数は(cfu/cm²)は2.3x10⁰であった。

「剥皮後」では、「作業者の手指」の一般細菌数(cfu/手)は7.5x10³~9.5x10⁴、大腸菌数は(cfu/手)は0~9.9x10²であった。「ナイフ」の一般細菌数(cfu/ナイフ)は5.5x10¹~1.8x10⁴、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~1.2x10²であった。

「内臓摘出後」では、「作業者の手指」の一般細菌数(cfu/手)は4.5x10¹~6.7x10⁴、大腸菌数は(cfu/手)は0~3.0x10¹であった。「ナイフ」の一般細菌数(cfu/ナイフ)は3.0x10²~1.3x10⁵、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~4.0x10¹であった。

「枝肉洗浄前」の、「床」の一般細菌数(cfu/cm²)は1.8x10⁰~5.6x10³、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~1.5x10⁻¹であった。「壁」の一般細菌数(cfu/cm²)は0~5.0x10⁻¹、大腸菌数は(cfu/cm²)はすべて0であった。「胸部」の一般細菌数(cfu/cm²)は0~8.0x10⁻¹、大腸菌数は(cfu/cm²)はすべて0であった。「肛門周囲部」の一般細菌数(cfu/cm²)は2.0x10⁻¹~6.4x10¹、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~2.0x10²であった。

「枝肉洗浄後」の、「胸部」の一般細菌数

(cfu/cm²)は0~4.5x10⁻¹、大腸菌数は(cfu/cm²)はすべて0であった。「肛門周囲部」の一般細菌数(cfu/cm²)は0~2.3x10¹、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~3.3x10⁰であった。

3) 野生鳥獣由来熟成肉の衛生評価

「熟成前」の一般細菌数(cfu/cm²)は5.0x10¹~4.0x10³、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~5.0x10⁰であった。「熟成後」の一般細菌数(cfu/cm²)は3.2x10¹~8.5x10³、大腸菌数は(cfu/cm²)は0~1.0x10⁰で、有意差は認められなかった。

また、検討した全ての検体からは、検討したいずれの病原細菌も分離されなかった。

D. 考察

本研究で対象とした施設で実施されている処理方法は、表1、2に示すとおり多様性を示した。本研究では、特に、「剥皮」と「内臓摘出」の作業順、剥皮時の設備(のせ台、あるいは懸吊)、ならびに剥皮方法(ウインチ、手剥ぎ、猪では湯漬け)の違いに着目し、鹿、および猪枝肉の汚染指標細菌数を比較することにより、各工程の作業順や方法が枝肉の衛生状況に与える影響について検討した。

剥皮と内臓摘出の作業順では、ガイドラインで指示されている「剥皮」→「内臓摘出」の順番と、「内臓摘出」→「剥皮」の順番でそれぞれ処理された枝肉について、細菌汚染状況を比較した。その結果、本研究では、鹿、猪ともに「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理された枝肉からは、「内臓摘出」→「剥皮」の順で処理された枝肉に比べ、一部(鹿の胸部)を除き、有意に高い一般細菌数の値を示した。これは、剥皮を先に行うことで、作業者が剥皮後の枝肉に、汚染した手指で直接、あるいは間接的に

接触する機会が多くなったためである可能性がある。剥皮後に枝肉と接触することにより細菌に汚染する可能性について、改めて作業者に啓蒙する必要がある。

剥皮時の設備については、本研究で対象とした鹿の施設では全てにおいて「懸吊」を行っていたために、比較検討は行わなかった。一方、猪では、「のせ台」を用いて剥皮を行った施設で処理された枝肉は、「懸吊」して剥皮した枝肉に比べ、検討した全ての衛生指標細菌において、一部(胸部の一般細菌)を除いて、全て多く検出された。以上のことから、「のせ台」を使用して剥皮する場合には、「懸吊」して剥皮を行う場合に比べ、より高頻度に作業中に汚染した手指や表皮などを介して枝肉に細菌が汚染する可能性が考えられた。懸吊装置の導入を推進するとともに、「のせ台」で剥皮をする際には、より一層細菌汚染を回避するように意識して作業するよう、指導する必要があると考えられた。

剥皮法別の比較では、鹿、猪ともに、「ウインチ」を用いて剥皮する方法で剥皮した枝肉は、「手剥ぎ」で剥皮したものに比べ、高度に一般細菌数に汚染していた。特に、鹿では、大腸菌群、および黄色ブドウ球菌においても同様の差が認められた。「ウインチ」を用いた場合には、剥皮の際に、表皮に汚染した土壌や細菌が舞い散る可能性が考えられ、土壌由来の細菌や、表皮に由来する黄色ブドウ球菌がより高度に汚染した可能性が考えられる。特に「ウインチ」を用いた剥皮の際には、慎重に行い、周辺環境を汚染させないようにすることが重要であると考えられた。また、猪を処理する一部の施設では、「湯剥ぎ」が行われている。厳密には、「湯剥ぎ」では、剥皮されておらず、表皮は残存しており、表皮表面の被毛が取り除か

れるものの、残存する表皮表面の毛穴や皮膚の小さな溝などに、細菌が残存する可能性がある。このため、「湯剥ぎ」した枝肉では、高度に一般細菌数が検出されたものと考えられた。

本研究により、一連の処理工程において、改めて細菌汚染源と考えられるものとして、蹄、表皮、胃内要物、肛門周囲部、は多くの一般細菌や大腸菌が検出されることが明らかとなった。また、表皮洗浄前に比べ、表皮洗浄後では、各箇所において、一般細菌数、大腸菌数の著しい減少が認められたことから、鹿や猪の解体処理施設への搬入前に、十分な洗浄を行うことの重要性が、改めて示された。同時に、一部の検体では、表皮洗浄後においても、蹄、肛門周囲部において多くの一般細菌が残存するものも認められたことから、蹄は剥皮前に切除すること、また、肛門周囲部には多くの細菌が残存することを考慮しながら剥皮を行うことが重要である。さらに、剥皮作業中、ならびに内臓摘出作業中では、各作業により作業者の手指、ならびに使用したナイフ表面に多くの細菌が汚染することも確認され、各作業中の汚染ごとの温湯消毒、ならびに手指洗浄が重要であることが確認された。

糞便汚染の指標となる大腸菌については、特に肛門周囲部から多く検出されることが改めて確認された。しかしながら、その他にも、特に蹄からも多く検出されたことから、剥皮作業前には、蹄を除去することが重要であると思われた。さらに、剥皮作業、および内臓摘出作業においても、作業者の手指やナイフからも大腸菌が検出されたことから、これらを介して枝肉に糞便汚染させる可能性があることが改めて確認された。

最終的な枝肉の胸部、および肛門周囲部は、いずれも $2.3 \times 10^1 \text{cfu/cm}^2$ 以下となり、家畜

(牛や豚)に比べても極めて低値を示したことから、本研究で対象とした施設 A、および B では、極めて衛生的に解体処理が行われていることが確認された。

本研究で対象とした施設では、4℃でおよそ 2 週間静置するにより熟成を行っている。本研究で検討した猪肉はいずれも熟成前から一般細菌が検出され、熟成後には同菌数の上昇が確認された。一方、一部から大腸菌群や黄色ブドウ球菌が検出されたものの、大腸菌は全く検出されなかった。さらに、検討したその他の病原細菌についても、全て検出されなかった。以上のことから、当該施設で実施している熟成工程において、病原細菌の増殖は起こっていないものと考えられた。一般に、熟成により、食肉に含まれる自身の消化酵素により、蛋白質などの分解がおこり、うま味や風味が高まることが期待される。一方で、牛肉の熟成肉の表面から、リステリアなどの低温細菌が検出された事例が報告されており、十分なトリミングが必須である。本研究においては、リステリアを含む検討した全ての病原細菌は、検出されなかったが、多くの一般細菌、ならびに黄色ブドウ球菌が検出された検体も認められたことから、熟成後には十分トリミングを行う必要がある。

本研究では、施設 A で行われている熟成による枝肉における細菌動態を検討するために、同じ個体について熟成前後で一般細菌数、ならびに大腸菌数を比較した。その結果、一般細菌数において、熟成後に増加した傾向が認められたものの、有意差は認められなかった。当該施設における熟成の条件は、2℃で 7~9 日間処理している。2℃条件下でも、低温細菌の一部は増殖しているものと考えられた。今後、熟成前に検出された細菌叢を解析し、汚染の由来を検討する必要がある。さらに、熟成後に、

増殖した細菌叢を解析し、熟成中に増殖する細菌を特定する必要がある。特に食肉の腐敗に關与する *Pseudomonas* 属菌は低温細菌であり、昨年度の本研究において、今回けんきゅう対象とした施設とは異なる施設で処理された枝肉から検出されている。今後、このような腐敗細菌の汚染状況について検討する必要がある。

本研究では、熟成前、後、いずれにおいても、検討した全ての検体において、病原細菌は検出されなかった。熟成の効果として、乳酸菌の増殖による他の有害細菌の増殖を防ぐことが期待されている。今後、熟成による効果として、有害細菌による汚染モデルを作成し、その増殖抑制効果等を検討する必要がある。

