

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871155

研究課題名(和文)野生動物での水系感染症病原微生物の保有状況と水源汚染の疫学研究

研究課題名(英文)Epidemiological study about water borne protozoa in wild deer in Japan

研究代表者

山崎 朗子(Yamazaki, Akiko)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：30648358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、野生動物が保有する水系感染症病原微生物の疫学的調査を行った。全国の自治体から野生ニホンジカの試料採取協力を得て、9都道府県から合計251頭分の試料を採取し、1都道府県の5地域から原水試料を採取した。

結果、5都道府県のシカ糞便試料からクリプトスポリジウム陽性検体が確認され、その陽性率は2%から20%であった。雌雄での陽性率は雄で8.9%、雌で4.1%であった。遺伝子配列をもとに種同定した結果、ウシを優先宿主とする種にシカも感染する事が分かった。原水試料から検出された種はそれらとも異なっていたため、現段階の水源汚染源はニホンジカ以外の動物種によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study we examined about water borne protozoa in wild deer in Japan. 251 fecal samples were collected from 9 prefectures and 5 water samples from 5 different areas in 1 prefecture. As a result, we detected Cryptosporidium positive fecal samples from 5 prefectures, those positive rates were from 2% to 20% for each. Positive rates of male was 8.9%, and that of female was 4.1%. 2 water samples were Cryptosporidium positive among 5 samples. Nucleotide sequencing analysis of 18S ribosomal RNA detected *C. ryanae*, *C. bovis*, and *C. sp.* deer genotype from fecal samples, in other hand, *C. fragile* and *C. galli* were detected from water samples.

In discussion, we detected *Cryptosporidium sp.* in wild deer and water samples which were collected in same area but species were genetically different so that wild deer is not a direct source of water pollution. But those species from deer is predominant for cattle that indicates deer might be a vector of infectious *Cryptosporidium spp.* for cattle.

研究分野：公衆衛生

キーワード：水系病原性微生物 野生動物 シカ

1. 研究開始当初の背景

クリプトスポリジウムは激しい下痢を引き起こす消化管寄生性原虫で、強い塩素耐性を有することから上水道処理の過程で消毒されず、水道を介して広い範囲に感染することで問題とされている。中でも、*Cryptosporidium parvum* は、多様な感染性を有し、多くの哺乳類を宿主とすると同時に感染源となることから、発生は集団感染が多く、発展途上国のみならず、先進国でも毎年のように発生している。国内の例としては越生市で人口の71.4%に相当する8,196名もの感染発症者を出した事例や、米国ウィスコンシン州で起こった、403,000名の下痢発症うち4,000名が入院し、400名が死亡したという記録がある。また、発生例の中では、飲料水からの一次感染だけでなく、患者が泳いだプールで感染した等、二次感染の例もある。クリプトスポリジウムには抗生物質等が効果を示さず、決定的な治療法が未だ確立されていないため、発症に際しては対症療法以外に手立てがなく、個人の免疫機能に頼る他ない現状である。そのため、子供や高齢者、免疫不全者には脅威であり、死亡する可能性が高い。このことが、先進国、発展途上国を問わずクリプトスポリジウムが大きな問題として取り上げられる理由のひとつであり、また、国際化に伴う地球規模での人や物の移動の増加が、輸入による感染拡大の一因となっている。

近年、日本では野生動物が増加し、人と接触することが多くなった。クリプトスポリジウムの宿主となりうるこれらの野生動物が家畜動物と比べ遥かに広い範囲を生活圏にしていることを考えると、野生動物個体数の増加によりクリプトスポリジウム感染源が人の生活用水の水源に接する機会が増えている状況であると言える。これは、飲料水をはじめとする家庭用水を媒介した水系感染によるクリプトスポリジウム症の集団発生が増加する危険性を示唆している。ところがこれまで、クリプトスポリジウムについてはその感染事例の規模に相反し、総括的な疫学研究や、汚染源の特定について未だ解明されておらず、対処については浄水施設における消毒法にとどまっており、塩素消毒に抵抗性のある本病原体についてはいまだ効果は表れていない。

このような背景のもと、昨今の野生動物の急激な増加によるヒト生活圏への侵入に起因する水源汚染の危険性は明らかだが、原因究明、危害対策共に方向性を見出せないでいる現状である。

2. 研究の目的

クリプトスポリジウムは多くの動物に感染性を持ち、多様な種が多様な哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類にそれぞれの宿主を持つことから、世界的に分布していることが知られている。

