

論文の内容の要旨

氏名：森田聡志

博士の専門分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：わが国の野生鹿、猪における新興食中毒起因菌の保菌状況と分離株の病原性解析

近年、わが国では全国的に野生鳥獣の個体数の増加とその生息域の拡大に伴い、希少植物の食害、自然生態系の破壊、農林業や生活環境に対する甚大な被害が報告されている。その対策として、平成19年に「鳥獣被害防止特措法」が制定された。また、平成26年には「鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律（鳥獣保護管理法）」が改正され、増えすぎた野生鳥獣の捕獲を推進しており、付帯決議では、衛生管理を徹底した上で、捕獲した野生鳥獣を食用に利活用することを推進している。

野生鳥獣肉の消費拡大に伴い、鹿や猪肉を原因とする志賀毒素産生大腸菌 O157 (O157) やE型肝炎ウイルスによる食中毒事例も散発的に報告されている。しかしながら、野生鳥獣肉における食中毒菌の分布や食中毒発生のリスクは、十分に検討されていない。そこで本学位論文では、近年、新興食中毒起因菌として注目されている O157、*Campylobacter* 属菌ならびに *Arcobacter* 属菌を対象に、わが国の鹿、猪における保菌状況を検討するとともに、分離株の全ゲノムシーケンス (Whole genome sequence:WGS) 解析および PCR 法により病原関連遺伝子等を網羅的に解析し、ヒトに対する潜在的な病原性について評価した。

1. わが国の野生鹿および猪における志賀毒素産生大腸菌 O157 の保菌状況と分離株の病原性解析

鹿肉を原因とする O157 の食中毒事例が国内外で報告されていることから、ジビエ消費において本菌の汚染は重要なリスク因子の一つである。第1章では、わが国に生息する鹿、猪における O157 の保菌状況を検討し、分離株の WGS 解析による病原性評価を行うとともに、周辺で飼育されている牛と野生猪間における本菌の伝播の可能性を検討した。

2012年から2019年の間に、21県で捕獲された鹿474頭および16県で捕獲された猪426頭の直腸便を供試した。各糞便をノボビオン加 mEC 培地で42°C、18時間増菌培養後、クロモアガー-O157 および CT-SMAC 各寒天培地で37°C、24時間分離培養した。分離株は amplification refractory mutation system (ARMS) -PCR ならびに、lineage-specific polymorphism assay (LSPA) -6 による系統解析を行った。一部の株は次世代シーケンサーを用いた WGS 解析を行い、解析ソフト Virulence Finder2.0、ResFinder4.1 により、病原関連遺伝子と薬剤耐性遺伝子の保有状況を検討した。さらに、O157 を保菌していた猪の捕獲地点からおよそ2km離れた農場で飼育されている牛由来 O157 分離株を加えて pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析により、分離株の由来を検討した。

鹿9頭(1.9%)、猪3頭(0.7%)から O157 が分離された。系統解析では、鹿由来1株、猪由来1株が、Clade7に、鹿由来8株、猪由来1株、牛由来1株は Clade12 に、猪由来1株は Clade10 にそれぞれ分類された。計9株の WGS 解析では、5,290,931~5,498,471bp の塩基配列が決定され、GC 含量は 50.5~50.6%、4,633~5,150 の Coding sequence (CDS)、rRNA が22個、tRNA が98~105個であった。また、Sakai 株(1996年、大阪府堺市で発生した大規模食中毒原因菌株)と同様に19~20種類、27~28個の病原関連遺伝子と、マクロライド系薬剤に対する耐性遺伝子 *mdfA* が検出された。分離株の PFGE 解析では、鹿由来株は5パターンに分かれた。B県で近い時期に分離された鹿由来6株中5株が同一 PFGE パターンを示した。A県で異なる時期に分離した鹿由来2株は、非常に類似したパターンを示した。猪由来株は全て異なるパターンに分類され、そのうち1株は、牛由来株と同一パターンであった。

本研究では、わが国の鹿および猪は、低率ながら O157 を保菌していることを明らかにした。鹿、猪由来株はいずれも水様性下痢を呈する患者由来株が含まれる Clade7、10、12 に分類され、Sakai 株と類似した病原関連遺伝子を保有していたことから、人に病原性を示す可能性が示唆された。PFGE 解

析により、様々なゲノム性状の O157 株が鹿および猪に分布していること、B 県では同一株が分布していること、A 県では長期間にわたり近縁株が鹿間で維持されていることが明らかとなった。さらに、猪と牛の間で O157 が伝播した可能性が示唆された。

2. わが国の野生鹿および猪における *Campylobacter* 属菌の保菌状況と分離株の病原性解析

国内外の猪からは *Campylobacter hyointestinalis* (*Ch*) が高率に分離されることが報告されている。近年、*Ch* は、下痢症患者からも分離が報告されていることから、本菌は新たな人獣共通感染症起因細菌として注目されている。第 2 章では、わが国に生息する鹿、猪における *Campylobacter* 属菌の保菌状況を検討するとともに、分離株の WGS 解析、ならびにヒト腸管上皮細胞株 (Caco-2) を用いた感染試験により、*Ch* のヒトに対する潜在的な病原性を検討した。

2017 年から 2020 年の間に、14 県で捕獲された鹿 253 頭および 16 県で捕獲された猪 321 頭の直腸便を供試した。各糞便をプレストン培地で増菌培養後、mCCDA およびスキロー寒天培地で分離培養した。増菌、分離培養ともに 37°C ならびに 42°C、微好気条件下で培養した。分離株は PCR 法により本菌の病原因子の一つである Cytolethal distending toxin (CDT) の保有状況を検討した。また、鹿 2 株 (18D42-2、19D10-1)、猪 3 株 (18B171-2、18B189-1、18B213-2) は WGS 解析を行い、病原関連遺伝子の有無を網羅的に解析した。これら 5 株と *Ch* ATCC35217^T 株 (*Ch* 標準株) および *C. jejuni* (*Cj*) NCTC11351^T 株 (*Cj* 標準株) に対して、接着因子である *Campylobacter* adhesin to fibronectin (*cadF*)、鞭毛構成因子である *flagellinA, B* (*flaA, flaB*) の保有状況を PCR 法により解析するとともに、Caco-2 細胞への接着、侵入試験、暗視野顕微鏡下で運動性の観察を行った。

鹿 7 頭 (2.8%) から 23 株、猪 71 頭 (22.1%) から 194 株の *Ch* が分離された。全ての検体から *Cj* や *C. coli* (*Cc*) は分離されなかった。鹿由来 23 株の全て、猪由来 141 株 (72.7%) が *chcdt-I* と *chcdt-II* の両者を保有していた。WGS 解析では、1,716,126~1,773,046bp の塩基配列が決定され、GC 含量は 34.0~34.3%、1,724~1,815 の CDS、rRNA が 3 個、tRNA が 33~42 個であった。また、全ての *Ch* 分離株から、*Cj* や *Cc* の運動性、化学走性、接着、侵入、毒素、糖鎖付加、鉄利用、薬剤耐性、ストレス応答に関与する遺伝子と相同な遺伝子が 38~40 種類検出された。このうち、*cadF* と *flaB* の保有状況は株間で異なっており、*cadF* は 18B189-1 株のみで、*flaB* は 18D42-2 株、19D10-1 株で欠損していた。PCR 法の結果、全ゲノム解析の結果と同様に *flaA* は検討した全ての *Ch* 株から検出されなかった。一方、18D42-2 および 19D10-1 株では *flaB* が、18B189-1 株では *cadF* がそれぞれ検出された。*flaA* の欠損に関わらず、全ての *Ch* 株で運動性が確認された。各株の Caco-2 細胞接着率は 3.4~5.2% で、*Ch* 標準株の接着率 (3.8%) は、*Cj* 標準株 (2.3%) に比べ有意 ($p<0.05$) に高い値を示した。一方、Caco-2 細胞侵入率は 0.04~0.05% で *Ch*、*Cj* 各標準株の同侵入率はいずれも 0.04% で、有意差は認められなかった。なお、接着率、侵入率ともに、一部の *Ch* 株間で有意差 ($p<0.05$) が認められた。

本研究によって、わが国の鹿および猪には *Ch* が広く分布しており、特に猪で有意に高い保菌率であることが判明した。鹿、猪由来 *Ch* 株は *Cj* および *Cc* と同様の病原性および生存性に関与する遺伝子を少なくとも 38 種保有しており、運動性やヒト腸管上皮細胞へ接着、侵入能も有していたことから、鹿や猪が保菌する *Ch* はヒトに対し病原性を示す可能性が示唆された。

3. わが国の野生鹿および猪における *Arcobacter* 属菌の保菌状況と分離株の病原性解析

Arcobacter は、近年、新興食中毒起因菌として注目されている。わが国の家畜や家禽から本菌は分離されているものの、野生鳥獣については未だ検討されていない。また、*Arcobacter* 属菌の 9 種類の病原関連遺伝子 (*cadF*、*cj1349*、*ciaB*、*mviN*、*tlyA*、*hecA*、*hecB*、*irgA*、*pldA*) のうち、下痢患者由来 *Ab* は 9 遺伝子全て (パターン 1)、または *hecA* を除く 8 遺伝子 (パターン 2) を保有していることが報告されている。第 3 章では、わが国に生息する鹿、猪における *Arcobacter* 属菌の保菌状況と、分離株の病原関連遺伝子の保有状況を解析することで、ヒトに対する潜在的な病原性を評価した。

2017 年から 2020 年の間に、14 県で捕獲された鹿 253 頭ならびに 16 県で捕獲された猪 321 頭の直腸便を供試した。各糞便を *Arcobacter* selective broth で増菌培養後、*Arcobacter* selective medium およびスキロー寒天培地に塗抹して分離培養した。増菌、分離培養ともに 25°C、微好気条件下で 72 時間培養した。分離株は、PCR 法により前述の 9 種類の病原関連遺伝子の保有状況を検討した。

鹿 17 頭 (6.7%) から 32 株、猪 63 頭 (19.6%) から 153 株の *A. butzleri* (*Ab*) が、猪 4 頭 (1.2%) から 6 株の *A. cryaerophilus* (*Ac*) がそれぞれ分離された。鹿由来 *Ab* は、3~8 種類、猪由来 *Ab* は 3~9 種類、猪由来 *Ac* は 2~4 種類の病原関連遺伝子を保有しており、それぞれ 11、19、および 3 種の保有パターンに分類された。猪由来 *Ab* 14 株 (9.2%) はパターン 1、猪由来 *Ab* 26 株 (17.0%) はパターン 2 であった。

本研究において、わが国の鹿および猪が *Arcobacter* 属菌を保菌しており、猪の保菌率は鹿に比べ有意に高いことを初めて明らかにした。分離株のうち一部の猪由来株は、下痢症患者と同様の病原関連遺伝子の保有パターンであったことから、ヒトに病原性を示す可能性が示された。

【総括】

本研究により、わが国の鹿および猪は低率ながら O157 を保菌しており、分離株は水様性下痢患者分離株と同じ Clade に分類された。O157 分離株は Sakai 株と類似した病原関連遺伝子を保有していた。さらに、鹿および猪は様々なゲノム性状の O157 を保菌する一方、特定の地域では同一の株が分布していること、長期間に渡って近縁株が維持されていることを明らかにした。また、猪-牛間で伝播している可能性が示唆された。また、わが国の猪は、鹿に比べて高率に *Ch* を保菌していることが明らかとなった。鹿や猪が保菌する *Ch* は、*Cj* および *Cc* と同様の病原性および生存性に関与する遺伝子を保有しており、ヒト腸管上皮細胞へ接着、侵入する能力を有していたことから、ヒトに対して病原性を有する可能性が示唆された。さらに、わが国の鹿および猪が *Arcobacter* 属菌を保菌していることを初めて明らかにするとともに、分離株の病原関連遺伝子保有パターンの解析により、一部の猪由来 *Ab* 株は、ヒトに対して病原性を示す可能性が考えられた。

以上より、鹿および猪は糞便中に各種新興食中毒起因菌を保菌していることが明らかとなった。野生鳥獣肉の加工、流通、消費に至る一連の工程において肉の汚染には注意が必要である。