E. 結論

1) 鹿、猪ともに「剥皮」→「内臓摘出」の順で処理された枝肉からは、「内臓摘出」→「剥皮」の順で処理された枝肉に比べ、一般細菌数が多く検出された。

2) 猪では、剥皮の際「のせ台」を用いた場合は、「懸吊」する場合に比べ、各種衛生指標細菌数が多く検出された。

3) 鹿、猪ともに、剥皮の際に「手剥ぎ」に比べ、「ウィンチ」を用いて行くと、細菌汚染を受けやすいことが明らかとなった。

4) 解体処理工程において、搬入前の表皮洗浄は極めて効果的に細菌数を減少させた。

5) 解体処理工程における細菌汚染源として、表皮、蹄、肛門周囲、胃内容物などが考えられた。

6) 一連の工程の内、特に、「剥皮工程」、「内臓摘出工程」では、作業者の手指、およびナイフに高度に細菌汚染されることが確認された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi, T., Kabeya, H., Sato, S., Yamazaki, A., Kamata, Y., Taira, K., Asakura, H., Sugiyama, H., Takai, S., Maruyama, S. Prevalence of *Yersinia* among wild sika deer (*Cervus Nippon*) and boars (*Sus scrofa*) in Japan. J. Wildl. Dis. 56(2):270-277, 2020.
- 2) Mizukami M, Sato S, Nabeshima K, Kabeya H, Ueda D, Suzuki K, Maruyama S. Molecular survey of *Bartonella rochalimae* in Japanese racoon dogs (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). J Wildl Dis. 56(3):560-567, 2020
- 3) Nabeshima K, Sato S, Kabeya H, Kato C, Suzuki K, Maruyama S., Isolation and genetic properties of *Bartonella* in eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. Infect Genet Evol 83:104354. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104354. Epub 2020 May 5
- 4) Nabeshima K, Sato S, Kabeya H, Komine N, Nanashima R, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Suzuki K, Maruyama S. Detection and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from bat flies on eastern bent-wing bats (*Miniopterus fuliginosus*) in Japan. Comp Immunol

Microbiol Infect Dis. 73:101570. doi: 10.1016/j.cimid.2020.101570. Epub 2020 Oct 25.

- 5) Sato S, Kabeya H, Ishiguro S, Shibasaki Y, Maruyama S. Lipoptena fortisetosa as a vector of Bartonella bacteria in Japanese sika deer (*Cervus nippon*). Parasit Vectors.;14(1):73. doi: 10.1186/s13071-021-04585-w. , 2021.

2. 学会発表

- 1) 鍋島 圭、佐藤 真伍、壁谷 英則、丸山 総一 高速シーケンサーを用いたコウモリ由来 *Bartonella* の病原関連遺伝子の探索 第163回日本獣医学会学術集会(山口大学(web開催)、2020年9月8~10日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他(書籍)
 - 1) 壁谷英則(分担執筆者)、これからの日本のジビエ、2.ジビエの安心・安全、pp150-162、緑書房、2020

表1 本研究で対象とした鹿処理施設における処理方法等の概要

施設	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	
内臓/剥皮の順	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	内臓/剥皮	剥皮/内臓	内臓/剥皮	内臓/剥皮	剥皮/内臓	内臓/剥皮	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓
器具/のせ台	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具	器具
剥皮法	手剥ぎ	ワイン	手剥ぎ	ワイン	ワイン	ワイン	手剥ぎ	手剥ぎ	ワイン	ワイン	ワイン	手剥ぎ	手剥ぎ	ワイン	手剥ぎ	ワイン	手剥ぎ	ワイン	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ
皮膚洗浄方法	水道水	水道水	水道水	水道水	電解水	電解水	水道水	毛抜き	水道水	水道水	湯湯	水道水	水道水	水道水	電解水	水道水	水道水	水道水	水道水	水道水	水道水	水道水
筋肉洗浄方法	次亜塩素酸水	オゾン水	水道水	電解水	電解水	脱性水	パーナール	次亜塩素酸水	電解水	次亜塩素酸水	電解水	次亜塩素酸水	水道水	電解水	電解水	電解水	電解水	オゾン水	電解水	オゾン水	電解水	

表2 本研究で対象とした猪処理施設における処理方法等の概要

施設	A	E	F	G	H	J	K	N	O	P	Q	S	V	W	X	W	Z	AA	AB	AC	
内臓/剥皮の順	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	内臓/剥皮	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓	剥皮/内臓
器具/のせ台	のせ台	のせ台	のせ台	器具	のせ台	のせ台	器具	のせ台	器具	のせ台	器具	器具	のせ台	器具	のせ台	のせ台	器具	器具	のせ台	のせ台	
剥皮法	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	湯湯	ワイン	湯湯	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ	ワイン	手剥ぎ	手剥ぎ	手剥ぎ
皮膚洗浄方法	水道水	水道水	水道水	毛抜き	水道水	湯湯	水道水	電解水	水道水	水道水	水道水	水道水	水道水	水道水	水道水	電解水	湯湯	水道水	水道水	水道水	毛抜き
筋肉洗浄方法	次亜塩素酸水	電解水	脱性水	パーナール	次亜塩素酸水	電解水	次亜塩素酸水	電解水	電解水	電解水	電解水	電解水	次亜塩素酸水	×	×	湯湯	脱性水	水道水	電解水	エタノール	

止め刺し現場/周辺土壌



表皮洗浄前/肛門周囲部



枝肉洗浄前/床



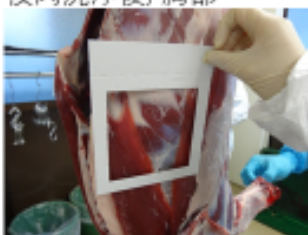
表皮洗浄前/蹄



剥皮後/作業者(手指)



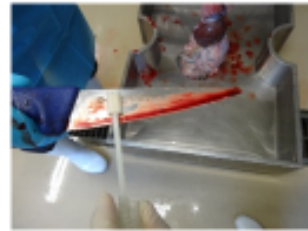
枝肉洗浄後/胸部



表皮洗浄前/腹側正中



内臓摘出後後/ナイフ



枝肉洗浄後/肛門周囲部

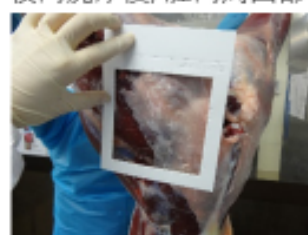


図1 わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された各鹿処理工程における拭き取りの様子

表3 鹿枝肉の拭き取り検体における衛生指標細菌数（内臓摘出/剥皮 作業順別）

作業順	検体数 (頭)	値	胸部				肛門周囲部			
			一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)	一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)
内臓摘出 剥皮	114	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	8.8×10 ²	8.8×10 ²	7.9×10 ⁰	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	1.3×10 ¹
		平均値	7.6×10 ²	7.9×10 ⁰	1.0×10 ¹	4.0×10 ⁻¹	1.2×10 ³	1.4×10 ¹	1.6×10 ¹	4.0×10 ⁻¹
		中央値	0	0	0	0	0**	0	0	0
剥皮 内臓摘出	110	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	3.2×10 ¹	2.5×10 ⁴ <	9.1×10 ²	9.7×10 ²	6.2×10 ¹
		平均値	3.4×10 ²	1.4×10 ¹	1.4×10 ¹	1.0×10 ⁻¹	1.1×10 ³	1.6×10 ¹	2.2×10 ¹	1.2×10 ⁰
		中央値	0	0	0	0	7.5×10 ⁰ **	0	0	0

**p<0.01

表4 猪枝肉の拭き取り検体における衛生指標細菌数（内臓摘出/剥皮 作業順別）

作業順	検体数 (頭)	値	胸部				肛門周囲部			
			一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)	一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)
内臓摘出 剥皮	73	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	2.6×10 ²	2.6×10 ²	5.5×10 ¹	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ²
		平均値	1.5×10 ³	8.9×10 ⁰	6.8×10 ⁰	1.5×10 ⁰	2.8×10 ³	8.5×10 ¹	8.5×10 ¹	6.3×10 ⁰
		中央値	1.5×10 ¹ **	0	0*	1.0×10 ⁻¹	1.8×10 ¹ **	0	0	1.0×10 ⁻¹
剥皮 内臓摘出	26	最小値	5.5×10 ⁰	0	0	0	4.5×10 ⁰	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	1.7×10 ²	1.7×10 ²	1.7×10 ¹	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ¹	1.5×10 ¹	2.6×10 ¹
		平均値	3.8×10 ³	9.5×10 ⁰	8.0×10 ⁰	1.1×10 ⁰	3.2×10 ³	2.1×10 ⁰	1.6×10 ⁰	2.1×10 ⁰
		中央値	1.0×10 ² **	0	0*	0	2.9×10 ² **	0	0	1.0×10 ⁻¹

*: p<0.05, **: p<0.01

表5 猪枝肉の拭き取り検体における衛生指標細菌数（剥皮設備別）

剥皮設備	検体数（頭）	値	胸部				肛門周囲部			
			一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)	一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)
のせ台	57	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	2.6×10 ²	2.6×10 ²	6.9×10 ⁰	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ²
		平均値	2.2×10 ³	1.5×10 ¹	1.3×10 ¹	8.0×10 ⁻¹	3.8×10 ³	1.1×10 ²	1.1×10 ²	7.9×10 ⁰
		中央値	3.7×10 ¹	0*	0*	2.0×10 ⁰ -1*	1.8×10 ² **	0**	0**	3.0×10 ⁻¹ *
懸吊	42	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	5.0×10 ⁰	5.0×10 ⁰	5.5×10 ¹	2.5×10 ⁴ <	7.3×10 ⁰	6.5×10 ⁰	2.6×10 ¹
		平均値	1.9×10 ³	4.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	2.3×10 ⁰	1620.6	4.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	1.5×10 ⁰
		中央値	1.3×10 ¹	0*	0*	0*	9.6×10 ⁰ **	0**	0**	0**