前述のとおり、日本では野生動物が増加し

人の生活圏に接近する機会が増え、農作物や森林の被害に加え、山間部の小さな集落では水源付近にシカが多数現れることにより、水源汚染を恐れる声が増えている。野生動物であるシカは家畜と異なり、成育環境を管理できないため、多種の動物との接触機会が多い。クリプトスポリジウムは多種の動物を宿主とする原虫であるが、このような野生動物は宿主になり得る可能性が非常に高いが、現在までにシカでの疫学情報は皆無である。

そこで、本研究では、日本国内に分布する野生ニホンジカの糞便と、その行動範囲内にある水源由来の試料からヒトに感染性を持つクリプトスポリジウムを検出し、水源の感染源を特定すると共にクリプトスポリジウムの分布状況の把握を目的とした。本研究においては、ヒトの生活用水の水源近辺に接触する可能性のあるシカについて、それらのクリプトスポリジウムの保有状況に加え各型の同定を行い、特に人に感染性を持つ *C. parvum* の分布状況を知るだけでなく、行動範囲内にある水源からもクリプトスポリジウムの検出・同定を試み、野生動物が保有していた型と合わせて解析することにより汚染源を明らかにする。季節変動や、環境の変化に伴う動態にも着目するため、試料採取は年間を通して行う。

本研究は、クリプトスポリジウムが自然界から人間の生活に侵入する第一線を明らかにするものであり、全国的に分布している野生ニホンジカを対象に広範的な疫学調査をすることで広大な生息域を持つ野生動物が水源の汚染源になり得る可能性を精査する。このような試みは今までに行われていないため、学術的価値は非常に高いだけでなく、また、汚染源の特定および汚染経路の解明は、野生ニホンジカの行動規制・誘導等により水源汚染による集団感染を回避するための防疫策の基盤となるほか、野生動物の腸内容物に触れる可能性のある狩猟者、解体事業者を感染から守るための規制にも非常に重要な情報となる。クリプトスポリジウムが人獣感染症の中でも人の生活にとって不可欠である水を媒介する感染性原虫であることを鑑みると、日常生活、畜産業、農業、をはじめとするすべての人間生活に深く関係する水供給の面から、安全な家庭用水・飲料水の供給に寄与するという点でも本研究の意義は国内外を問わず、非常に大きいと言える。

3. 研究の方法

(1) 試料採取

鹿をはじめとする野生動物の糞便採取を各県の処理施設や猟師に協力してもらい、同時にそれらの動物の行動範囲内に存在する水源地から水の採取を行う。

試料提供自治体の選出

試料採取提供は主にこれまで野生鳥獣被害を多く受けている自治体を選出した。我が国では全国的にニホンジカによる獣害被害

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

採取方法

研究代表者が各自治体行政機関と猟友会を訪れ、研究内容を説明すると共に試料採取協力を得た。試料採取が出来てから 48 時間以内に岩手大学農学部へ冷蔵での送付を依頼した。個体識別については、各捕獲日、捕獲場所、性別、年齢、体長、体重を出来る限り記載した。採取は主に狩猟者が狩猟した際の解体時に行う。随時の試料採取および送付が困難な自治体では、全国一斉捕獲の際、研究代表者が捕獲に参加させて頂き、現場での試料採取を行った。その試料についても、捕獲日に冷蔵で岩手大学農学部へ送付した。

採取試料部位

本研究で用いた試料は直腸内容物として糞便を採取した。外環境由来のコンタミネーションを防ぐため、20 cm 程度を直腸ごと採取した。直腸の両端は結紮することで完全に外気から遮断した。