*: p<0.05, **: p<0.01

表6 鹿枝肉の拭き取り検体における衛生指標細菌数（剥皮法別）

剥皮法	検体数（頭）	値	胸部				肛門周囲部			
			一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)	一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)
ウィンチ	96	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	1.7×10 ²	2.0×10 ¹	7.8×10 ⁰	2.5×10 ⁴ <	1.7×10 ²	4.4×10 ¹	1.5×10 ¹
		平均値	9.1×10 ²	3.6×10 ⁰	2.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹	1979.3	3.8×10 ⁰	1.1×10 ⁰	8.0×10 ⁻¹
		中央値	4.0×10 ⁰ **	0	0*	0**	1.3×10 ¹ **	0	0**	0**
手剥ぎ	128	最小値	0	0	0	0	0	0	0	0
		最大値	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	7.9×10 ⁰	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	6.2×10 ¹
		平均値	2.8×10 ²	1.9×10 ¹	1.9×10 ¹	1.0×10 ⁻¹	5.9×10 ²	3.0×10 ¹	2.5×10 ¹	8.0×10 ⁻¹
		中央値	0**	0	0*	0**	0**	0	0**	0**

*: p<0.05, **: p<0.01

表7 猪枝肉の拭き取り検体における衛生指標細菌数（剥皮法別）

剥皮法	値	検体数 (頭)	胸部				肛門周囲部			
			一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)	一般細菌 (cfu/cm ²)	大腸菌群 (cfu/cm ²)	大腸菌 (cfu/cm ²)	黄色 ブドウ球菌 (cfu/cm ²)
フィンチ	最小値	15	6.9×10 ⁰	0	0	0	7.7×10 ⁰	0	0	0
	最大値		2.5×10 ⁴ <	4.6×10 ⁰	0	5.5×10 ¹	6.8×10 ³	7.3×10 ⁰	1.9×10 ⁰	8.2×10 ⁰
	平均値		2.3×10 ³	5.0×10 ⁻¹	0	4.0×10 ⁰	9.7×10 ²	8.0×10 ⁻¹	1.0×10 ⁻¹	1.2×10 ⁰
	中央値		1.0×10 ² *	0	0	0	3.1×10 ² *	0	0	2.0×10 ⁻¹
手剥ぎ	最小値	74	0	0	0	0	0	0	0	0
	最大値		2.5×10 ⁴ <	2.6×10 ²	2.6×10 ²	1.7×10 ¹	2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ³ <	1.5×10 ²
	平均値		1.8×10 ³	1.1×10 ¹	9.2×10 ⁰	1.0×10 ⁰	3.3×10 ³	8.5×10 ¹	8.4×10 ¹	6.7×10 ⁰
	中央値		1.3×10 ¹ *	0	0	1.0×10 ⁻¹	1.8×10 ¹ *	0	0	0
湯剥ぎ	最小値	10	5.5×10 ⁰	0	0	0	5.8×10 ⁰	0	0	0
	最大値		2.5×10 ⁴ <	1.5×10 ¹	1.5×10 ¹	3.2×10 ⁰	1.4×10 ⁴	1.5×10 ¹	1.5×10 ¹	1.8×10 ⁰
	平均値		4.5×10 ³	6.1×10 ⁰	2.7×10 ⁰	8.0×10 ⁻¹	2.2×10 ³	4.7×10 ⁰	3.3×10 ⁰	5.0×10 ⁻¹
	中央値		4.1×10 ² *	0	1.8×10 ⁰	1.0×10 ⁻¹	5.9×10 ²	0	0	1.0×10 ⁻¹

*: p<0.05

表8 わが国の野生鳥獣肉処理施設で処理された各鹿処理工程における衛生指標細菌数

工程	採取部位	一般細菌							大腸菌						
		A1	A2	A3	A4	B1	B2	平均	A1	A2	A3	A4	B1	B2	平均
上の剥し	裏面半球	nt.	st.	nt.	nt.	2.3x10 ²	nt.	2.3x10 ²	st.	nt.	st.	st.	5.0x10 ⁻²	st.	5.0x10 ⁻²
表皮洗浄前	肉*	nt.	2.5x10 ³	1.6x10 ⁴	2.3x10 ³	2.1x10 ²	1.3x10 ³	9.8x10 ⁻⁴	st.	2.4x10 ²	1.0x10 ¹	1.0x10 ²	0	0	8.9x10 ¹
	腰肉正中	nt.	2.2x10 ⁴	1.2x10 ³	1.5x10 ³	1.7x10 ²	2.2x10 ¹	3.3x10 ³	st.	1.0x10 ⁻¹	0	0	0	0	2.0x10 ⁻²
	紅門肉質	nt.	4.8x10 ²	1.6x10 ³	6.9x10 ³	2.0x10 ³	1.9x10 ²	2.4x10 ³	st.	5.3x10 ⁰	5.1x10 ¹	1.2x10 ²	2.0x10 ⁰	3.6x10 ¹	4.2x10 ¹
表皮洗浄後	肉*	1.4x10 ⁴	0	0	6.5x10 ³	9.3x10 ³	5.2x10 ³	9.1x10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	1.2x10 ⁴	2.0x10 ³
	腰肉正中	5.4x10 ²	2.6x10 ¹	1.4x10 ¹	1.4x10 ⁰	8.6x10 ⁰	1.1x10 ¹	9.9x10 ¹	0	0	0	0	0	0	0
	紅門肉質	1.2x10 ⁴	1.7x10 ¹	1.9x10 ²	2.3x10 ¹	1.8x10 ²	2.0x10 ³	3.3x10 ³	1.5x10 ²	0	4.0x10 ¹	1.3x10 ⁰	1.3x10 ¹	4.2x10 ¹	4.3x10 ¹
	肉内裏面	nt.	st.	nt.	nt.	st.	6.4x10 ³	6.4x10 ³	st.	nt.	st.	st.	nt.	2.3x10 ⁰	2.3x10 ⁰
削皮後	作業着(手)**	1.7x10 ⁴	1.6x10 ⁴	6.4x10 ⁴	9.5x10 ⁴	1.7x10 ⁴	7.5x10 ³	3.6x10 ⁻⁴	9.9x10 ²	2.5x10 ¹	0	0	1.0x10 ¹	0	1.7x10 ²
	ナイフ***	1.8x10 ³	1.8x10 ⁴	5.5x10 ¹	5.7x10 ³	1.6x10 ³	1.1x10 ²	4.5x10 ³	1.2x10 ²	0	0	0	0	0	1.9x10 ¹
肉割離した後	作業着(手)**	1.7x10 ⁴	6.7x10 ⁴	9.5x10 ³	2.1x10 ⁴	1.1x10 ³	4.5x10 ¹	1.9x10 ⁻⁴	3.0x10 ¹	0	0	0	0	0	5.0x10 ⁰
	ナイフ***	3.6x10 ⁴	1.5x10 ³	9.7x10 ⁻⁴	1.1x10 ³	9.5x10 ²	3.0x10 ²	6.2x10 ⁻⁴	4.0x10 ¹	0	2.0x10 ¹	1.5x10 ¹	0	0	1.3x10 ¹
枝肉洗浄前	圧	4.9x10 ⁰	6.4x10 ⁰	1.8x10 ⁰	2.1x10 ¹	2.7x10 ³	5.6x10 ³	1.4x10 ³	0	0	0	0	0	1.5x10 ⁻¹	2.3x10 ⁻²
	壁	0	0	0	0	5.0x10 ⁻²	5.0x10 ⁻¹	9.0x10 ⁻²	0	0	0	0	0	0	0
	局部	0	0	4.5x10 ⁻¹	8.0x10 ⁻¹	3.0x10 ⁻¹	0	2.6x10 ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0
	紅門肉質	9.4x10 ⁰	2.3x10 ¹	2.0x10 ⁻¹	6.4x10 ¹	9.0x10 ⁰	2.3x10 ⁰	1.8x10 ¹	2.0x10 ⁰	0	0	0	0	0	3.3x10 ⁻¹
枝肉洗浄後	局部	0	0	1.0x10 ⁻¹	4.5x10 ⁻¹	4.0x10 ⁻¹	1.0x10 ⁻¹	1.8x10 ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0
	紅門肉質	1.6x10 ⁻¹	0	0	5.0x10 ⁻²	1.4x10 ⁰	2.3x10 ¹	4.1x10 ⁰	0	0	0	0	0	3.3x10 ⁰	5.4x10 ⁻¹
肉俵	9.3x10 ³	1.0x10 ³	2.2x10 ¹	1.1x10 ³	2.0x10 ³	9.0x10 ³	2.8x10 ³	6.9x10 ³	8.3x10 ³	1.1x10 ³	st.	1.3x10 ³	6.9x10 ³	1.9x10 ³	

(cfu/cm²) *肉 : cfu/筋 **作業着(手) : cfu/手 ***ナイフ : cfu/1平 nt 検訂せず <10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵<

表9 鹿肉の熟成前後における衛生指標細菌数の推移

番号	一般細菌		大腸菌群		大腸菌		黄色ブドウ球菌	
	熟成前	熟成後	熟成前	熟成後	熟成前	熟成後	熟成前	熟成後
1	1.0x10 ²	8.2x10 ³	3.5x10 ⁰	0	3.5x10 ⁰	0	0	0
2	1.2x10 ³	8.5x10 ³	3.0x10 ⁰	3.0x10 ⁰	3.0x10 ⁰	0	0	0
3	1.8x10 ³	2.4x10 ³	7.0x10 ⁰	0	5.0x10 ⁰	0	0	0
4	1.0x10 ²	4.1x10 ²	1.0x10 ⁰	1.0x10 ⁰	1.0x10 ⁰	1x10 ⁰	0	0
5	2.5x10 ²	1.0x10 ²	0	0	0	0	0	0
6	6.6x10 ¹	3.6x10 ³	1.0x10 ⁰	5.0x10 ⁻¹	1.0x10 ⁰	0	0	0
7	5.0x10 ¹	1.1x10 ³	0	0	0	0	0	0
8	4.0x10 ³	3.2x10 ¹	3.0x10 ⁰	0	5.0x10 ⁻¹	0	0	0
9	4.1x10 ²	6.1x10 ²	1.0x10 ⁰	1.0x10 ¹	0	0	0	0
10	1.1x10 ³	5.1x10 ³	1.0x10 ⁰	5.0x10 ⁰	5.0x10 ⁻¹	0	0	0