(2) 核酸抽出

国立感染症研究所による「クリプトスポリジウム症・ジアルジア症等の原虫性下痢症」に準拠して糞便中のクリプトスポリジウム原虫を濃縮した。

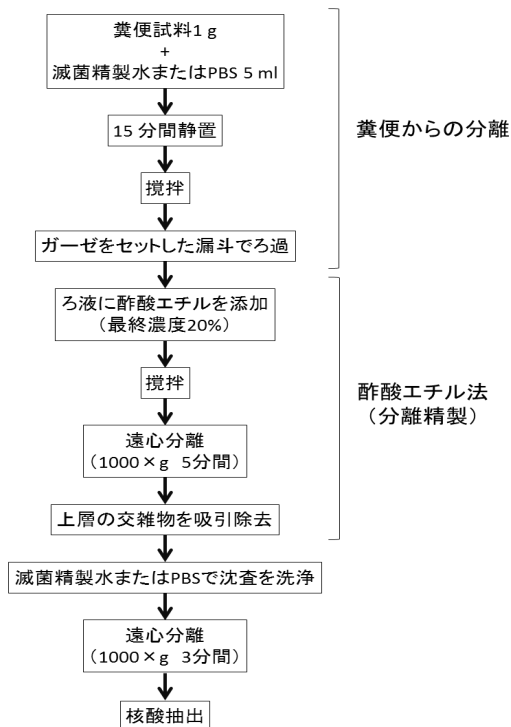
糞便からの分離

ポリプロピレン製栄研スピッツ管に糞便 1 g を入れ、精製水または PBS を 10 ml 加え、15 分間程度静置した。滅菌済みの綿棒の柄でよく撈拌した。ポリプロピレン製漏斗に綿製ガーゼを四つ折りにして設置し、新しい栄研スピッツ管に漏斗を設置した。漏斗の上から試料懸濁液をポリプロピレンスポイトで滴下し、全て注ぎ終わったら、栄研スピッツ管を洗うように 5 ml の精製水または PBS を加え、再びスポイトで漏斗に注いだ。綿棒の柄でガーゼを巻き付けて漏斗の中で絞り、試料溶液を全て集めた。

酢酸エチル法による精製

試料懸濁液が入ったポリプロピレン栄研スピッツ管に最終濃度 20 % になるように酢酸エチルを加える。蓋を閉め、よく混和するように撈拌する。均一に混ざったら、ふたを一度開けて抜気する。その後、1000 × g で

5 分間、室温にて遠心分離する。回転停止の際に沈査が浮き上がることを防ぐため、ブレーキはオフに設定する。遠心分離後、試料溶液が沈査、水溶媒層、有機溶媒層の 3 層に分かれたことを確認したら、上部の 2 層の交雑物をスポイトで吸引、またはデカンテーションで除去する。その際、管壁についた交雑物等は綿棒で拭き取る。タッピングかボルテックスを用いて沈殿物をほぐした後、2 ml 程度の精製水で洗う。1000 × g で 3 分間、室温にて遠心分離し、上清を除去する。残った沈査を用いてゲノム抽出を行った。



水からの分離

水源地から採取した 10 L の水を加圧ポンプでろ過する。ろ過後、フィルターをアセトンで溶解し、1050 × g で 10 分間遠心し、上清を吸引する。エタノールを加え撈拌し、棟梁の PBS を加え、さらに撈拌する。再び 1050 × g で 10 分間遠心し、上清を吸引除去する。PBS で洗浄し、遠心して沈査を得る。

沈査からの核酸抽出

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

(3) クリプトスポリジウム属の検出

試料中のクリプトスポリジウム属の検出にはリアルタイム PCR 法を用いた。クリプ

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

4. 研究成果

(1) 試料提供自治体

本研究の依頼により、千葉県、静岡県、山梨県、三重県、滋賀県、京都府、長崎県、熊本県、宮崎県の計 9 都道府県から野生ニホンジカ試料を、また、奈良県から原水試料の提供を頂けた。地方としては、関東、東海、甲信越、近畿、九州の 5 地方である。

(2) 採取試料数

本研究で採取できた野生ニホンジカ糞便試料数は千葉県から 1 1 検体、静岡県から 4 5 検体、三重県から 2 5 検体、山梨県から 4 2 検体、滋賀県から 2 3 検体、京都府から 2 9 検体、長崎県から 5 1 検体、熊本県から 1 9 検体、宮崎県から 5 検体の計 2 4 5 検体である。地方別の検体数は、関東地方 1 1 検体、東海地方 7 0 検体、甲信越地方 4 2 検体、近畿地方 5 2 検体、九州地方 7 5 検体であった。水試料は、奈良県から 5 検体採取した。

上記の方法に従い、糞便中のクリプトスポリジウム原虫の濃縮、核酸抽出、18S リボソーム RNA (18SrRNA) を標的としたクリプトスポリジウム属原虫の検出を行った。その結果、いくつかの自治体からの試料中にクリプトスポリジウム属原虫特異的 18SrRNA 遺伝子の増幅が確認された。

(3) クリプトスポリジウム陽性率

各自治体によって陽性検出率には相違があった。千葉県では 9.1 % (1/11)、静岡県 15.6 % (7/45)、山梨県 2.4 % (1/42)、滋賀県 0 %、京都府 17.2% (5/29)、三重県 0 %、熊本県 0 %、宮崎県 20.0 % (1/5)、長崎県 0 % (1/51) という陽性率が確認された。雌雄間では雄 8.9 % (11/123)、雌 4.1 % (5/122) であった。これらの陽性検体について塩基配列を解析したところ、*Cryptosporidium sp. deer* genotype、*C.*

ryanae、*C. bovis* の三種が BLAST による同源性検索で 100 % の同源性を示した。これらのうち、*C. sp. deer* genotype はシカ固有種であるが、*C. ryanae*、*C. bovis* はウシ由来の種であることが分かった。陽性検体は 1 月、5 月、6 月、10 月、12 月に捕獲されたものであった。