猪肉製品における真菌酵母菌叢の探知に向けた研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 朝倉 宏

研究協力者 東京工業大学大学院 伊澤 和輝

麻布大学 小林 直樹

研究要旨

食肉を含む食品や食品加工・製造環境には真菌が多く存在し、異常増殖を呈した場合には、異味・異臭等を伴う腐敗を齎すことが知られる。特に熟成工程では真菌・酵母の増殖は不可避であり、そのリスク管理の在り方を検討する上では汚染実態の把握は欠かせない。利活用が推進されるジビエ食肉での真菌酵母汚染実態の多くは不明であることから、今後の効率的な真菌調査の実施に向けて、本年度は猪肉製品におけるハイスループットな真菌叢解析手法の確立に関する検討を行った。猪肉製品計25検体を対象として、従来手法である培養法、及び次世代シーケンス手法（NGS法）による真菌叢解析を実施し、両者の成績を比較した。その結果、従来の培養法に比べ、NGS法は簡便かつ難培養性の菌種であっても検出される効果的な手法であることが示されたほか、供試検体では酵母の占有率が極めて高く、*Malassezia*属菌等の医真菌学上必要な真菌種も高率に分布する特徴が明らかとなった。今後、本手法の活用により、真菌酵母汚染に関する実態把握をジビエ食肉の種別毎に把握することで、危害要因分析の充実に資するほか、リスク管理方法の妥当性評価、並びにジビエ食肉加工従事者の健康被害防止等に波及することが期待される。

A. 研究目的

食肉を含む食品や食品加工・製造環境には細菌のほか、真菌酵母も多く存在し、異常増殖を呈した場合には、異味・異臭等を伴う腐敗を齎すことが知られる。特に食肉については熟成が嗜好される現況にあるが、同工程における真菌酵母増殖は必然的に生じるものと考えられる。本分担研究では、昨年度迄に猪肉解体・加工施設における施設環境中での真菌酵母汚染実態を調査した上で、室内洗浄・湿度管理等による環境改善効果を評価し、特に高湿環境が招き得る真菌酵母の常在性が作業従事者に対する健康被害リスクとなりうる可能性を示した。

こうした背景を受けて、本年度は真菌酵母

による汚染が食品を介したヒトへの健康被害リスクとなりうる可能性を探索するための手法構築を主たる目的として、一般流通する猪肉製品を対象としたハイスループットな真菌叢解析手法に焦点を当てた検討を行い、培養法との比較を通じて考察を行った。

B. 研究方法

1. 猪肉製品検体及び前処理方法

国内で解体処理・加工され、一般流通する猪食肉製品計25製品を購入収集した。各製品から試験に供する検体として25gの肉片を採取し、PBS 20 mLと共にパルス式ホモジナイザー(Pulsifier、Microgen Bioproducts)

を用いて3分間ホモジナイズし、検体懸濁液を作製した。この懸濁液のうち500 µLを分取し、従来の培養法に供すると共に検体懸濁液残液全量を後述の次世代シーケンス法（以下、NGS法）による真菌叢解析のための核酸抽出に供した。

2. 培養法

上述の検体懸濁液500 µLをクロラムフェニコール0.01%加 potato dextrose agar（栄研化学）に塗抹し、25°Cで7日間好気培養を行った。培養後、形成された集落数を計測し、検体1gあたりの総真菌数を算出した。同時に、目視及び実体顕微鏡下での観察を通じ、集落外観性状を指標とした真菌・酵母類の分類を行い、分類群ごとの菌数を求めた。

2. NGS法による真菌酵母菌叢解析

上述の検体懸濁液残液全量を50 mL容遠沈管に加え、12,000 rpmで4°C・15分間遠心分離した。上清を除去後、NucleoSpin Soil（タカラバイオ）を用いて、付属のプロトコルに若干の変更を加えつつ、沈殿物よりDNA抽出を行った。溶解物全量に対して700 µLのSL1バッファー及び150 µLのSXバッファーを加え、転倒攪拌して懸濁させた。その後、同液をキット付属のカラムに移し、その後の操作は付属のプロトコルに従って行った。得られたDNAをテンプレートとして、rDNA-ITS1領域をターゲットとしたアンプリコンライブラリの作製を行った。PCRプライマーには、Forward（ITS1-KY01）：5'-CTHGGTCATTTAGAGGAASTAA-3'）及びReverse（ITS2-KY02）：5'-TTYRCTRCGTTCTTCATC-3'）¹⁾を用いた。PCR産物にインデックス配列およびアダプター配列を付加し、精製後に得られたアンプリコンライブラリをIllumina Hi-Seqに供し、シーケンス反応を行った。

得られたリードについては、prinseqソフトウェアを用いてアダプター配列を除去すると共に、QS>10を示す配列を抽出した。その後、両鎖のリードを連結し、配列情報を取得した。

得られたリード配列からQIIME2²⁾プラットフォーム上でDADA2³⁾を用い、代表配列を取得した。同代表配列をblast検索により、真菌ITS領域配列データベースである、UNITEデータベース⁴⁾に照合させることで真菌酵母菌叢としての分類（階層化）を行った。同結果から、元のリードの集計を行い、各検体における各真菌属の存在比率を算出した。

C. 研究結果

1. 培養法による真菌分布実態解析

猪肉製品供試検体について、まず培養法に基づく真菌酵母分布状況を表1に示した。全検体で酵母が総真菌数に対して、大きな比率を占め（73.6-100%）、総真菌数が多い検体ほどこの傾向は顕著であった。今回検討した検体では、産地や部位、形状による菌数分布傾向に差異は認められなかったものの、同一事業者由来の製品検体間では菌数分布は概ね一致を示した。

今回検討した検体では、真菌が非検出の検体または非常に少ない（<10 cfu/g）の検体は全体の44%を占めた。その要因としては今回試験に供した検体が予め冷凍状態であったため、付着真菌等が死滅し復元できなかったことが想定された。しかしながら、冷凍処理は真菌酵母の完全な死滅を招くことは想定し難く、高い菌数分布を示した検体については冷凍前段階で高い汚染菌数であった可能性が考えられた。

2. NGS法による真菌酵母菌叢解析結果

計25検体のDNA抽出物を鋳型として、ITS領域を増幅するためのPCR反応に供した結

果、7 検体 (R3-3、R3-8、R3-11、R3-34、R3-39、R3-40、R3-60) からのみ約 100-800 bp の増幅産物が得られた。NGS 法における PCR 増幅断片の有無と培養法による成績の関連性を図 1 に示した。PCR 増幅がみられなかった検体の多くは培養菌数も低い傾向にあることが確認され、PCR 増幅が認められなかった検体の多くは付着真菌酵母数が元来少なかったためと想定された。

次に NGS 法により得られた検体ごとの真菌酵母菌属の存在比率を図 2 に示した。これらのうち、検体 R3-3 については、繰り返し実験による再現性を確認するため、N=2 で検体を調整し (R3-3-1、R3-3-2)、NGS 法に供した。解析の結果、他の 6 検体に比べ、R3-3-1 及び R3-3-2 間で検出された真菌属及びそれらの各存在比率は高い類似性を示した。また、同一事業者で加工された 2 製品検体 (R3-39 及び R3-40) の結果も、他の 6 検体に比べて高い類似性を示し、加工施設環境或いは同環境での作業工程が真菌叢を決定づける一因である可能性が示唆された。

なお、全検体で酵母が占める割合は非常に高く、58.4-97.6%を占めた。この傾向は培養法の結果と概ね一致しており (表 1)、従来手法である培養法との間での相関性を裏付ける結果と捉えられた。

検出された真菌属のうち、酵母類としては、*Naganishia* 属菌、*Kurtzmaniella* 属菌及び *Debaryomyces* 属菌等環境に広域に分布し、水、土壌、植物、魚肉、家畜肉等からの検出報告のある酵母菌属が高い占有率をもって検出された。また、*Malassezia* 属菌、*Candida* 属菌、*Cryptococcus* 属および *Trichosporon* 属菌といったアレルギーや感染症を引き起こす医真菌学上重要な酵母も 50-100%と高頻度に検出され、中でも *Malassezia* 属菌および *Candida* 属菌は占有率が高い傾向にあることが確認された (図 2)。

真菌については、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属といった通常環境に多く分布する真菌や、昨年度までの調査結果において猪肉解体加工施設環境から多く検出された *Cladosporium* 属菌は、37.5-62.5%の頻度で検出されたが、菌叢全体に占める占有率は低い状況にあった (図 2) ため、これらの真菌が猪肉表面において異常発育した可能性は低いと考えられた。

D. 考察

本分担研究では、猪肉製品における真菌酵母汚染実態を調査するための手法として、NGS 法を構築すると共に、同法の正確性を従来の培養法と照らし合わせることで検討した。

培養法に基づく成績として、同一事業者由来の製品検体間では菌数分布は概ね一致した。製品の表示ラベルには異なる加工日が付されていたことから、2 検体間での菌数に係る共通性の背景には施設環境或いは作業工程の同一性が要因となった可能性が推察された。

また、同一製品検体を 2 検体 (R3-3-1 及び R3-3-2) 平行比較した結果、非常に類似性の高い真菌叢成績として示されたことは、本解析手法が猪肉製品表面に付着する真菌酵母菌叢探知手法として安定性を示すものと考えられた。

一方、今回供試した猪肉製品における真菌叢全体の傾向として、*Cladosporium* 属菌や *Aspergillus* 属菌といった解体・加工環境の室内から高頻度に検出される真菌の占有率は総じて低く、汚染を受けて以降、猪肉表面で異常増殖した可能性は低いと考えられた。但し、今回の供試検体は何れも真菌酵母が生育し得ない冷凍状態で輸送保管されたものであり、今後はチルド状態、特に熟成工程を経て二次加工・出荷される猪肉加工製品を対

象とした検証を行うことで、こうした健康被害を招き得る真菌が異常増殖する可能性を明確に示すことが必要と思われる。

また、猪肉製品検体より検出された真菌の一部には、作業従事者の健康被害を招き得ると想定される菌属も含まれた。一例としては、医真菌に属する *Malassezia* 属菌が挙げられる。本菌は NGS 法により高い占有率で検出された一方、培養法で汎用される PDA 培地等では発育を認めず、培養には選択培地を要することから、培養法のみで本菌の汚染状況を総合的に把握することは困難と思われる。この他、*Trichosporon* 属をはじめとして、感染性やアレルギー性のある真菌属も今回の NGS 法により高頻度に検出される実態がはじめて確認された。

更に、酵母は培養法による簡易同定が概して困難であり、汚染分布に資する簡便な調査手法として本研究で構築した NGS 法を、ジビエ食肉及び同施設環境における真菌・酵母の汚染実態調査へと活用することは、危害要因分析の対象として検討を進め、更に加工従事者及び消費者の健康被害予防に向けて取るべきリスク管理策の構築へと波及すると期待される。

更に、本年度検討成績として得られた真菌叢の特徴が、原料となる動物種、加工・販売施設の衛生状態、販売店の衛生状態等、何に大きく影響されるものであるかを今後明らかにすることも必要と思われる。その解明は、効果的なジビエ食肉の安全性及び関連施設における衛生的環境の向上につながり、年間を通じた室内環境調査及び精肉の真菌分布について、継続した調査を進める必要があると考えられた。

参考文献：

- 1) Toju H, et al. 2012. PLoS One. 7: e40863.
- 2) Caporaso et al. 2010. Nat Methods. 7:335-6

3) Callahan et al. 2016. Nat Methods. 13:581-583

4) Kõljalg et al. 2013. Mol Ecol. 21: 5271-77

E. 結論

猪精肉の真菌叢の調査手法として、NGS 法を構築し、簡便かつ難培養性の菌種も確実に検出できる効果的な手法であることを示した。本分担研究で供試対象とした猪肉製品では全体に占める酵母の割合は総じて高く、また *Malassezia* 属菌等の医学上重要な真菌も高頻度に分布する実態をはじめて把握できた。今後は、NGS 法を用いたジビエ食肉における真菌叢の網羅的な把握に資する研究を通じ、衛生管理上、真菌・酵母に由来する健康リスクを把握し、その管理に努めることが必要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し（投稿準備中）

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

表 1. 培養法による真菌数測定結果.

検体	事業者	猪肉の部位・形状	酵母数/g	真菌数/g	総真菌数/g
R3-3	A	モモ・スライス	1600 <	ND*	1600 <
R3-4	B	モモ・スライス	86.4	1.6	88.0
R3-5	B	モモ・スライス	6.4	3.2	9.6
R3-6	B	モモ・スライス	8.0	ND	8.0
R3-8	C	モモ・スライス	1600 <	ND	1600 <
R3-11	D	不明・不明	1600 <	ND	1600 <
R3-34	E	モモ・スライス	1600 <	32.0	1600 <
R3-36	F	ロース・スライス	3.2	ND	3.2
R3-39	G	モモ・スライス	192.0	68.8	260.8
R3-40	G	モモ・スライス	179.2	48.0	227.2
R3-41	H	モモ・スライス	48.0	3.2	51.2
R3-43	B	ロース・スライス	ND	17.6	17.6
R3-44	B	モモ・スライス	ND	ND	ND
R3-45	B	モモ・スライス	ND	ND	ND
R3-46	B	ロース・スライス	ND	ND	ND
R3-47	B	ロース・スライス	ND	ND	ND
R3-48	I	バラ・スライス	3.2	ND	3.2
R3-51	J	ロース・スライス	6.4	ND	6.4
R3-53	J	ロース・スライス	3.2	ND	3.2
R3-54	K	不明・スライス	1369.6	12.8	1382.4
R3-56	L	不明・スライス	1.6	1.6	3.2
R3-59	M	ロース・スライス	1600 <	25.6	1600 <
R3-60	N	ロース・スライス	550.4	86.4	636.8
R3-61	O	バラ・スライス	1600 <	ND	1600 <
R3-62	P	ミンチ	1600 <	1.6	1600 <

* ND, Not Detected.

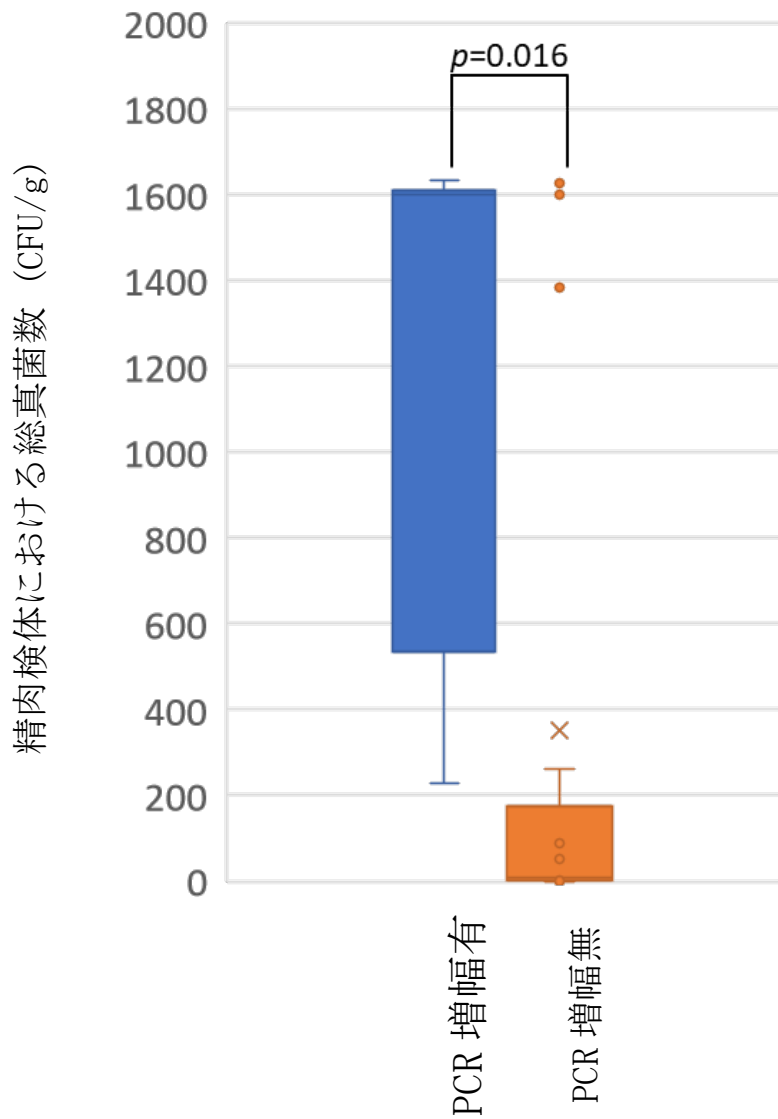


図 1. 猪肉製品検体における培養法による真菌数と NGS 法における PCR 増幅の有無との関連性.

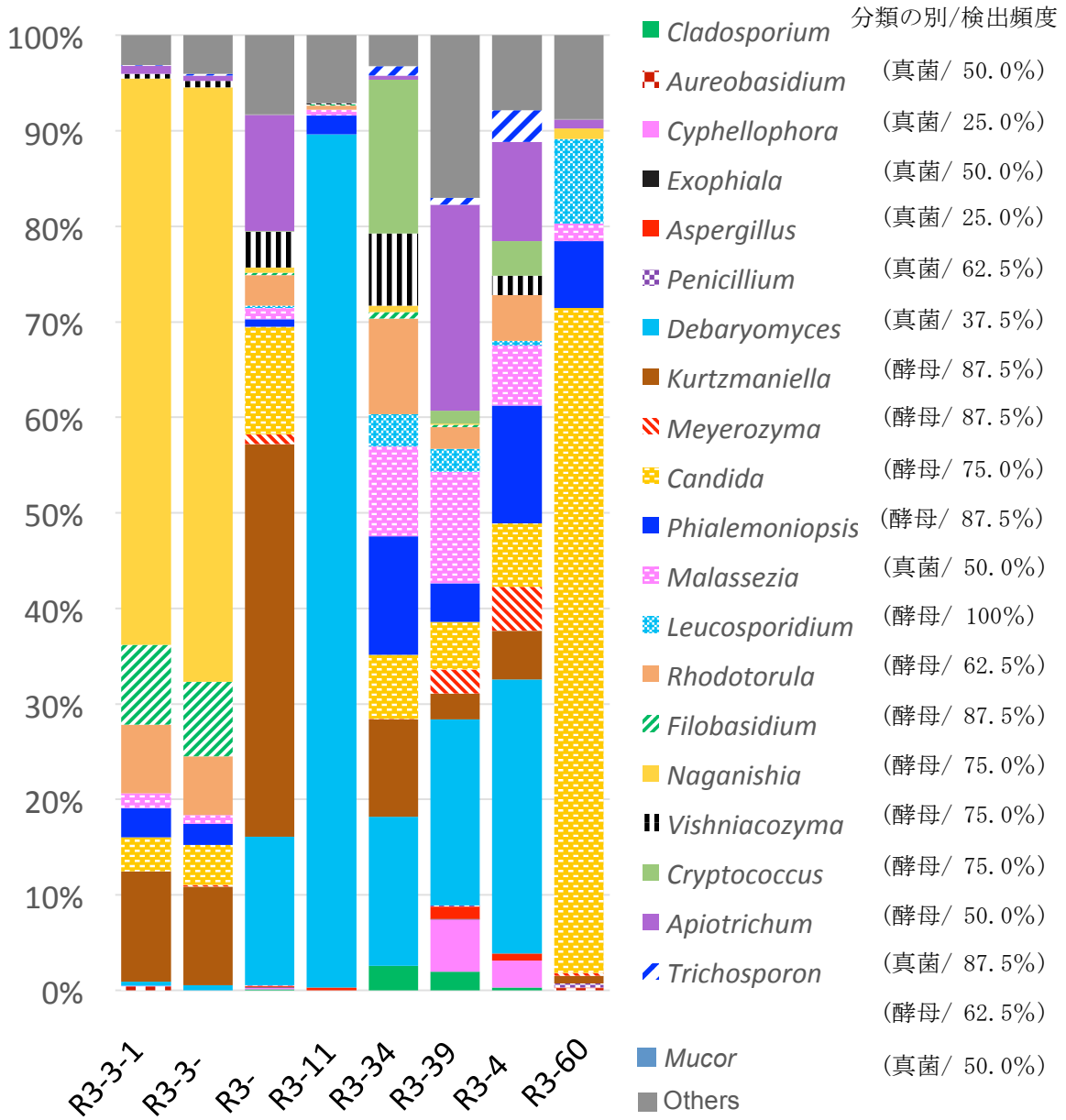


図 2. NGS 法による猪肉製品検体における真菌菌叢解析結果.
(バーチャート)

低温加熱処理を通じたE型肝炎ウイルスの不活化条件検討に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	米満研三	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	平井和也	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	前田 健	国立感染症研究所獣医科学部
研究協力者	山田 研	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	秋元真一郎	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
研究協力者	迫井千晶	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校

研究要旨

昨年度より、猪肉製品を用いた添加回収試験により、E型肝炎ウイルスの不活化に関する検討を開始した。本年度は、昨年度未検討の低温加熱条件によるE型肝炎ウイルスの不活化効果を検討すると共に、「厚生労働省 食肉の加熱条件に関するQ&A」で示される低温加熱処理を通じたE型肝炎ウイルスの感染力価を求めることで、供試した低温加熱条件の妥当性を評価することとした。まず、スチームコンベクションオープンを用いて猪肉を低温加熱調理（70℃3分、69℃4分、67℃8分、66℃11分）に供した際のE型肝炎ウイルスの不活化をリアルタイムPCR法により評価したところ、陽性対照（非加熱群）では平均 2.68×10^6 コピー数の同ウイルス遺伝子が検出されたのに対し、供試した全ての低温加熱群ではRNase処理後には同ウイルス遺伝子は検出されず、これらの加熱条件は概ね 10^4 コピー以上の同ウイルス不活化効果を示したことが想定された。また、低温加熱処理後のE型肝炎ウイルス懸濁液をAlexander細胞に接種し、4週間培養したところ、全ての加熱処理群から同ウイルス遺伝子は検出されず、また、蛍光免疫染色によってもウイルス抗原が検出されなかったことから、供試した低温加熱処理によりE型肝炎ウイルスは生残性を喪失したと考えられた。猪肉におけるE型肝炎ウイルスのように、病原微生物汚染実態については定量性をはじめ、依然として不明な点が多いため、定性・定量の両面から汚染実態に係る更なる情報の蓄積が必要と考えられる。また、野生鳥獣肉の加工・調理にあたっては、一定時間から成る塩蔵やマリネ等の前処理が行われる場合もあることから、こうした加工調理工程を通じた微生物の挙動についても安全性確保の観点から更に検討を進める必要がある。

A. 研究目的

近年の農林水産業をめぐる鳥獣被害の増加を受けて、野生鳥獣の食用としての利活用による鳥獣被害対策や地域活性化への取り組みが薦められている。農林水産省では、本年度に国産ジビエ認証制度を設け、ジビエの衛生的な利活用を推進している。食品としての安全確保に向けて、厚生労働省では平成26年11月に「野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドライン」を策定し、とちく場に倣った衛生的な取り扱いを周知したほか、本年度は日本ジビエ振興協会により、HACCP手引書

が作成された。一方、野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインでは、解体から調理に至るフードチェーン全体での衛生的取扱い方法について、詳細に例示されてはならず、各事業者が衛生的な取扱いを行う上では、科学的根拠に基づく実態の把握並びに衛生確保に資する情報の提供が求められている。

猪肉に潜在する危害要因としては、健康被害実態や生体の抗体保有率調査等から、E型肝炎ウイルスが想定されている。厚生労働省では、「野生鳥獣肉に関するQ&A」を2018年10月に発出しており、その中では「75℃、

1 分」と同等な加熱殺菌の条件として、「70℃、3 分」、「69℃、4 分」、「68℃、5 分」、「67℃、8 分」、「66℃、11 分」、「65℃、15 分」が妥当と考えられるとしている。これらの低温度帯での加熱調理(低温加熱調理)は、野生鳥獣肉の物性を踏まえ、汎用される傾向が増加していると解される。一方で、E 型肝炎ウイルスの加熱抵抗性については十分な知見がないため、これらの妥当性については検証が必要と考えられた。

こうした背景から、本分担研究では、昨年度より、低温加熱調理を通じた、猪肉における E 型肝炎ウイルスの生残性について検討を開始した。本年度は、昨年度未検討であった加熱条件(70℃3 分、69℃4 分、67℃8 分、66℃11 分)についての同ウイルスに対する不活化効果を評価すると共に、ウイルス不活化効果の評価法として、感染力価測定法を追加して、不活化のより詳細な評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 食品検体及び加熱調理条件

食品検体として用いた猪モモ肉は解体加工後、冷凍保存・輸送されたものを、4℃下で一晩自然解凍させた後、1 ブロックあたり約 80~100g となるよう、カットと真空包装を行ったものとした。

同食品検体の中心温度がそれぞれ「70℃3 分」、「69℃4 分」、「67℃8 分」、「66℃11 分」となるよう、予熱したスチームコンベクションオープン(ホシザキ MIC-5TB3、以下スチコン)内での加熱調理に供した。検体芯温が各設定温度に達した時点より、上記加熱条件を満たすまで加熱調理を行い、終了した時点で取り出し氷冷した。

2. E 型肝炎ウイルス添加回収試験

E 型肝炎ウイルス懸濁液を調整後、26G ニードル及びゴムシールを用いて各検体の中心部に接種した。同検体は、上項 1. に示した各条件に従って加熱調理後、滅菌ストマックカー袋(セントラル科学貿易)内で氷冷させた。滅菌鉢で検体全量を細切した後、検体の 3 倍重量の緩衝ペプトン水(BPW, Oxoid)を加え、1 分間ストマッキング処理を行った。これらを試験原液として、項 3 及び 4 で示す評価に供した。非加熱群・非接種群についても同様に試験原液を調整し、陽性対照・陰性対照とした。

3. リアルタイム PCR

各試験原液の RNase 処理及びウイルス RNA の精製は以下の方法によった。RNase 処理は、各試験原液に終濃度 20 μ g/ml となるように RNase A(ニッポンジーン)を添加し、37℃、1 時間処理した。その後、High Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いてウイルス RNA を抽出し、これを鋳型として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を合成した。THUNDERBIRD Probe qPCR Mix(ROYOBO)を用いてリアルタイム PCR を行った。条件は以下のとおりである。プライマーセット及び蛍光標識プローブとしては、JVHEV-F(5' -GGTGGTTTCTGG GGTGAC-3')、JVHEV-R(5' -AGGGGT TGGTTGGATGAA-3')、JVHEV-P(5' -FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ-3')を使用した。PCR 条件は初期変性を 95℃、60 秒、サイクリングは変性を 95℃、15 秒、伸長を 60℃、30 秒として 40 サイクルとした。

4. 感染力価測定試験

項 2 で調整した試験原液 100 μ L を高グルコース DMEM 培地(含 10%FCS 及びペニシリン・ストレプトマイシン)で培養した Alexander

細胞に接種し、28日間CO₂インキュベーター内で培養した（この間、培地は3-4日ごとに半量を交換した）。培養後、上清・細胞中のウイルスRNAはMaxwell RSC viral total nucleic acid purification Kit (Promega) または CellAmp Direct RNA Prep Kit (TaKaRa Bio)を用いて抽出し、項3で示すリアルタイムPCR法に供した。平行して、培養後の細胞を固定し、抗E型肝炎ウイルスORF2抗体を用いた免疫蛍光染色法により同ウイルス抗原の検出を行った。

C. 研究結果

1. 低温加熱調理を通じたE型肝炎ウイルスの生残性に関する遺伝学的評価

「厚生労働省 野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱調理条件のうち、昨年度未検討であった条件（70°C3分、69°C4分、67°C8分、66°C11分）によるE型肝炎ウイルスの消長を評価した。RNase処理後の陽性対照（非加熱群）におけるE型肝炎ウイルスの遺伝子コピー数は 2.68×10^6 であったのに対し、上記の4条件で低温加熱調理を行った検体では、何れも同ウイルス遺伝子が検出されなかった。

2. 低温加熱調理を通じたE型肝炎ウイルスの生残性に関する生物学的評価

上述の加熱条件に加え、「厚生労働省 野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱調理条件で処理を行った検体懸濁液をAlexander細胞に接種し、28日間培養を行った。その後、培養上清及び細胞中のRNA抽出し、リアルタイムPCR法に供したところ、陽性対象（非加熱群）は上清・細胞中よりそれぞれ 2.4×10^4 コピー/反応、 1.8×10^6 コピー/反応として検出されたが、低温加熱処理検体を接種した群はいずれも同ウイルス

遺伝子不検出を示した（図1）。加えて、培養14及び28日後に免疫蛍光染色法によるウイルス抗原の検出を試みたところ、全ての低温加熱処理検体はリアルタイムPCR法と同様にウイルス抗原は不検出となったが、陽性対象は培養14日後の段階であっても検出され（図2）、同法による感染力価測定が培養時間の短縮に有用となる可能性が示された。

D. 考察

猪肉におけるE型肝炎ウイルスの汚染可能性は数多くの同動物生体における侵淫状況から示唆されている。こうした背景から、猪肉の喫食にあたっては十分な加熱調理が求められている。一方、野生鳥獣肉の調理に際しては、低温度帯での加熱調理が汎用されている実態を鑑み、本研究では猪肉を低温加熱調理した場合のE型肝炎ウイルスの消長を評価し、結果として「厚生労働省野生鳥獣肉に関するQ&A」で示される低温加熱条件は何れもE型肝炎ウイルスの不活化に一定の有効性を示すことが明らかとなった。

過去の文献情報では用いるウイルス株により耐熱性には差異があることも想定されるため、異なるウイルス株を用いた同様の評価を行うことも今後必要と思われる。こうした評価にあたって、最終的には生物活性である感染力価の評価は必須と考えられるが、その評価には感染時間が長い本ウイルスの性質を考慮すると、より増殖能の高いウイルス株の調整や、高感度な評価方法の設定等が今後検討すべき事項と思われる。その意味において、本研究で見出された、免疫蛍光染色法の有用性は後者の事項に寄与するものと考えられる。

また、野生鳥獣肉の加工調理にあたっては、塩蔵やマリネ等といった前処理が行われることも多い。従って、こうした前処理過程を

通じた病原微生物の動態についても今後精査することが、総合的な生物的危害要因の制御にあたって求められる科学的知見になるものと考えられる。

E. 結論

低温加熱調理を通じた猪肉中での E 型肝炎ウイルスの消長を検討し、「厚生労働省野生鳥獣肉に関する Q&A」で示される低温加熱条件は何れも E 型肝炎ウイルスの不活化に一定の有効性を示すことが明らかとなった。また、同ウイルスの感染力価を評価するための手法として蛍光免疫染色法の有用性を示唆する知見を得た。今後は合理的なウイルス評価系の設定に係る検討を進めると共に、加工調理工程での病原微生物の動態把握のための検討を進めることで、野生鳥獣肉の安全性確保に向けた総合的な科学的知見の集積にあたりたい。

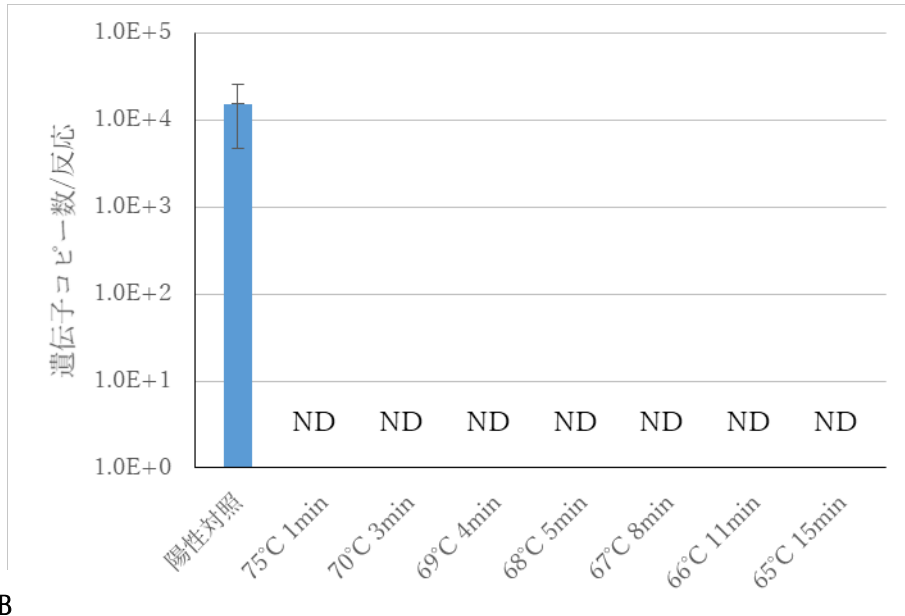
F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

A



B

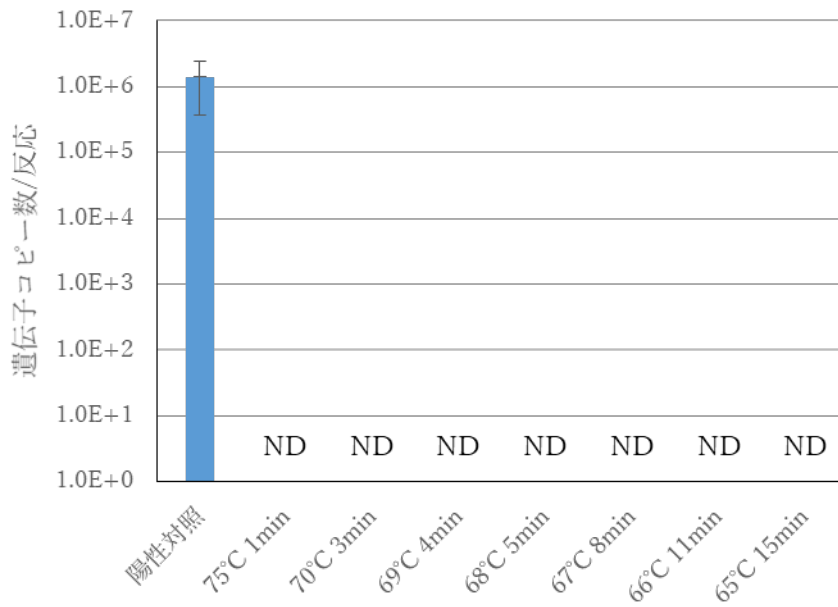
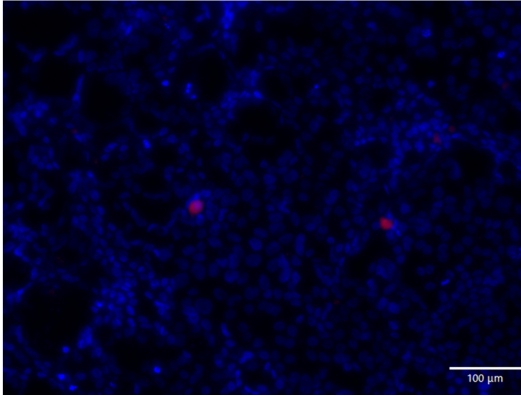
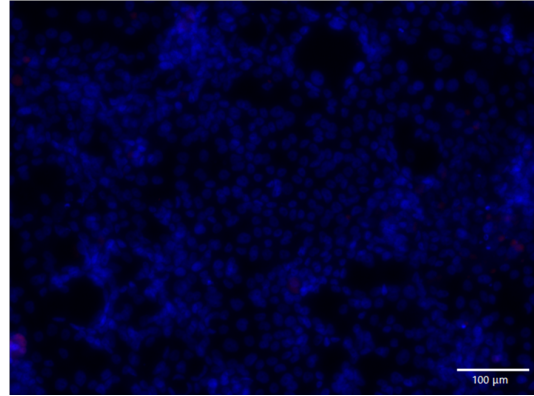


図1. Alexander 細胞における E 型肝炎ウイルス遺伝子の検出状況.
 低温加熱処理後の検体懸濁液を上記細胞に接種し、28 日間培養した後の上清 (A) 及び細胞 (B) における E 型肝炎ウイルス遺伝子をリアルタイム PCR 法により検出した。

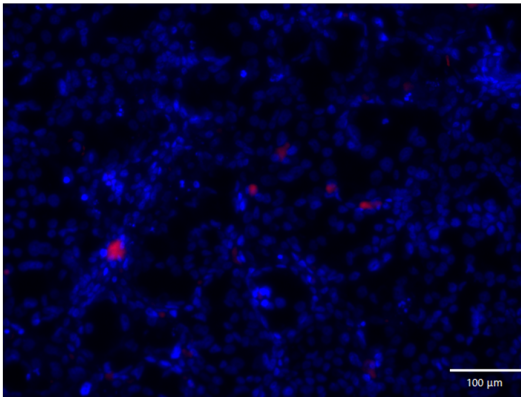
陽性対照-培養14日後



低温加熱群 (68°C5分) -培養14日後



陽性対照-培養28日後



低温加熱群 (68°C5分) -培養28日後

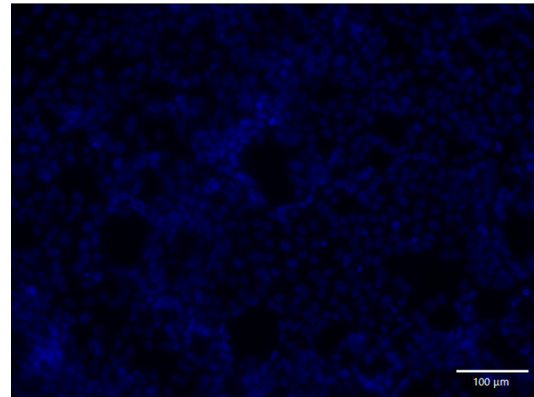


図 2. Alexander 細胞における E 型肝炎ウイルス抗原の検出。
ウイルス抗原は赤色、細胞核は青色として検出される。

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表：

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
前田 健	Globalizationと人獣共通感染症		日本臨牀	日本臨牀社	東京	2021	79(2):124-132
前田 健	人獣共通感染症：動物から学ぶ		実験医学	羊土社	東京	2021	39(2):56-64
前田 健	ペットと野生動物における COVID-19		動物用ワクチン-ニュースレター	動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会	神奈川	2020	22:32-39
石嶋慧多、朴ウンシル、松鶴 彩、早坂大輔、桐野有美、岡林環樹、森川 茂、水谷哲也、松野啓太、前田 健	国内ではこれまで経験のない脅威：SFTS		ヒトと動物の共通感染症研究会ニュースレター	ヒトと動物の共通感染症研究会	東京	2020	P15-17
前田 健	重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)	石田卓夫	犬の内科診療Part 2	緑書房	東京	2020	
前田 健	ズーノーシス（人獣共通感染症）		衛生動物の事典	朝倉書店	東京	2020	P12-13

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
Irie T., Uruguchi K., Ito T., Yamazaki A., Takai S., Yagi K.	First report of <i>Sarcocystis pilosa</i> sporocysts in feces from red fox, <i>Vulpes vulpes schrencki</i> , in Hokkaido, Japan	Parasites and Wildlife	11	29-31	2020
Suzuki Y. Hisaya K. Ono Y. Shimojim. H. Kubot, R. Kato, T. Kakuda, S. Hirose, Dong-Liang. Hu, A. Nakane, S. Takai, K. Sadamasu	A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004.	Food Microbiol. 92	92	December 2020, 103588	2020
Suzuki Y, K. Takahashi, F. Takase, N. Sawada, S. Nakao, A. Toda, Y. Sasaki, T. Kakuda and S. Takai	Serological epidemiological surveillance for vapN-harboring <i>Rhodococcus equi</i> infection in goats in Okinawa, Japan	CIMID	73	2020, 101540	2020
Takai, S., N. Sawada, Y. Nakayama, S. Ishizuka, R. Nakagawa, G. Kawashima, N. Sangkanjanavanich, Y. Sasaki, T. Kakuda, and Y. Suzuki	Reinvestigation of the virulence of <i>Rhodococcus equi</i> isolates from patients with and without AIDS.	Lett Appl Microbiol.	71(6)	679-683	2020
Kawase J, Hirai S, Yokoyama E, Hayashi F, Kurosaki M, Kawakami Y, Fukuma A, Sakai T, Kotani M, Asakura H.	Phylogeny, prevalence, and Shiga toxin (Stx) production of clinical <i>Escherichia coli</i> O157 clade 2 strains isolated in Shimane prefecture, Japan.	Curr Microbiol.	78 :	265-273.	2021

Rattanamthi K, Prasertsincharoen N, Naimon N, Kuwata R, Shimoda H, Ishijima K, Yonemitsu K, Minami S, Supriyono, Tran NTB, Kuroda Y, Tatemoto K, Virhuez Mendoza M, Hondo E, Rerkamnuaychoke W, Maeda K, Phichitraslip T.	A serological survey and characterization of Getah virus in domestic pigs in Thailand, 2017-2018.	Transbound Emerg Dis.	2021 Feb 22.	doi: 10.1111/tbed.14042	2021
Kirino Y, Ishijima K, Miura M, Nomachi T, Mazimpaka E, Sudaryatma PE, Yamanaka A, Maeda K, Sugimoto T, Saito A, Mekata H, Okabayashi T.	Seroprevalence of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus in Small-Animal Veterinarians and Nurses in the Japanese Prefecture with the Highest Case Load.	Viruses	13(2):	doi: 10.3390/v13020229	2021
Tsuru M, Suzuki T, Murakami T, Matsui K, Maeda Y, Yoshikawa T, Kurosu T, Shimojima M, Shimada T, Hasegawa H, Maeda K, Morikawa S, Saijo M.	Pathological Characteristics of a Patient with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS) Infected with SFTS Virus through a Sick Cat's Bite.	Viruses.	13(2):204	doi: 10.3390/v13020204	2021
Morikawa M, Mitarai S, Kojima I, Okajima M, Hatai H, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Matsuu A, Yoshida A, Hayashi K, Ozawa M, Masatani T.	Detection and molecular characterization of <i>Babesia</i> sp. in wild boar (<i>Sus scrofa</i>) from western Japan.	Ticks Tick Borne Dis.	12(4):101695	doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101695.	2021
Sakai Y, Kuwabara Y, Ishijima K, Kagimoto S, Mura S, Tatemoto K, Kuwata R, Yonemitsu K, Minami S, Kuroda Y, Baba K, Okuda M, Shimoda H, Sakurai M, Morimoto M, Maeda K.	Histopathological Characterization of Cases of Spontaneous Fatal Feline Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan.	Emerg Infect Dis.	27(4):	1068-1076.	2021
Park ES, Fujita O, Kimura M, Hotta A, Imaoka K, Shimojima M, Saijo M, Maeda K, Morikawa S.	Diagnostic system for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus RNA from suspected infected animals.	PLoS One.	28;16(1):	e0238671.	2021
Tomino Y, Andoh M, Horiuchi Y, Shin J, Ai R, Nakamura T, Toda M, Yonemitsu K, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Koderia Y, Oshima I, Takayama K, Inadome T, Shioya K, Fukazawa M, Ishihara K, Chuma T.	Surveillance of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> and <i>Campylobacter</i> spp. in wild Japanese deer (<i>Cervus nippon</i>) and boar (<i>Sus scrofa</i>).	J Vet Med Sci.	82(9):	1287-1294	2020
Masatani T, Hayashi K, Morikawa M, Ozawa M, Kojima I, Okajima M, Takano A, Shimoda H, Maeda K, Matsuu A, Yoshida A.	Molecular detection of tick-borne protozoan parasites in sika deer (<i>Cervus nippon</i>) from western regions of Japan.	Parasitol Int.	79:	102161.	2020
Ishida-Kuroki K, Takeshita N, Nitta Y, Chuma T, Maeda K, Shimoda H, Takano A, Sekizaki T.	16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Five Species of Wild Animals in Japan.	Microbiol Resour Announc.	9(22):	e00368-20.	2020
Ishida-Kuroki K, Takeshita N, Nitta Y, Chuma T, Maeda K, Shimoda H, Takano A, Sekizaki T. 1	16S rRNA Gene Amplicon Sequence Data from Feces of Wild Deer (<i>Cervus nippon</i>) in Japan.	Microbiol Resour Announc.	9(22)	e00346-20.	2020

Lin TL, Ou SC, Maeda K, Shimoda H, Chan JP, Tu WC, Hsu WL, Chou CC.	The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan.	Emerg Microbes Infect.	9(1):	148-151.	2020
Takahashi, T. Kabeya, H., Sato, S., Yamazaki, A., Kamata, Y., Taira, K., Asakura, H., Sugiyama, H., Takai, S., Maruyama, S.	Prevalence of <i>Yersinia</i> among wild sika deer (<i>Cervus nippon</i>) and boars (<i>Sus scrofa</i>) in Japan.	J. Wildl. Dis.	56(2):	270-277,	2020
Mizukami M, Sato S, Nabeshima K, Kabeya H, Ueda D, Suzuki K, Maruyama S.	Molecular survey of <i>Bartonella rochalimae</i> in Japanese racoon dogs (<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>).	J Wildl Dis.	56(3)	560-567	2020
Nabeshima K, Sato S, Kabeya H, Kato C, Suzuki K, Maruyama S.	Isolation and genetic properties of <i>Bartonella</i> in eastern bent-wing bats (<i>Miniopterus fuliginosus</i>) in Japan.	Infect Genet Evol	83:	104354.	2020
Nabeshima K, Sato S, Kabeya H, Komine N, Nanashima R, Takanoto A, Shimoda H, Maeda K, Suzuki K, Maruyama S.	Detection and phylogenetic analysis of <i>Bartonella</i> species from bat flies on eastern bent-wing bats (<i>Miniopterus fuliginosus</i>) in Japan.	Comp Immunol Microbiol Infect Dis.	73:	101570.	2020
Sato S, Kabeya H, Ishiguro S, Shibasaki Y, Maruyama S.	<i>Lipoptena fortisetosa</i> as a vector of <i>Bartonella</i> bacteria in Japanese sika deer (<i>Cervus nippon</i>).	Parasit Vectors	14(1):	73	2021
杉山 広、森嶋康之、児玉文宏	北海道札幌市において2019年に発生した旋毛虫集団食中毒事例	Clin Parasitol	31:	49-51.	2020
Banzai A, Sugiyama H, Hasegawa M, Morishima Y, Kawakami Y.	<i>Paragonimus westermani metacercariae</i> in two freshwater crab species in Kagoshima Prefecture, Japan, as a possible source of infection in wild	J Vet Med Sci,	83(3):	412-418	2021

「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

令和2年 5月 30日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 学校法人北里研究所

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 小林 弘祐 印

次の職員の(元号) 令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 野生鳥獣由来食肉の安全性の確保とリスク管理のための研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 獣医学部・教授
(氏名・フリガナ) 高井 伸二 (タカイ シンジ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。