クリプトスポリジウム調査結果

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

奈良県の異なる 5 地域から得られた原水試料 5 検体のうち、2 検体がクリプトスポリジウム陽性であった。各検体の 18 SrRNA 遺伝子の塩基配列は、*C. fragile*、*C. serpentis*、*C. galli*、*C. parvum*、*C. andersoni* の 5 種類と 9 7 % 以上の同源性を示した。しかし、本研究で調査した 5 検体の水試料からは、ニホンジカ試料で検出されたクリプトスポリジウムと同種は検出されなかった。

(4) 考察

クリプトスポリジウムは、塩素に耐性を持つ水媒介性の微生物である特性から、非常に大きな規模の発症事例を特徴とする。人の生活、ひいては生物の生命維持に欠かせない水を媒介することにより、消毒以外に回避する手段はないが、塩素消毒が有効でないために完全に殺菌するには紫外線照射以外の手段は現在のところない。ところが、国内の住宅に水を供給するすべての水道に紫外線殺菌を施すには費用が掛かりすぎるため、現在は多くの水道施設がクリプトスポリジウム検出の際には紫外線殺菌を施すという条件付き規制にとどまっている。山間部の小さな集落では戸数の少なさに応じて簡易水道が設置されている。また、このような集落では私有地の畑で小規模な農業を営んでいることが多く、その際には自宅の井戸水や、川の水などを使用している場合がほとんどである。ニホンジカとの遭遇や被害が頻発する場所はまさに上記のような場所であり、現に井戸の水をシカが飲んでいて、井戸の周りにシカの糞が大量に落とされている、などの訴えが多くあり、生活水の安全性や衛生面での不安が自治体に寄せられていた。本研究は、ジビエとしての食肉利用の安全性担保に関する研究から派生した、野生動物によるヒトへの危害性に焦点を当てている。

これまで、我が国の野生ニホンジカからクリプトスポリジウムの検出報告はなかった。ところが、本研究では千葉県、静岡県、山梨県、京都府、宮崎県、長崎県の6県から検出された。自治体によって試料数が少ないことも原因の一つであると考えられるが、少なくとも我が国の野生ニホンジカにはクリプトスポリジウムを保有している個体があり、地域によって保有率には最大10倍の相違があることが証明された。今回の調査地域について試料採取個体の捕獲場所を検討すると、陽性個体が検出された自治体の捕獲区域内に牧場又は仔牛の哺育施設があった。本研究では我が国全ての野生ニホンジカを調査していないので断定は出来ないが、陽性検体の過半数が *C. ryanae*, *C. bovis* というウシを優先宿主とする種であったことから、野生ニホンジカとウシとの間におけるなんらかの相互関係が示唆される。また、同時に、今回検出された全ての種についてはヒトに対する病原性が確認されていないので、これらの野生ニホンジカによる水源汚染がヒトへの危害に直結するとは考えにくい、今後とも注意喚起は必要である。

雌雄別に解析したクリプトスポリジウムの陽性率が雄で 8.9 %であったのに対して、雌では 4.1 %と半分程度の感染率であったことに関しては非常に興味深い結果である。これまでに、家畜を対象としたクリプトスポリジウムの調査では決定的な雌雄差の報告はなく、雌雄よりも年齢による影響が多くを占めていた。本研究で示されたシカでのクリプトスポリジウム保有状況は家畜との共通の種を保有しながら、家畜では見られない性別による影響を受けていることから、シカ特異的な感染動態が推測できる。一方、季節による陽性率の変動は認められなかった。このことに関しては、狩猟や捕獲による試料採取にはどうしても法律で決められた猟期が関係してくるため、年間を通して満遍なく試料を採取することが難しいことから、正確な解析が叶わなかったことが背景にある。また、夏季の狩猟では SFTSV 陽性マダニやその他の衛生動物による刺咬が増えるため、危険回避のために採取試料数が減ることなども関係する。そのため、野生ニホンジカにおけるクリプトスポリジウム陽性率の季節変動を確認するには、上記のような背景の解決と四季を通して満遍なく試料採取が行われることが必要である。

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

九州で違いはないことが考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

山崎 朗子、野生ジカのクリプトスポリジウム保有状況と食中毒関連種の検索、第 35 回日本食品微生物学会、2014.9.18-19、大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス(大阪府)

山崎 朗子、野生動物における水系感染症病原微生物の疫学研究、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014.9.9-12、北海道大学高等教育推進機構(北海道)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

岩手大学 農学部 共同獣医学科 獣医公衆衛生学研究室

http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/list/cgi-bin_pdf/zyu_zyuikousyu.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 朗子 (YAMAZAKI, Akiko)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：30648358

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし