

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

森田 聡志

2021

目次

序論	6
第 1 章 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	17
1.1 はじめに	18
1.2 材料および方法	21
1.2.1 材料	
1.2.2 STEC O157 分離培養	
1.2.3 分離株からの DNA 抽出	
1.2.4 PCR による分離株の菌体外抗原遺伝子 (<i>rfbE_{O157}</i>) の検出	
1.2.5 STEC O157 株の血清型別	
1.2.6 STEC O157 株の系統解析	
1.2.7 STEC O157 株の WGS 解析	
1.2.8 STEC O157 株の遺伝子解析	
1.2.9 STEC O157 株の 23S rDNA 突然変異の検出	

1.2.10 STEC O157 株の薬剤感受性試験	
1.2.11 STEC O157 株の PFGE 解析	
1.3 成績	39
1.3.1 野生鹿および猪における STEC O157 の保菌状況	
1.3.2 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の系統解析	
1.3.3 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の WGS 解析	
1.3.4 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の病原関連遺伝子の検出	
1.3.5 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の薬剤耐性遺伝子の検出	
1.3.6 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の 23Sr DNA の点突然変異の検出	
1.3.7 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の薬剤感受性評価	
1.3.8 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の PFGE 解析	
1.4 考察	54
1.5 小括	60
1.6 第 1 章で使用した試薬類の組成.....	62

第 2 章 わが国の野生鹿および猪における <i>Campylobacter</i> 属菌の保菌状況と 分離株の病原性解析.....	68
---	----

2.1 はじめに	69
2.2 材料および方法	72
2.2.1 材料	
2.2.2 <i>Campylobacter</i> の分離培養	
2.2.3 分離株からの DNA 抽出	
2.2.4 PCR およびシーケンス解析による <i>Campylobacter</i> の同定法	
2.2.5 <i>C. hyointestinalis</i> 株の <i>chcdt</i> の保有状況の検討	
2.2.6 <i>C. hyointestinalis</i> 株の WGS 解析	
2.2.7 <i>C. hyointestinalis</i> 株の病原関連遺伝子の検出	
2.2.8 PCR による <i>cadF</i> 、 <i>flaA</i> 、 <i>flaB</i> の検出	
2.2.9 <i>C. hyointestinalis</i> 株の運動性試験の検討	
2.2.10 <i>C. hyointestinalis</i> 株の Caco-2 細胞への感染実験	
2.2.11 統計学的解析	
2.3 成績	87
2.3.1 わが国の野生鹿および猪における <i>C. jejuni</i> 、 <i>C. coli</i> 、 <i>C. hyointestinalis</i> の保菌状況	
2.3.2 鹿および猪由来 <i>C. hyointestinalis</i> 株の <i>chcdt</i> 保有状況	
2.3.3 鹿および猪由来 <i>C. hyointestinalis</i> 株の WGS 解析	

2.3.4 鹿および猪由来 <i>C. hyointestinalis</i> 株における病原関連遺伝子の保有状況	
2.3.5 PCR による鹿および猪由来 <i>C. hyointestinalis</i> 株の <i>cadF</i> 、 <i>flaA</i> 、 <i>flaB</i> の保有状況	
2.3.6 鹿および猪由来 <i>C. hyointestinalis</i> 株の運動性試験	
2.3.7 鹿および猪由来 <i>C. hyointestinalis</i> 株における Caco-2 細胞への感染実験	
2.4 考察	100
2.5 小括	105
2.6 第 2 章で使用した試薬類の組成.....	107

第 3 章 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.....	109
3.1 はじめに	110
3.2 材料および方法.....	115
3.2.1 材料	
3.2.2 <i>Arcobacter</i> の分離培養	
3.2.3 PCR およびシーケンス解析による <i>Arcobacter</i> の同定法	
3.2.4 <i>Arcobacter</i> 株の 9 種類の病原関連遺伝子の保有状況の検討	

3.2.5 統計学的解析	
3.3 成績	123
3.3.1 わが国の野生鹿および猪における <i>Arcobacter</i> の保菌状況	
3.3.2 鹿、猪由来 <i>A. butzleri</i> 株および <i>A. cryaerophilus</i> 株の病原関連遺伝子の保有状況	
3.4 考察	129
3.5 小括	132
3.6 第3章で使用した試薬類の組成	133
第4章 総括	135
引用文献	142

序論

近年、わが国では全国的な野生鳥獣の生息地に拡大や個体数の増加に伴い、自然生態系の破壊、希少植物の食害、農林業への甚大な被害等が報告されるようになった。わが国における野生鳥獣による農作物被害金額は、2010年度～2012年度は、200億円以上で推移していた(図1)。その後、鳥獣害対策が進み、2013年度以降、その被害額は減少に転じており、2019年度には158億円であった。鳥獣種別では、全ての年度で鹿による被害が最も多く、2019年度の被害額は53億円、次いで猪によるものが46億円であった。鳥獣被害は、農作物に対する直接的なもののみならず、営農意欲の減退を引き起こすことから、農業従事者の減少、耕作放棄農地の増加の原因となる。耕作放棄地は野生鳥獣の恰好の生息場所にもなり、それら放棄地が農家周辺域にまで及ぶと、さらなる鳥獣被害が発生するといった悪循環に陥る。

増えすぎた野生鳥獣に対して、わが国では2007年度に「鳥獣による農林水産業等に係る被害の防止のための特別措置に関する法律(鳥獣被害防止特措法)」ならびに「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)」を改正し、積極的な駆除が推進されている。環境省の統計では、2018年度には狩猟による捕獲と被害防止等を目的とした許可に基づく捕獲を含め、約60万頭の野生鹿と、56万頭の野生猪が捕獲され、個体数の調整が図られている(図2および図3)。

「鳥獣保護管理法」の改正時の付帯決議として、「捕獲した野生鳥獣を可能な限り食肉等として活用するため、国において、最新の知見に基づくガイドラインを作成するとともに、各都道府県におけるマニュアル等の作成を支援するなど衛生管理の徹底等による安

全性の確保に努めること」が記載された。これを受け、厚生労働省は、2014年に、「野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドライン」を作成し、野生鳥獣肉を衛生的に食用利用するため、捕獲から剥皮、解体処理といった一連の食肉処理工程における衛生上の注意点が取りまとめられた。2017年には「未来投資戦略 2017」が閣議決定され、“新たに講ずるべき具体的施策として、「ジビエの利活用の促進等」が挙げられ、「ジビエの利活用の促進等・鳥獣被害防止のため有害鳥獣の捕獲を強化するとともに、捕獲鳥獣の有効活用を通じた地域の所得向上を図るため、家畜以外の動物の肉を食用にしたジビエの需要開拓を図りつつ、人材育成、流通ルールの導入など安全・安心なジビエの供給体制を整備する」ことが国策として推進されることとなった。ジビエ(gibier)とは、狩猟で得た天然の野生鳥獣の肉や料理を意味するフランス語で、ヨーロッパでは古くから発展してきた。これを受け、農林水産省は、より安全なジビエの提供と消費者のジビエに対する安心の確保を図ることを目的として2018年に「国産ジビエ認証制度」を制定し、野生鳥獣肉の消費拡大を推進している。

ジビエ処理施設で処理された野生鳥獣の頭・羽数は、統計をとりはじめた2016年度以降、漸増している(図4)。2019年度における鹿および猪の捕獲頭数はそれぞれ602,900頭、640,100頭であるのに対し、ジビエ処理施設で処理された鹿、および猪は、それぞれ81,869頭、34,481頭で、ジビエとしての利用率は、鹿で捕獲頭数全体の13.6%、猪で5.4%と低率である。捕獲された野生鳥獣を有効に活用する方法として、地元のレストラン等で鹿肉や猪肉を使った料理を提供したり、精肉店やインターネット等を介して販売す

る新たな試みが各地で進められている。北海道では捕獲したエゾシカを、道が指定する食肉処理施設に食肉用として搬入した場合に、その経費を支援する「エゾシカジビエ利用拡大推進事業」を実施し、ジビエの食用活用を促進している。また、和歌山県や福井県などでは、学校給食にジビエを取り入れる試みが、さらに、防衛省では自衛隊員や防衛省職員の仕事にジビエを活用する試みが実施されている。このような政府や農林水産省、地方自治体における様々な取り組みにより、2016年度以降、ジビエの消費は増加し、2019年度には、鹿肉 973 t、猪肉 406 t が食用として流通し、その他の鳥獣肉を含めると 1,480 t が消費されている(図 5)。

野生鳥獣を食用利用する一連の工程を家畜のそれと比較すると、食用に供される動物が①衛生管理、②飼養管理、③健康管理がされていない点が、大きく異なっている。このため、野生鳥獣は家畜では見られないような病原体を保有している可能性があり、マダニ等の外部寄生虫が寄生している可能性も高い。さらに、鹿や猪などの野生鳥獣は、と畜場法の対象となっていないため、解体時におけると畜検査は義務づけられていない。また、鹿や猪を捕獲した後に、狩猟者が素手でこれらの動物を解体し、生あるいは生に近い状態で肉や肝臓等を喫食することが慣例的に行われている地域もある。野生鹿や猪が食用に利用される機会が増加していることから、それらの食用利用におけるリスクを評価することは、公衆衛生上極めて重要である。

わが国では、これまでジビエの喫食等が原因となった人獣共通感染症が 15 例報告されている(表 1)。病因物質としては、E 型肝炎ウイルス、旋毛虫(トリヒナ)、腸管出血

性大腸菌やサルモネラなどが報告されている。2008年、千葉県で発生した野兎の解体処理を原因とする野兎病の発症事例を除く14例は、加熱しないか、あるいは加熱不十分のジビエを喫食したことにより発生している。

本学位論文では、消費拡大傾向にあるジビエのリスク評価を目的として、第1章では、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 (STEC O157) の保菌状況と分離株の病原性解析を行った。第2章では、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を行った。第3章では、新たな食品媒介性感染症の原因菌として注目されている *Arcobacter* 属菌を対象とし、鹿および猪の保菌状況を検討した。本研究により得られた各種分離株は、分子生物学的手法により病原関連遺伝子の保有状況を解析することで、人に対する潜在的な病原性を評価した。

農作物被害金額
(億円)

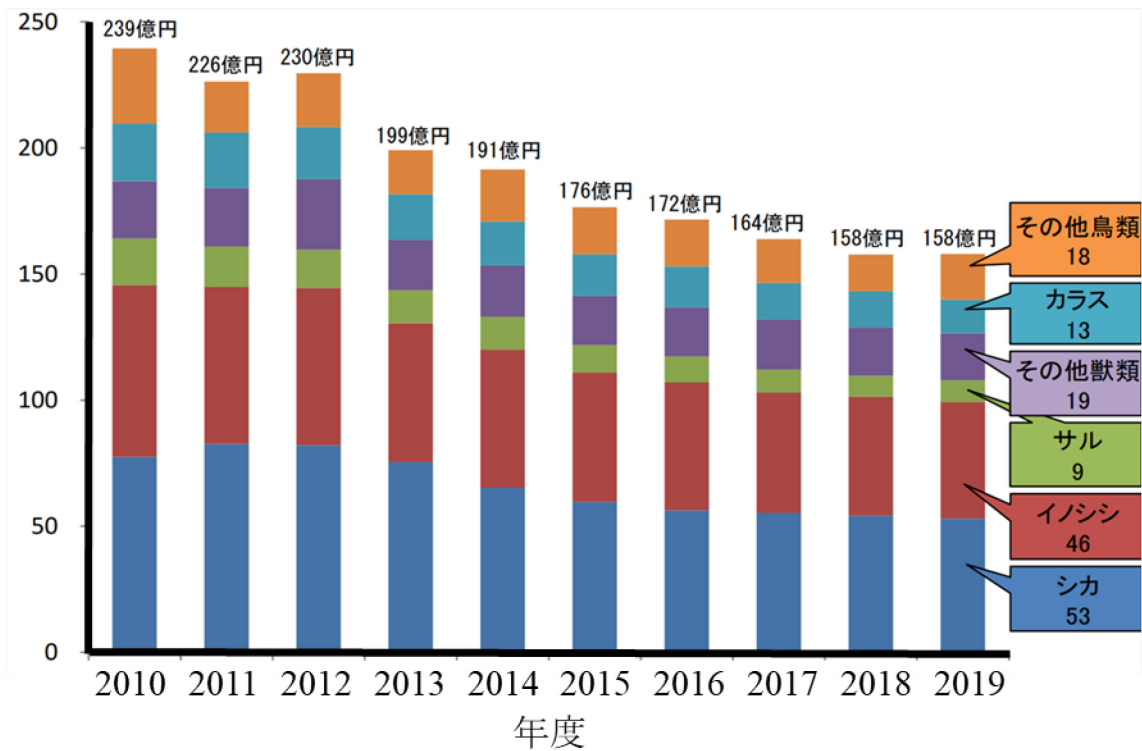


図 1 わが国の野生鳥獣による農作物被害金額の推移(2010～2019 年度)

各棒グラフの青は鹿、赤は猪、緑は猿、紫はその他の獣類、薄青はカラス、橙はその他の鳥類によるそれぞれの農作物被害金額を示す。出典：農林水産省 捕獲鳥獣のジビエ利用を巡る最近の状況(令和3年8月版)(<https://www.maff.go.jp/>)

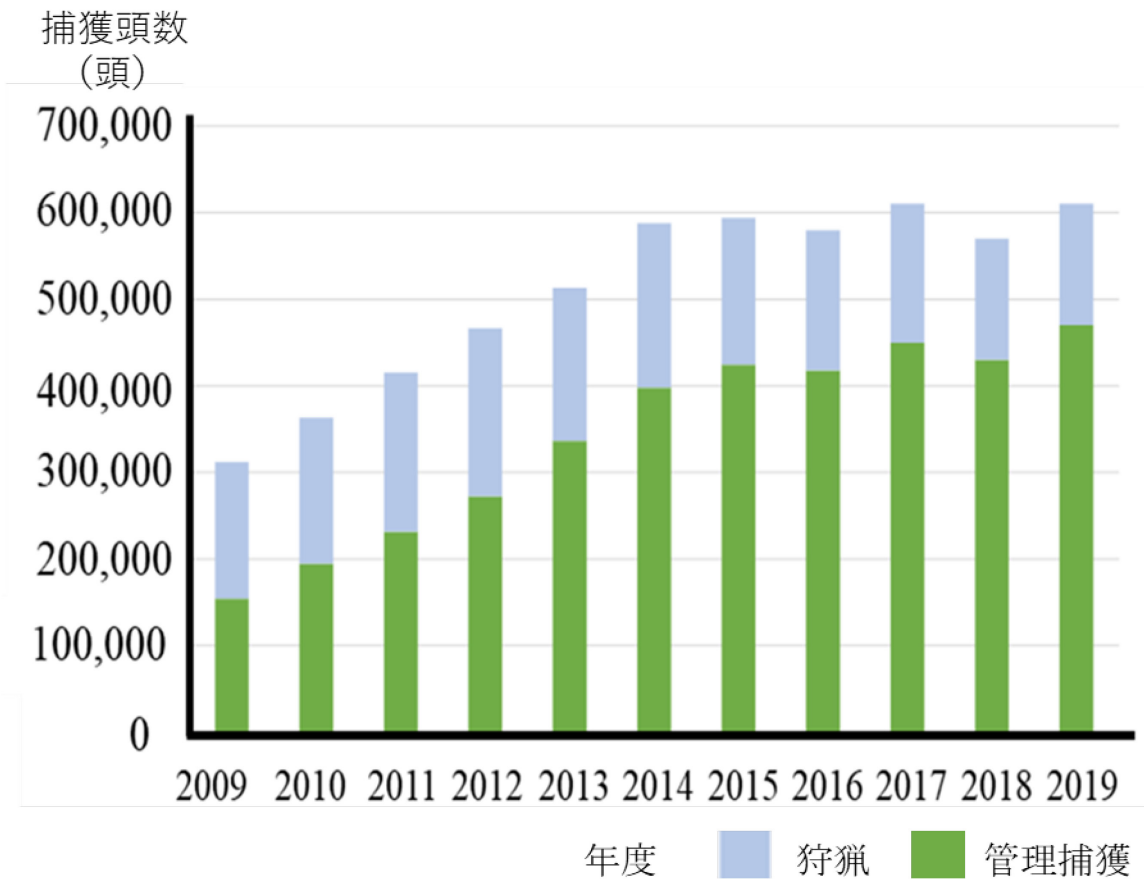


図 2 わが国の鹿の捕獲頭数の推移(2009～2019 年度)

灰色棒グラフは、狩猟による捕獲頭数を、緑色棒グラフは、管理捕獲による捕獲頭数をそれぞれ示す。出典：農林水産省 捕獲鳥獣のジビエ利用を巡る最近の状況(令和 3 年 8 月版) (<https://www.maff.go.jp/>)

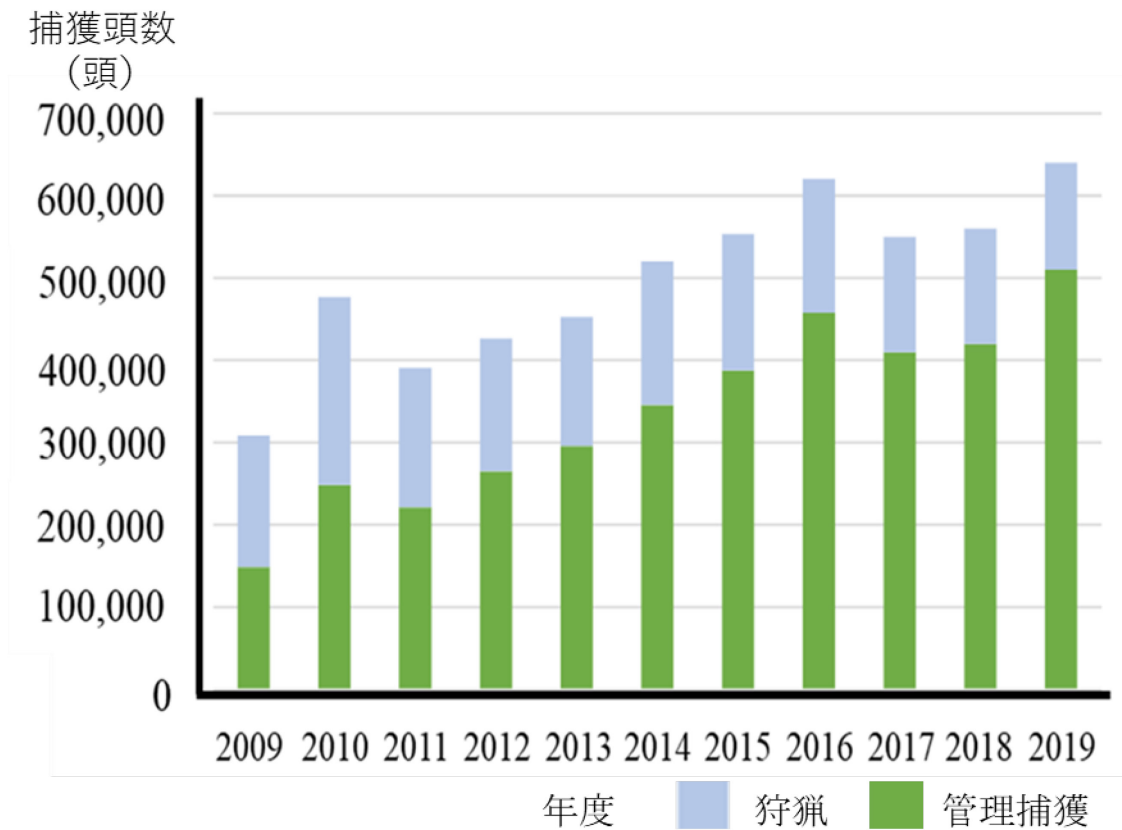


図 3 わが国の猪の捕獲頭数の推移(2009～2019 年度)

灰色棒グラフは、狩猟による捕獲頭数を、緑色棒グラフは、管理捕獲による捕獲頭数をそれぞれ示す。出典：農林水産省捕獲鳥獣のジビエ利用を巡る最近の状況(令和 3 年 8 月版) (<https://www.maff.go.jp/>)

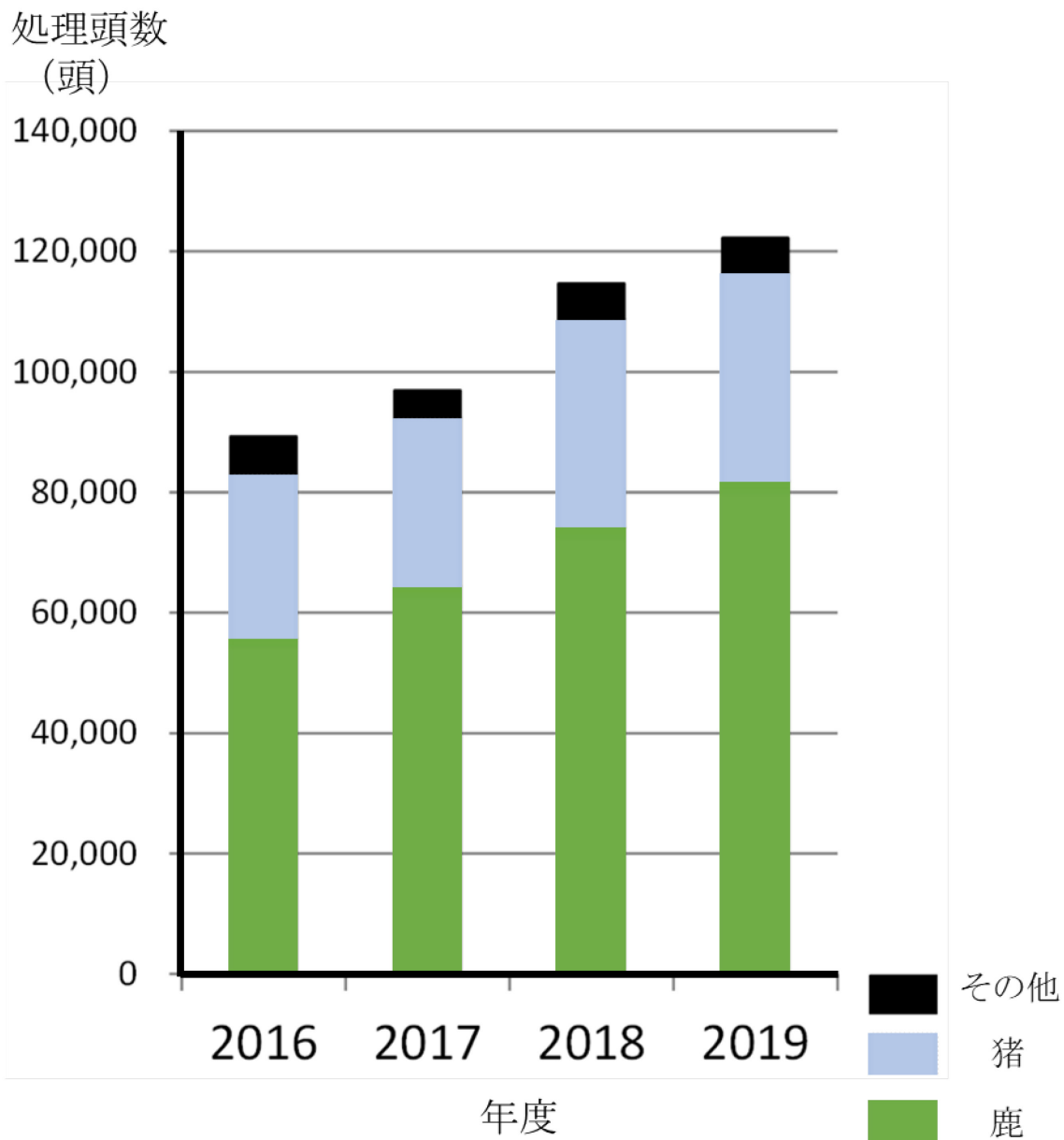


図 4 野生鳥獣処理施設で処理された野生鳥獣数の推移(2016～2019 年度)

緑色棒グラフは鹿の処理頭数、灰色棒グラフは猪の処理頭数、黒色棒グラフはその他の野生鳥獣の処理頭数をそれぞれ示す。出典：農林水産省 捕獲鳥獣のジビエ利用を巡る最近の状況(令和 3 年 8 月版) (<https://www.maff.go.jp/>)

消費量
(トン)

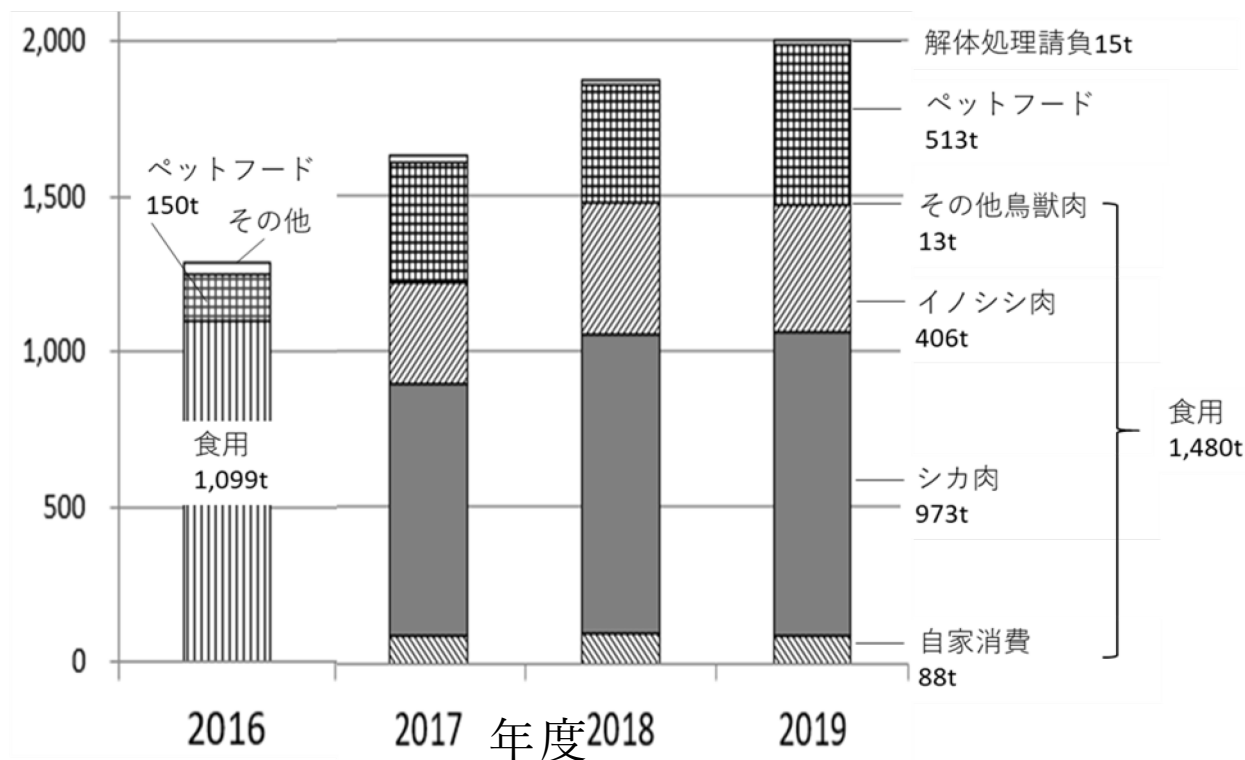


図 5 ジビエの消費用途とその量の推移 (2016～2019 年度)

右斜線棒グラフは自家消費、灰色の棒グラフは鹿肉、左斜線棒グラフは猪肉、黒色棒グラフはその他の鳥獣肉のそれぞれ食用による消費量を示す。格子の棒グラフは、ペットフードとして、白の棒グラフは、その他の用途での消費量をそれぞれ示す。なお、2016 年度における食用利用の詳細な内訳は不明のため、纏めて表記した。出典：農林水産省捕獲鳥獣のジビエ利用を巡る最近の状況 (令和 3 年 8 月版) (<https://www.maff.go.jp/>)

表 1. わが国のジビエの喫食等が原因で発生した人獣共通感染症*)

年	県	原因食品	感染症名	患者数	死者数
1981	三重県	冷凍熊の刺身	旋毛虫(トリヒナ)	172	0
1997	山形県	鹿肉の刺身	腸管出血性大腸菌	4	0
2000	大分県	鹿肉の琉球	サルモネラ症	9	0
2001	大分県	鹿肉の刺身	腸管出血性大腸菌	3	0
2003	兵庫県	冷凍生鹿肉	E型肝炎	4	0
2003	鳥取県	猪の生肝臓	E型肝炎	2	1
2005	福岡県	猪肉	E型肝炎	1	0
2008	千葉県	野生兎	野兎病	1	0
2009	茨城県	鹿の生肉	腸管出血性大腸菌	1	0
2009	神奈川県	鹿肉(推定)	不明	5	0
2016	茨城県	熊肉のロースト	旋毛虫(トリヒナ)	15	0
2018	北海道	熊肉(推定)	旋毛虫(トリヒナ)	3	0
2018	和歌山県	鹿肉の刺身	サルコシステイス	3	0
2019	新潟県	鹿肉の刺身	サルコシステイス	30	0
		熊肉のロースト			
2019	北海道	赤ワインソース (推定)	旋毛虫(トリヒナ)	6	0

*) : 厚生労働省・食品安全委員会ジビエを介した人獣共通感染症

(<https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/140805-gibier.pdf>)

第1章

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

1.1 はじめに

志賀毒素産生大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) は志賀毒素 1 型 (Stx1) および志賀毒素 2 型 (Stx2) を産生する大腸菌で、人に出血性大腸炎 (hemorrhagic colitis: HC)、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) 等を引き起こし、腸管出血性大腸菌症の原因となる[61]。厚生労働省における 2020 年の統計では、腸管出血性大腸菌症の患者から分離される血清型は O157:H7 (STEC O157) が最も多く、全体の 47.2%を占めている [67]。また、多くの国においても STEC O157 は激しい腹痛、水様性もしくは出血性の下痢、HC、HUS、腎臓や神経障害、脳炎などの様々な症状を引き起こす最も一般的な腸管出血性大腸菌の血清型であることが報告されている[96]。

わが国では山形県[88]、大分県[68]、茨城県[68]において鹿の生肉を原因とした STEC O157 による症例が報告されていることから、野生鳥獣肉が保有する本菌のリスク評価が急務の課題となっている。鹿における STEC O157 保菌率は、米国で 0.3~2.4%[25, 100, 105]、スペインで 1.5%[104]と報告されている。猪における STEC O157 の保菌率は、スペインで 0~3.4%[21, 85, 104]、スウェーデンで 1.4%[118]と報告されている。わが国の鹿や猪における STEC 保菌状況に関する研究は、Sasaki[106]や Tomino ら[115]が報告しているのみで対象地域や検体数も限られている[106, 113]。

米国の特定の地域で捕獲された野生鹿から分離された STEC 株は、当該地域内の牧場で飼育する肥育牛から分離された STEC 株の遺伝子性状と類似していたことから、野生鹿と牛との間で STEC が伝播している可能性が示唆されている[109]。また、Mora ら[80]は、スペインの野生鹿、

猪および飼育牛から分離した株の pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析を行い、野生鹿および猪分離株と牛分離株の PFGE パターンが類似していたことから、三動物間で STEC が相互に伝播している可能性を報告している。しかしながら、わが国の野生動物と家畜間での STEC 伝播の可能性についてはほとんど検討されていない。

Manning ら[74]は、STEC O157 による腸管出血性大腸菌症の患者間で、HUS や HC、水様性下痢といった症状に差がみられることに着目した。異なる症状を示した各患者由来の各 STEC O157 株について、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム(Whole-Genome Sequencing: WGS)解析を行い、特定の遺伝子座における一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP)を解析することにより、患者の症状と関連づけて、分離株を 9 つの Clade に分類する Clade 解析法を開発した。また、Yang ら[127]は、4 つの遺伝子および 2 つの遺伝子間領域をマーカーとした Lineage Specific Polymorphism Assay-6 (LSPA-6)を用い、STEC O157 株の病原性に基づいて 2 つの系統、すなわち、Lineage I および Lineage II に分類する Lineage 解析法を開発した。さらに Zhang ら[131]は、Lineage 解析法による分類を、特定の領域(IS629 分布)に基づき、Lineage I、I/II、IIへ細分化されることを報告した。Hirai ら[48]は、これまでの STEC O157 の進化モデルと Clade 解析法および Lineage 解析法による解析結果を比較し、従来の Clade 解析法では、同一の Clade に属する複数の株が、Lineage 解析法では異なる Lineage に分類されたことから、従来の Clade 解析を細分化した新たな進化モデルを提案した。この新たな Clade 分類では、従来 Clade 4/5 に分類された株のうち、Lineage 分類で、Lineage I、I/II、および II となる株を、それぞれ Descendant clade 4/5、Ancestral clade 4/5、および Putative clade 13 とした。さらに従来の Clade 7、8、9 であった株のうち、

Lineage 分類で Lineage I/IIであった株をそれぞれ Clade 7、8、9 とし、同 Lineage IIであった株をそれぞれ Putative clade 10、11 および 12 とした。この進化モデルによる分類で Clade 1～9 に属する株は比較的病原性が高く、出血性下痢を呈する患者から高率に分離されること、その中で Clade 8 に属する株は HUS の発症率が比較的に高いことから、重症例との関連性が報告されている。一方、Putative clade 10 から Putative clade 13 の株は比較的病原性が低く、水様性下痢を呈する患者から高率に分離されている[74]。しかし、これまでに検討された株は患者由来であり、野生動物由来 STEC O157 株については、これまで Clade 解析は実施されていない。

近年、新たな遺伝子解析の手法として、WGS 解析が普及している。米国で発生した食中毒事例から分離された EDL933 株[95, 99]や、大阪府堺市の STEC O157 感染症事例から分離された Sakai 株[29]など、大規模な食中毒事例の原因となった STEC O157 株[44, 73, 92]の WGS 解析では[44, 73, 92]、病原関連遺伝子の特定、非病原性大腸菌 K-12 株との比較解析および STEC O157 に特異的な塩基配列の特定、遺伝子の多様性が報告されている [29, 44, 73, 92, 95, 99]。その一方で、鹿由来 STEC O157 株については、一部の株のドラフトゲノムが解析されているのみであり、鹿を含む野生動物が保菌する STEC O157 株の、病原関連遺伝子の保有状況は検討されていない[3, 11]。

本研究では、わが国の鹿および猪における STEC O157 の保菌状況を検討するとともに、鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の PFGE 解析を行い、野生動物と家畜間での O157 伝播の可能性について検討した。また、STEC O157 株の系統解析ならびに WGS 解析を行い、網羅的な病原関連遺伝子、薬剤耐性関連遺伝子性状を検討することにより、人への病原性を評価した。

1.2 材料および方法

1.2.1 材料

2012年9月から2019年8月にかけて、21県(8地域)で捕獲した鹿474頭、および16県(7地域)で捕獲した猪426頭から直腸便をそれぞれ採取した。さらに、九州地域のU県において STEC O157 が分離された猪の捕獲地域周辺の農場で飼育されていた1頭の牛から分離された1株(17C15-2株)についても、本研究に供試した。直腸便サンプルは4°C以下で、日本大学生物資源科学部獣医食品衛生学研究室に輸送した。全ての検体は、採取後72時間以内に実験に使用した。

1.2.2 STEC O157 分離培養

腸管出血性大腸菌検査・診断マニュアル[66]に基づき、STEC O157 を分離した。すなわち、鹿および猪の直腸便0.5g量を4.5mLのノボビオシン加 modified *Escherichia coli* 培地^{*1}(ノボビオシン加 mEC 培地)(栄研化学株式会社、東京)に接種して42°Cで18時間増菌培養した。免疫磁気ビーズ O157「生研」(デンカ生研株式会社、東京)を用いて増菌培養液中の STEC O157 を濃縮した後、1白金耳量を、クロモアガーO157 培地^{*2}(CHROMagar 社、Paris、France)および Cefixime-Tellurite 加ソルビトールマッコンキー培地^{*3}(CT-SMAC 培地)(栄研化学株式会社)に塗抹し、37°Cで24時間培養した。クロモアガーO157 培地上の紫色コロニーならびに CT-SMAC 培地上の無色透明コロニーを、各培地毎に最大5コロニー釣菌し、普通寒天培地^{*4}(栄研化学株式会社)で

37°C、24 時間純培養した。

1.2.3 分離株からの DNA 抽出

純培養した各分離株の約 1/4 白金耳量を採取し、1ml の滅菌 Phosphate buffered saline (PBS)を加えた 1.5ml 尖底プラスチックチューブ内で混和した。ボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、14,400×g (12,600rpm) で 5 分間遠心洗浄した。上清を除去した後、InstaGene Matrix (Bio-Rad 社、Hercules、USA)を 30μl 加え、再び混和した後、56°Cで 30 分間加熱処理した。ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、100°Cで 8 分間煮沸した。再度ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、14,400×g (12,600rpm) で 5 分間遠心分離し、その上清を DNA 抽出原液とした。DNA 抽出原液は波長 260nm における吸光度 (OD)から DNA 濃度、ならびに OD 260nm/280nm 比から DNA 純度を算出し、OD 260nm/280nm 比が 1.8~2.0 の検体について、Nuclease-Free Water (Invitrogen 社、Waltham、USA) で DNA 濃度を 20ng/μl に調整した。

1.2.4 PCR による分離株の菌体外抗原遺伝子 (*rfbE*_{O157}) の検出

分離株の *rfbE*_{O157} の検出は、Wang ら[119]によって報告された Polymerase chain reaction (PCR)法により行った。*rfbE*_{O157}特異的 PCR に使用したプライマーの塩基配列は表 1-1 に、試薬の組成は表 1-2 に、PCR 反応条件は表 1-3 にそれぞれ示した。なお、陽性対照として STEC O157 群 EC2 株から抽出した DNA 溶液、陰性対照として Nuclease-Free Water (Invitrogen 社)をそれぞれ用いた。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動で確認した。Mupid 電気泳動槽 (株式会社 Mupid 社、

東京)に TAE buffer を約 350ml 入れた後、2%アガロースゲル(Agarose S、ニッポン・ジーン社、東京)を泳動槽に設置した。5 μ l の各 PCR 産物ならびに DNA サイズマーカーの 100bp DNA ladder (アンテグラル社、東京)をゲルのウェル内に添加し、電圧 100V で約 30 分間電気泳動した後、ゲルを 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で 10 分間染色した。染色したゲルは再精製水に 15 分間浸漬して脱色した後、紫外線ゲル撮影装置(アトー株式会社、東京)を用いてゲルの写真を撮影した。約 327bp の位置に増幅バンドが認められた株を *rfbE*_{O157} 保有株とした。

1.2.5 STEC O157 株の血清型別

*rfbE*_{O157} 保有株について、*E. coli* O157-F「生研」(デンカ生研株式会社)を使用し、O157 スライドラテックス凝集試験を行った。各分離株を普通寒天培地に接種し、37°Cで 24 時間培養した。培地上の菌体を添付の綿棒でマッチ棒の頭 3 倍程度掻き取り、サンプルカップに立て、2 滴の抽出試薬 1 を滴下した。さらに 2 滴の抽出試薬 2 を加え、綿棒をサンプルカップの壁に押しつけるように回しながら攪拌し、5 分間静置した。さらに、2 滴の抽出試薬 3 を加え、攪拌した後に綿棒内部の液をサンプルカップに絞り出すようにして集め、試料とした。スライド凝集反応板の 2 つのサークルに試料を 25 μ l ずつ滴下した後、一方に感作ラテックスを、他方に対照ラテックスを 1 滴、それぞれに滴下した。スライド凝集反応板を 2 分間揺り動かして、反応させ、凝集した株を STEC O157 と同定した。

1.2.6 STEC O157 株の系統解析

Clade 解析は Yokoyama ら[130]の方法に従った。すなわち、7つの SNP を含む遺伝子座 (ECs2521、ECs3881、ECs4130、ECs3942、ECs0517、ECs2357、ECs0654) を Amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (ARMS-PCR) 法によりそれぞれ増幅した。ARMS-PCR に使用したプライマーの塩基配列を表 1-4 に、試薬の組成を表 1-5 に示した。さらに、ECs2521、ECs4130、ECs3942 領域を標的とした ARMS-PCR 法の反応条件を表 1-6 に、ECs3881、ECs0517、ECs2357、ECs0654 領域を標的とした ARMS-PCR 法の反応条件を表 1-7 にそれぞれ示した。得られた PCR 産物は、1.2.4 で示した電気泳動を行い、表 2-4 に示す各領域の増幅塩基長付近の増幅バンドの有無を確認し、SNP を決定した。決定した 7 領域の SNP のパターンから、8 つの Clade に分類した(表 1-8)。

Lineage 解析は、Yokoyama ら[128]の方法に従った。Lineage Specific Polimorphism Assay-6 (LSPA-6)法に使用する 4 つの遺伝子 (*Z5935*、*yhcG*、*rbsB*、*rtcB*) および 2 つの遺伝子間領域 (*fold-sfmA*、*arp-iclR*) を標的とした PCR に使用したプライマーの塩基配列を表 1-9 に、試薬の組成を表 1-10 に PCR の反応条件を表 1-11 にそれぞれ示した。得られた PCR 産物は、1.2.4 で示した方法により電気泳動した後、目的とする増幅バンドをゲルから切り出し、EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (BIO BASIC 社、Toronto、Canada) 用いて、添付のプロトコールに従い DNA を抽出した。さらに、ダイレクトシーケンス法により、各 PCR 産物の塩基配列を決定し、増幅塩基長を決定した。各領域の増幅塩基長から、領域毎に表 1-12 で示した方法に従って番号(1~5)を付与した。各遺伝子領域 (*fold-sfmA*、*Z5935*、*yhcG*、*rbsB*、*rtcB*、*arp-iclR*) の番号の組み合わせ

が「1N111N」(N は任意)となった株を Lineage I、「2N111N」となった株を Lineage I/II、それ以外の遺伝子番号の組み合わせとなった株を Lineage IIとした。

Clade 4/5 から 9 の株については、Hirai ら[48]の命名法に従い、Clade 解析と Lineage 解析を組み合わせて、新たに Descendant clade 4/5 から Putative clade 13 までの、計 13 の Clade に分類した。すなわち、Clade 4/5 の株のうち、Lineage 解析で Lineage IIに分類された株を Descendant Clade 4/5 に、Lineage I/IIに分類された株を Ancestral Clade 4/5 とした。同様に、Clade 7、8、および 9 の株のうち、Lineage I/IIに分類された株を、それぞれ Clade 7、8 および 9 とし、Lineage IIに分類された株をそれぞれ、Putative Clade 10、Putative Clade 11 および、Putative Clade 12 とした。

1.2.7 STEC O157 株の WGS 解析

i) DNA 抽出

各 STEC O157 株を 4ml の LB ブロス^{*5} に接種し、37°C で 18 時間、振盪培養した。5,000 ×g (7,400rpm) で 10 分間遠心分離し、上清を廃棄した後、回収された菌から、NucleoBond Buffer Set III (MACHEREY-NAGEL 社、Düren, Germany)、NucleoBond AXG 20 (MACHEREY-NAGEL 社)を用いて、添付のプロトコールを一部改変して DNA 抽出を行った。すなわち、N5 Buffer (NucleoBond Buffer Set III) で DNA を溶出した後、2-プロパノール(和光純薬工業株式会社、大阪)を加え、4°C で 20,400×g (15,000rpm) で 25 分間遠心分離して、上清を取り除いた。さらに、1,000μl の 70%エタノールを加え、20,400×g (15,000rpm) で 10 分間遠心分離して、上清を取り除いた。さらに、1,000μl の 70%エタノールを加え、20,400×g (15,000rpm) で 5 分間遠心分離、DNA を

沈殿させた。沈殿した DNA は 100 μ l の TE Buffer^{*6} で溶出し、ゲノム DNA とした。

ii) DNA の断片化および精製

NEBNext dsDNA Fragmentase (BioLabs 社、Hercules、USA) を用いて、添付のプロトコールに従って、ゲノム DNA を断片化した。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega 社、Madison、USA) を用いて、添付のプロトコールに従い、断片化した DNA を精製した。また、AMPure XP (Beckman Coulter 社、Brea、USA) を用いて、添付のプロトコールに従って、断片化 DNA を精製した。さらに、Agilent D1000 ScreenTape & Reagents (Agilent Technologies 社、Santa Clara、USA) を用いて、Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies 社) により、断片化した DNA の塩基長が 200bp~300bp であることを確認し、これを断片化 DNA とした。

iii) ライブラリー調整

断片化 DNA は NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs 社、Ipswich、USA)、NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (New England Biolabs 社) を用いて、添付のプロトコールに従い、ライブラリー調整を行った。Agilent 2200 TapeStation により調整したライブラリーの塩基長が 300~450bp であることを確認した。さらに、NanoDrop を用いて OD_{260nm} から DNA 濃度、ならびに OD_{260nm}/OD_{280nm} 比から DNA 純度を算出した。さらに、Qubit4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific 社、Waltham、USA) を用いて Double-stranded DNA (dsDNA) 濃度を測定した。

iv) 次世代シーケンサーを用いた WGS 解析

調整したライブラリー dsDNA を、MiSeq Reagent Nano Kit v2 500-cycles (illumina 社、San Diego、USA) に添加した後、次世代シーケンサー MiSeq (illumina 社) を用いて、WGS 解析を行った。MiSeq から出力された Fastq 形式の各リードの塩基配列は、ゲノム解析統合ソフトウェア CLC Genomics Workbench Ver. 8.5.1 (Qiagen 社、Venlo、Nederland) を用いて、ambiguous limit, 2; quality limit, 0.05; discard reads below length, 60 の条件でトリミングした。続いて、トリミング済のリードを Escherichia coli O157:H7 Sakai 株の全ゲノム配列 (accession No. NC_002695.2) にマッピングし、リードの Coverage 数が 50×以上となった領域の塩基配列をコンセンサス配列として採用した。各配列は Fasta 形式でそれぞれ保存した。

1.2.8 STEC O157 株の遺伝子解析

Fasta 形式のコンセンサス配列について、Center for Genomic Epidemiology (CGE) web site (<http://www.genomicepidemiology.org/>) 上で、VirulenceFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) による病原関連遺伝子の保有状況、ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) による薬剤耐性遺伝子を解析した。

1.2.9 STEC O157 株の 23S rDNA 突然変異の検出

Fasta 形式のコンセンサス配列について、DDBJ Fast Annotation and Submission Tool

(DFAST) (<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>) 上で、23S rDNA の遺伝子配列を同定した。続いて、遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX Ver. 15 (株式会社 ゼネティックス、東京) を用いて Weisblum ら[12] および Xiong ら[125] の報告にある 23S rDNA 領域の 4 座位 (2032、2057、2058、2059) における点突然変異 G2032A/C、G2057A、A2058G/C、および A2059G の有無を検討した。

1.2.10 STEC O157 株の薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は BD センシ・ディスク (Becton・Dickinson 社、Franklin Lakes、USA) を用い、ディスク拡散法により行った。各分離株を普通寒天培地上に塗抹し、37°C、18～24 時間培養を行った後、培地上の菌を回収し、滅菌生理食塩水を用いて McFarland 0.5 の濃度に調整した。調整した各菌液を、滅菌綿棒を用いてミューラーヒントン寒天培地 (栄研化学株式会社) の全面に塗抹し、3～5 分間静置して培地表面が完全に乾燥した後、15 分以内に薬剤ディスクを配置した。薬剤ディスクは、アンピシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、セファゾリン (CEZ)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、ナリジクス酸 (NA)、クロラムフェニコール (CP)、サルファ剤-トリメトプリム合剤 (ST)、エリスロマイシン (EM) の計 10 種類の薬剤を用いた。37°C、16～18 時間培養した後、阻止円を測定し、添付のプロトコールに従い、感性または耐性を判定した。

1.2.11 STEC O157 株の PFGE 解析

各分離株の PFGE 解析は PulseNet[15] の方法に従った。すなわち、普通寒天培地に

STEC O157 株およびマーカーの *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 株を接種し、37°C で24時間培養した。培地表面に発育した菌体を2mlの Cell Suspension Buffer (CSB)^{*7} に懸濁後、懸濁液の吸光度が OD_{610nm}=1.00 となるように CSB で調整した。1.5ml 尖底プラスチックチューブに調整した菌液 0.4ml、20 μ l の Proteinase K^{*8}、0.4ml のプラグ用 1% SeaKim Gold アガロース^{*9} (SKG、Lonza 社、Rockland、USA) を加え、混和した後 PFGE プラグキャストに分注し、室温で固めてアガロースプラグを作製した。5 ml の Cell Lysis/ProteinaseK Buffer^{*10} にアガロースプラグを浸漬し、55 °C、204 \times g (150rpm) で振盪しながら 2 時間処理した。その後、55°C の超純水で 15 分間の振盪処理を 2 回、55°C の TE Buffer で 15 分間の振盪処理を 4 回、それぞれ行い、アガロースプラグを洗浄した。アガロースプラグを幅 2.0mm にカットし、200 μ l の 1x restriction buffer^{*11} に浸漬し、室温で 15 分処理をしたのち、制限酵素ミックス^{*12} に浸漬し 37°C で 2 時間制限酵素処理を行った。アガロースプラグを 200 μ l の 0.5x TBE Buffer^{*13} に浸漬し、室温で 5 分間洗浄を行った。1% SKG アガロース^{*14} を作製し、各 well にアガロースプラグを挿入した後、空気が入らないように 1% SKG アガロースで封入した。十分に 1% SKG アガロースが固まった後、CHEF MAPPER (Bio-Rad 社) を用いて表 1-13 に示す条件で電気泳動した。泳動後、ゲルを 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド溶液で染色し、UV 照射下で写真を撮影した。写真は、Bionumerics software Ver. 5.10 (Applied Maths 社、Sint-Martem、Belgium) を用いてバンドパターンを解析した。

表 1-1. *rfbE*₀₁₅₇ 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>rfbE</i> ₀₁₅₇	rfbE-a	CTACAGGTGAAGGTGGAATGG	327bp
	rfbE-b	ATTCCTCTCTTTCCTCTGCGG	

表 1-2. *rfbE*₀₁₅₇ 特異的 PCR に用いた試薬と用量

Go Taq Master Mix (Promega 社)	10 µl
DNA 溶液	2 µl
10µM プライマー	各 1 µl
Nuclease Free Water (Invitrogen 社)	Up to 20 µl

表 1-3. *rfbE_{O157}* 特異的 PCR の反応条件

遺伝子領域	反応(サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)	
<i>rfbE_{O157}</i>	初期熱変性 (×1)	95	480	
	増幅(×30)	熱変性	95	20
		アニーリング	58	30
		伸長反応	72	30
	最終伸長 (×1)	72	420	

表 1-4. ARMS-PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
ECs2521	2521C-F	CGCAACTACCAGAACAGTTACATC	272bp
	2521G-F	CGCAACTACCAGAACAGTTACATG	
	2521-R	TTCCGCTTCTTCCTGGCTAT	
ECs3881	3881C-F	ACGACAAAGACGTGTGCATC	206bp
	3881T-F	ACGACAAAGACGTGTGCATT	
	3881-R	TTCACGCGTACCAAAAATCA	
ECs4130	4130C-F	GTGGTACATGCCGCTGAC	162bp
	4130T-F	GTGGTACATGCCGCTGAT	
	4130-R	AGTATGCGGCAGGCCTATAA	
ECs3942	1011G-F	TGAGACGGGCAAACCCTG	215bp
	1011T-F	TGAGACGGGCAAACCCTT	
	1011-R	CTATGCGTAGTGCGCCAGTG	
ECs0517	3942-F	GGGCGCGTATGAATTAGGTGT	156bp
	3942A-R	GTGAGATCCCAGCCAATGGAT	
	3942C-R	GTGAGATCCCAGCCAATGGAG	
ECs2357	517-F	TGGCACGAAAAACCAAACAA	273bp
	517A-R	TCTCTCTTAATACTGAGAGTGGATCGTT	
	517G-R	TCTCTCTTAATACTGAGAGTGGATCGTC	
ECs0654	2357-F	CGCTCTAAAGAAGCGTTTGG	409bp
	2357C-R	CGTTTTCCAGTGGCTCAG	
	2357A-R	CGTTTTCCAGTGGCTCAT	

表 1-5. ARMS-PCR に用いた試薬と用量

Go Taq Master Mix (Promega 社)	10 μ l
DNA 溶液	2 μ l
10 μ M プライマー	各 1 μ l
Nuclease Free Water (Invitrogen 社)	Up to 20 μ l

表 1-6. ECs2521、ECs4130、ECs3942 領域を標的とした ARMS-PCR の反応条件

反応 (サイクル数)	温度 ($^{\circ}$ C)	時間 (秒)	
初期熱変性 ($\times 1$)	95	300	
増幅 ($\times 5$)	熱変性	20	
	アニーリング	70 (-1° C/cycle)	30
	伸長反応	72	30
増幅 ($\times 35$)	熱変性	30	
	アニーリング	65	30
	伸長反応	72	30
最終伸長 ($\times 1$)	72	420	

表 1-7. ECs3881、ECs0517、ECs2357、ECs0654 領域を標的とした ARMS-PCR の反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	95	300
増幅 (×5)	熱変性	20
	アニーリング	68 (-1°C/cycle)
	伸長反応	72
増幅 (×35)	熱変性	30
	アニーリング	63
	伸長反応	72
最終伸長 (×1)	72	420

表 1-8. Clade 解析で使用した各遺伝子座における塩基

Clade	各遺伝子座における塩基						
	ECs2521	ECs3881	ECs4130	ECs3942	ECs0517	ECs2357	ECs0654
1	C	T	T	A	A	C	T
2	G	T	T	A	A	C	T
3	G	C	T	A	A	C	T
4/5	G	C	C	A	A	C	T
6	G	C	C	C	A	C	T
7	G	C	C	A	G	C	T
8	G	C	C	A	G	A	T
9	G	C	C	A	G	C	C

表 1-9. Lineage 解析の PCR に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')
<i>folD-sfmA</i> *	folD-sfmA-F	TACGTAGGTCGAAGGG
	folD-sfmA-R	CCAGATTTACAACGCC
Z5935	Z5935-F	GTGTTCCCGGTATTG
	Z5935-R	CTCACTGGCGTAACCT
<i>yhcG</i>	yhcG-F	CTCTGCAAAAACTTACGCC
	yhcG-R	CAGGTGGTTGATCAGCG
<i>rbsB</i>	rbsB-F	AGTTTAATGTTCTTGCCAGCC
	rbsB-R	ATCACCGCTTTTTCGCC
<i>rtcB</i>	rtcB-F	GCGCCAGATCGATAAAGTAAG
	rtcB-R	GCCGTTGTAAACGTGATAAAG
<i>arp-ictR</i> *	arp-ictR-F	GCTCAATCTCATAATGCAGCC
	arp-ictR-R	CACGTATTACCGATGACCG

* 増幅した遺伝子間領域

表 1-10. Lineage 解析の PCR に用いた試薬と用量

Go Taq Master Mix (Promega 社)	10 μ l
DNA 溶液	2 μ l
10 μ M プライマー	各 1 μ l
Nuclease Free Water (Invitrogen 社)	Up to 20 μ l

表 1-11. Lineage 解析の PCR 反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	94	300
増幅 (×30)	熱変性	20
	アニーリング	30
	伸長反応	30
最終伸長 (×1)	72	420

表 1-12. Lineage 解析で使した各遺伝子の増幅塩基長

遺伝子領域	増幅塩基長	遺伝子番号
<i>folD-sfmA*</i>	161bp	1
	170bp	2
<i>Z5935</i>	133bp	1
	142bp	2
	115bp	3
	151bp	4
	169bp	5
<i>yhcG</i>	394bp	1
	472bp	2
<i>rbsB</i>	218bp	1
	209bp	2
<i>rtcB</i>	270bp	1
	279bp	2
<i>arp-iclR*</i>	315bp	1
	333bp	2
	324bp	3
	342bp	4

* 増幅した遺伝子間領域

表 1-13. PFGE の泳動条件

Voltage	6 V
Included Angle	120°
Run time	19 時間
Initial switch time	2.2 秒
Final switch time	50.2 秒

1.3 成績

1.3.1 野生鹿および猪における STEC O157 の保菌状況

鹿 474 頭の 9 頭 (1.9%)、猪 426 頭の 3 頭 (0.7%) から、それぞれ STEC O157 が分離された (表 1-14)。STEC O157 が分離された検体の詳細な情報を表 1-15 に示す。21 県のうち 2 県 (H 県、M 県) の鹿、16 県中 1 県 (U 県) の猪のみから STEC O157 が分離された。

1.3.2 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の系統解析

Clade 解析の結果、鹿由来 9 株は全て Clade 7 に分類された。猪由来の 17B15-1 株と 18B50-1 株は Clade 7、17B60-3 株は Clade 9 にそれぞれ分類された (表 1-16)。一方、牛由来 17C15-2 株は Clade 7 に分類された。

Lineage 解析の結果、鹿由来 9 株のうち 15D8-1 株は Lineage I/II に、他の 8 株は Lineage II にそれぞれ分類された (表 1-17)。猪由来 3 株のうち 17B15-1 株は Lineage I/II に、他の 2 株は Lineage II に分類された。また、牛由来 17C15-2 株は、Lineage II に分類された。

Clade 解析および Lineage 解析の結果の組み合わせから、鹿由来 9 株のうち、15D8-1 株は Clade 7、他の 8 株は Putative Clade 12 にそれぞれ分類された (表 1-18)。猪由来 3 株は Clade 7、Putative Clade 10、Putative Clade 12 にそれぞれ分類された。牛由来 17C15-2 株は Putative Clade 12 に分類された。

1.3.3 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の WGS 解析

鹿由来 5 株 (12D102-4 株、15D8-1 株、15D138-1 株、15D133-2 株および 15D98-2 株)、猪由来 3 株 (17B15-1 株、17B60-3 および 18B50-1 株)、牛由来 1 株 (17C15-2 株) の計 9 株について、WGS 解析を行った結果、いずれも 5,290,931~5,498,471bp の塩基配列が決定された (表 1-19)。GC 含量は、50.5~50.6%であった。アノテーションにより、4,633~5,150 個のタンパクコード配列 (Coding Sequence: CDS)、22 個の rRNA、および 98~105 個の tRNA が検出された。一方、参考配列とした Sakai 株は、ゲノムサイズが 5,498,578bp、GC 含量が 50.5%、CDS が 5,047 個、rRNA は 22 個、tRNA は 103 個であった。

1.3.4 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の病原関連遺伝子の検出

検討した 9 株の病原関連遺伝子を検出した結果、志賀毒素遺伝子 (*stx1a*、*stx2c*)、接着因子 (*eae*、*iha*)、LEE 領域コードエフェクタータンパク質 (*espA*、*espB*、*espF*、*tir*)、非 LEE 領域コードエフェクタータンパク質 (*nleA*、*nleB*、*nleC*)、III 型分泌システム関連タンパク質 (*espJ*)、外膜タンパク (*chuA*、*ompT*、*traT*) および、その他の病原性関連因子 (*astA*、*gad*、*iss*、*tccp*、*terC*) の計 20 種、27 から 29 コピーの病原関連遺伝子が検出された (表 1-20)。このうち、5 株 (15D98-2 株、15D133-2 株、15D138-1 株、17B15-1 株、18B50-1 株) において 2 コピーの *astA* が検出されたのに対し、他の 4 株 (12D102-4 株、15D8-1 株、17B60-3 株、17C15-2 株) では 1 コピーが検出された。また、*iss* は 3 株 (12D102-4 株、17B60-3 株、17C15-2 株) では 3 コピー、4 株 (15D98-2 株、15D133-2 株、15D138-1 株、17B15-1 株) では 2 コピー、他の 2 株 (15D8-1 株、18B50-1 株) では

1 コピーが検出された。さらに、*traT* は 5 株 (15D8-1 株、15D133-2 株、17B15-1 株、17B60-3 株、17C15-2 株) では 2 コピーが検出されたのに対し、他の 4 株 (12D102-4 株、15D98-2 株、15D138-1 株、18B50-1 株) では 1 コピーが検出された。*stx* サブタイプについては、鹿由来 4 株 (15D8-1 株、15D98-2 株、15D133-2 株、15D138-1 株) が *stx1a* および *stx2c* を、1 株 (12D102-4 株) が *stx2c* のみをそれぞれ保有していた。また、猪由来 2 株 (17B15-1 株、18B50-1 株) が *stx1a* および *stx2c*、1 株 (17B60-3 株) が *stx2c* のみをそれぞれ保有していた。牛由来株 (17C15-2 株) は *stx2c* のみを保有していた。参考株の Sakai 株から、20 種類、29 コピーの病原性関連遺伝子が検出され、*astA*、*iss*、*traT* はそれぞれ 2 コピーずつ保有しており *stx1a* および *stx2a* を保有していた。

1.3.5 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の薬剤耐性遺伝子の検出

9 株の薬剤耐性遺伝子の保有状況を解析した結果、全ての株からマクロライドの系抗生物質に対する薬剤耐性遺伝子である、*mdfA* が検出された (表 1-21)。他の 6 種の薬剤耐性遺伝子は検出されなかった。

1.3.6 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の 23Sr DNA の点突然変異の検出

23S rDNA 領域の 4 部位における点突然変異の検出を行った結果、6 株 (12D102-4 株、15D8-1 株、15D98-2 株、15D133-2 株、15D138-1 株、17B15-1 株) において G2032A および G2057A の点突然変異が検出された (表 1-22)。

1.3.7 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の薬剤感受性評価

9 株の薬剤感受性試験を実施した結果、全ての株がマクロライド系の薬剤である EM に耐性を示したのに対し、他の 9 種類の供試薬剤に対しては、感性を示した。

1.3.8 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の PFGE 解析

PFGE 解析の泳動パターンが相同性値 90%以上を示した株を同一株とした場合、検討した鹿由来 9 株は 5 つの PFGE パターンに分類された(図 1-1)。

M 県で 2015 年の 6 月から 7 月に分離された鹿由来 6 株中 5 株(15D98-2 株、15D124-1 株、15D128-2 株、15D129-1 株、15D131-1 株)が同一の PFGE パターンを示し、他の 1 株(15D133-2 株)は異なる PFGE パターンを示した。

H 県で 2012 年 10 月と 2015 年の 8 月に分離された鹿由来 2 株(12D104-1 株、15D138-1 株)は、90%カットオフ値では同一株ではないものの、PFGE パターンの相同値に基づく系統樹解析において、類似したパターンを示した。また、H 県で 2015 年 8 月に分離された鹿由来 1 株(15D8-1 株)は、同じ H 県の鹿由来 2 株(12D104-1 株、15D138-1 株)とは異なる PFGE パターンを示し、独立したクラスターを形成した。

猪由来 3 株(17B15-1 株、17B60-3 株、18B15-1 株)は、いずれも鹿分離株とは異なるパターンを示し、3 つの異なる独立したクラスターに分類された。また、牛由来 17C15-2 株は、このうちの猪由来 1 株(18B50-1 株)と同じパターンを示し、同一のクラスターに分類された。

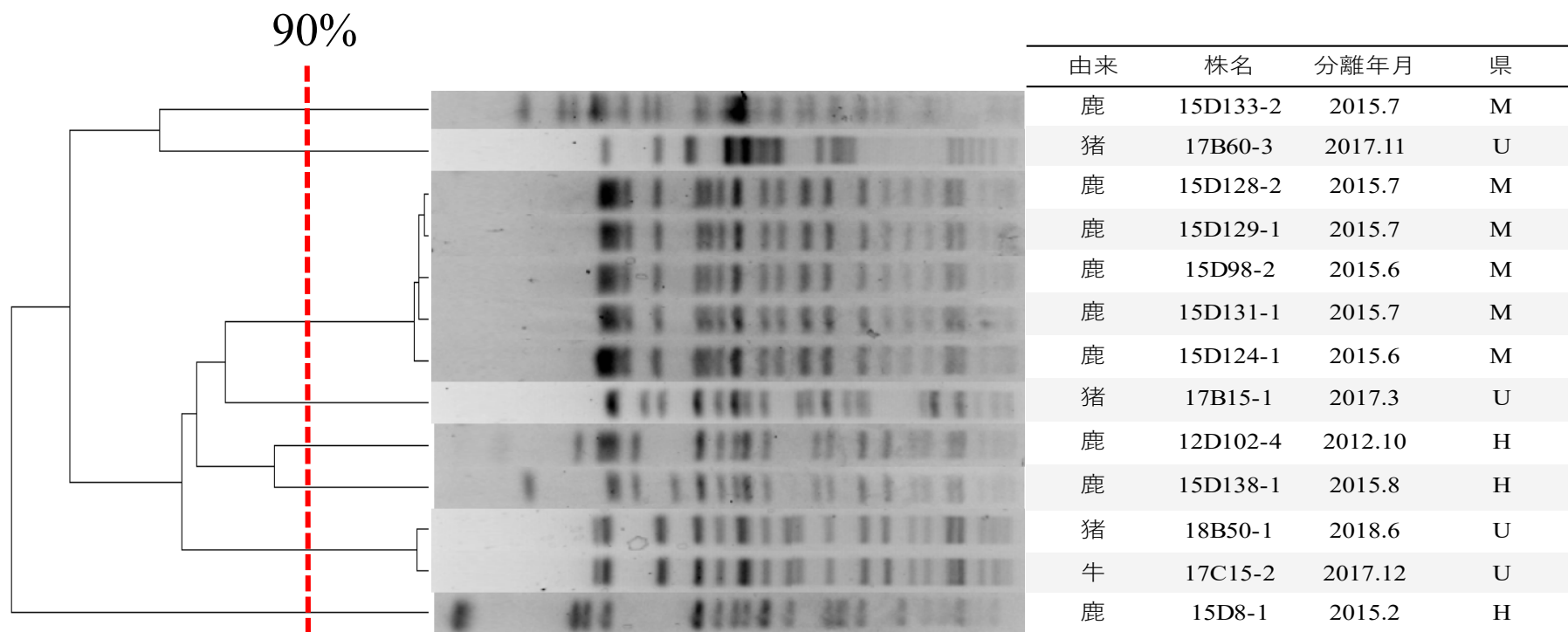


図 1-1. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の PFGE 解析

鹿由来 9 株 (12D102-4 株、15D8-1 株、15D98-2 株、15D124-1 株、15D128-2 株、15D129-1 株、15D131-1 株、15D133-2 株、15D138-1 株)、猪由来 3 株 (17B15-1 株、17B60-3 株、18B50-1 株)、牛由来 1 株 (17C15-2 株) の計 13 株のゲノム DNA を、制限酵素 *Xba*I を用いて処理した後、PFGE によりバンドパターンを解析した。点線は 90% の相同性値を示す。すなわち、点線の右で同じクラスターに分類された株は、同一ゲノムを有する株を判定した。なお、右横の表には、研究に使用した分離株の由来動物、株名、分離年月、および由来動物の捕獲された県を示す。

表 1-14. わが国の野生鹿および猪における STEC O157 の保菌状況

地域	県	鹿		猪	
		検体数	陽性検体数 (%)	検体数	陽性検体数 (%)
北海道	A	13	0		NT
北関東/ 甲信	B	1	0	4	0
	C	33	0		NT
	F	9	0		NT
南関東	D	22	0	22	0
	E	20	0	4	0
北陸	F		NT	9	0
	G		NT	3	0
東海	H	53	3(5.7)	8	0
	I	6	0	2	0
	J	4	0	2	0
	K	18	0		NT
近畿	L	30	0		NT
	M	39	6(15.4)		NT
	N	2	0		NT
中国	O	22	0	8	0
	P	9	0	2	0
	Q		NT	2	0
四国	R	87	0	92	0
	S		NT	6	0
九州	T	51	0		NT
	U	31	0	243	3(1.2)
	V	7	0	17	0
	W	9	0		NT
	X	8	0	2	0
計		474	9(1.9)	426	3(0.7)

NT : 未検討

表 1-15. 本研究で分離された鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の由来動物種、株名、分離年月および採材地(県)

由来 動物種	株名	分離年月	採材地(県)
鹿	12D102-4	2012.10.	H
	15D8-1	2015.2.	H
	15D98-2	2015.6.	M
	15D124-1	2015.6.	M
	15D128-2	2015.7.	M
	15D129-1	2015.7.	M
	15D131-1	2015.7.	M
	15D133-2	2015.7.	M
	15D138-1	2015.8	H
猪	17B15-1	2017.3.	U
	17B60-3	2017.11.	U
	18B50-1	2018.6.	U
牛	17C15-2	2017.12.	U

表 1-16. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の Clade 分類

由来 動物種	株名	各遺伝子座における塩基							Clade
		ECs2521	ECs3881	ECs4130	ECs3942	ECs0517	ECs2357	ECs0654	
鹿	12D102-4	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D8-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D98-2	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D124-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D128-2	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D129-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D131-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D133-2	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	15D138-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
猪	17B15-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
	17B60-3	G	C	C	A	G	C	C	Clade 9
	18B50-1	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7
牛	17C15-2	G	C	C	A	G	C	T	Clade 7

表 1-17. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の Lineage 分類

由来 動物種	株名	遺伝子および遺伝子間領域						Lineage
		<i>folD-sfmA</i>	<i>Z5935</i>	<i>yhcG</i>	<i>rbsB</i>	<i>rtcB</i>	<i>arp-iclR</i>	
鹿	12D102-4	2	2	2	1	2	2	Lineage II
	15D8-1	2	1	1	1	1	1	Lineage I/II
	15D98-2	2	2	1	1	2	2	Lineage II
	15D124-1	2	2	1	1	2	2	Lineage II
	15D128-2	2	2	1	1	2	2	Lineage II
	15D129-1	2	2	1	1	2	2	Lineage II
	15D131-1	2	2	1	1	2	2	Lineage II
	15D133-2	2	2	1	1	2	2	Lineage II
	15D138-1	2	2	2	1	2	2	Lineage II
猪	17B15-1	2	1	1	1	1	1	Lineage I/II
	17B60-3	2	2	2	1	1	1	Lineage II
	18B50-1	2	2	2	1	2	3	Lineage II
牛	17C15-2	2	2	2	1	2	1	Lineage II

表 1-18. Hirai らの方法に基づいた鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の Clade 分類

由来 動物種	株名	Clade (Yokoyama et al., 2012)	Lineage	Clade (Hirai et al., 2013)
鹿	12D102-4	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D8-1	Clade 7	Lineage I/II	Clade 7
	15D98-2	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D124-1	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D128-2	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D129-1	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D131-1	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D133-2	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
	15D138-1	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
猪	17B15-1	Clade 7	Lineage I/II	Clade 7
	17B60-3	Clade 9	Lineage II	Putative Clade 10
	18B50-1	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12
牛	17C15-2	Clade 7	Lineage II	Putative Clade 12

表 1-19. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の WGS 解析の結果

由来 動物種	株名	全塩基数	GC 含量(%)	CDS 数	rRNA 数	tRNA 数	DRA or Accession numbers
人 (参考)	Sakai	5,498,578	50.5	5,047	22	103	NC_002695.2
鹿	12D102-4	5,364,531	50.6	4,994	22	102	DRA012110
	15D8-1	5,367,102	50.5	4,904	22	104	DRA012107
	15D98-2	5,498,470	50.5	5,150	22	105	DRA012109
	15D133-2	5,498,471	50.5	5,146	22	105	DRA012074
	15D138-1	5,330,816	50.6	4,666	22	98	DRA012108
猪	17B15-1	5,290,931	50.6	4,677	22	102	DRA012073
	17B60-3	5,356,686	50.6	5,033	22	101	DRA012072
	18B50-1	5,360,487	50.6	4,679	22	101	DRA012071
牛	17C15-2	5,351,671	50.6	4,633	22	102	DRA012106

表 1-20. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株の病原関連遺伝子の保有コピー数

遺伝子	タンパクの機能	Sakai	12D102	15D8	15D98	15D133	15D138	17B15	17B60	18B50	17C15
			-4	-1	-2	-2	-1	-1	-3	-1	-2
<i>espA</i>	Type III secretion system	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>espB</i>	Secreted protein B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>espF</i>	Type III secretion system	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>espJ</i>	Prophage-encoded type III secretion system effector	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>nleA</i>	Non-LEE encoded effector A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>nleB</i>	Non-LEE encoded effector B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>nleC</i>	Non-LEE encoded effector C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>tccP</i>	Tir-cytoskeleton coupling protein	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>terC</i>	Tellurium ion resistance	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>tir</i>	Translocated intimin receptor protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>chuA</i>	Outer membrane hemin receptor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

<i>ompT</i>	Outer membrane protease	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>traT</i>	Outer membrane protein complement resistance	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2
<i>eae</i>	Intimin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>gad</i>	Glutamate decarboxylase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>iha</i>	Adherence protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>iss</i>	Increased serum survival	2	3	1	2	2	2	2	3	1	3
<i>astA</i>	EAST-1 heat-stable toxin	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1
<i>stx1a</i>	Shiga toxin 1a	1	-	1	1	1	1	1	-	1	-
<i>stx2a</i>	Shiga toxin 2a	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>stx2c</i>	Shiga toxin 2b	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	種類	20	19	20	20	20	20	20	19	20	19
	コピー数	29	27	27	28	29	28	29	28	27	28

表 1-21. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株から検出された薬剤耐性遺伝子

抗生物質	Sakai	12D102-4	15D8-1	15D138-1	17B15-1	17B60-3	18B50-1	17C15-2
サルファ・トリメトプリム	—	—	—	—	—	—	—	—
フルオロキノロン	—	—	—	—	—	—	—	—
β-ラクタム	—	—	—	—	—	—	—	—
アミノグリコシド	—	—	—	—	—	—	—	—
マクロライド	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>	<i>mdfA</i>
テトラサイクリン	—	—	—	—	—	—	—	—
クロラムフェニコール	—	—	—	—	—	—	—	—

表 1-22. 鹿、猪および牛由来 STEC O157 株から検出された 23S rDNA の点突然変異

由来 動物種	株名	23S rDNA 変異			
		G2032A/C	G2057A	A2058G/C	A2059G
鹿	12D102-4	A	A	A	A
	15D8-1	A	A	A	A
	15D98-2	A	A	A	A
	15D133-2	A	A	A	A
	15D138-1	A	A	A	A
猪	17B15-1	A	A	A	A
	17B60-3	G	G	A	A
	18B50-1	G	G	A	A
牛	17C15-2	G	G	A	A

1.4 考察

本研究では、わが国の野生鹿の 1.9% (9/474) と猪の 0.7% (3/426) が STEC O157 を保菌していることが判明した。これまでに、鹿の STEC O157 保菌率は、米国で 0.3~2.4% [25, 105]、スペインで 1.5% [104] と報告されている。また、猪の STEC O157 保菌率は、スペインで 0~3.4% [21, 85, 103]、スウェーデンで 1.5% [118] と報告されている。わが国においても、Sasaki ら [106] は、128 頭の鹿のうち 3 頭 (2.3%) から STEC O157 が分離されたのに対し 121 頭の猪からは STEC O157 は全く分離されなかったことを報告している。本研究においても、わが国の野生鹿および猪は、諸外国と同様に STEC O157 を低率ながら保菌していることが明らかとなった。

多くの STEC O157 は β -グルクロニダーゼ陰性を示すが、Nagano ら [83] は、北海道の鹿から、 β -グルクロニダーゼ陽性の非定型 STEC O157 が分離されたことを報告している。本研究で鹿および猪から分離された STEC O157 株は全て β -グルクロニダーゼ陰性であった。わが国の鹿および猪では β -グルクロニダーゼ陽性を示す非定型 STEC O157 の分布は限局的である可能性が考えられた。

WGS 解析により検出された病原性関連遺伝子のうち、*eae* にコードされるインチミンは、菌体表面に存在する外膜タンパクであり、III 型分泌システム (Type 3 secretion system: T3SS) によって宿主細胞に移行される Tir を受容体として、STEC O157 が宿主細胞に接着するために機能することが知られている [54, 84]。本研究で分離された全ての株は、STEC O157 の pathogenicity island である locus of enterocyte effacement (LEE) にコードされている T3SS 関連タンパク (*espA*, *espB* など)

やエフェクタータンパク (*espF*, *espJ*, *tir* など)を保有していた。また、LEE 領域外 (non-LEE) にコードされているエフェクタータンパクとして、*nleA*、*nleB*、および *nleC* が検出された[30, 38]。人由来 STEC O157 は、ほぼ全ての株が *eae*、*nleA*、*nleB*、および *nleC* を保有していることが報告されている[23, 35]。さらに、non-LEE エフェクタータンパクは腸粘膜の Attaching and effacing lesion (A/E 障害) 病変の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなっている [16]。以上の成績から、今回検討した鹿および猪分離株が、人由来株と同様の病原遺伝子を保有していたことから、いずれも人に病原性を示す可能性があると考えられた。

今回検討した各株間において、*astA*、*iss*、*traT* のコピー数に違いが認められた。*astA* は EAST-1 熱安定性毒素をコードする遺伝子であるが、その機能はまだ充分解明されていない。*astA* は腸管凝集性大腸菌 (Enteroaggregative *Escherichia coli*: EAEC) が保有する毒素をコードする遺伝子であることから、人の下痢の原因となる要因の一つである可能性が考えられる[45]。*iss* は、宿主補体に対する細菌の抵抗性に関与する血清耐性因子をコードしており、病原性大腸菌に感染した鶏で高い有病率で検出されている[55, 100]。*traT* はプラスミド R6-5 にコードされており、宿主補体への抵抗性に寄与する細菌外膜タンパクをコードしており、結果としてマクロファージの食作用に対する耐性にも関与すると考えられている[1]。今後、STEC O157 における *astA*、*iss*、*traT* の機能ならびにコピー数の違いが株の病原性にどのように影響しているかについて今後、解明する必要がある。

stx サブタイプについては、鹿由来株のうち、4 株 (15D8-1 株、15D98-2 株、15D133-2 株、15D138-1 株) が *stx1a* および *stx2c* を、1 株 (12D102-4 株) が *stx2c* のみを保有していた。また、猪

由来株では 2 株 (17B15-1 株、18B50-1 株) が *stx1a* および *stx2c*、他の 1 株 (17B60-3 株) が *stx2c* のみを保有していた。Friderich ら[28]は、人の HUS 患者から分離された株からは、*stx2a* または *stx2c* が多く検出され、両遺伝子保有株は人に対して臨床症状を引き起こす可能性が高いことを報告している。また、*stx2a* 保有株は *stx2c* 保有株と比べると HC との関連性が高いことから、*stx2a* 保有株は高い病原性を有すると考えられている[62]。今回分離された全ての株は、*stx2a* を保有していなかったことから、人に HUS や HC などのような重篤な症状を引き起こす可能性は低いものと考えられた。

近年、STEC O157 株の遺伝的特性の評価に WGS 解析が広く使用されている[29, 44, 73, 92, 95, 99]。さまざまな動物種や環境から分離された STEC O157 株の WGS データは、これらの株の生態を解明するために必要であるが、野生動物から分離された STEC O157 株に関するデータは少ない[3, 11]。本研究で得られた、わが国の野生鹿および猪由来 STEC O157 株の WGS 解析データは、自然界に分布する STEC O157 の生態学の理解と疫学の解明に貢献することが期待される。

系統解析では、Clade 1~Descendant clade 4/5 に属する株は、HC などの重篤な症状のある患者から、Clade 6~Putative clade 13 の株は、水様性下痢などの比較的軽度の症状のある患者から、それぞれ分離される傾向があることが報告されている[128]。本研究では、鹿由来 7 株、猪由来 1 株および牛由来 1 株が Putative Clade 12 に分類された。鹿および猪由来の各 1 株は Clade 7 に、他の猪由来 1 株は Putative Clade 10 に分類された。以上の成績から、今回、野生鹿および猪から分離された STEC O157 株は、人に対して HUS や HC など、重篤な症状を示す可能性は低い

ものと思われた。

薬剤耐性遺伝子の保有状況を解析した結果、今回検討した全ての株が主要なマクロライド系薬剤の耐性遺伝子である *mdfA* を保有していることが明らかとなった。ディスク法による薬剤感受性試験においても、全ての株がマクロライド系薬剤(EM)に耐性を示し、耐性遺伝子の保有状況と一致した。Sasaki ら[106]も同様に、わが国の野生鹿由来 STEC O157 株は、ABPC、GM、OTC、CP、および NA に感受性がある一方で、EM に耐性を示したことを報告している。EM 耐性 STEC O157 株は、患者分離株や各種家畜分離株でも報告されている[5, 19]。STEC O157 株の EM 耐性は、*mdfA* の保有に加え、23S rDNA の点突然変異によっても獲得することが報告されている[122, 125]。実際に、今回検討した9株の分離株のうち、12D102-4株、15D8-1株、15D98-2株、15D133-2株、15D138-1株、17B15-1株の6株において、G2032AとG2057AといったEM耐性に関わる2種類の23S rDNA の点突然変異が検出された。Asai ら[2]は、山岳地帯(mountain area)、都市部(urban area)ならびに農場付近(farm environments)でそれぞれ捕獲された鹿、猪、ネズミ等の小型哺乳類などの野生動物における大腸菌の薬剤耐性菌の保菌状況を検討したところ、都市部(Urban area)餌付けやゴミ捨てを禁止している地域で捕獲された鹿は、それ以外の地域で捕獲された鹿よりも薬剤耐性株の保菌率が低く、さらに、農場付近で捕獲された小型哺乳類から分離された株は、高率(28.3%)に多剤耐性を示したのに対し、都市部で捕獲された小型哺乳類の株では、多剤耐性菌の割合がわずか3.9%であったことを報告している。以上の成績から、農場付近に生息する野生哺乳類は、家畜に由来する薬剤耐性菌に暴露されやすい一方で、都市部に生息する小型哺乳類でも特に人との接触を制限するように管理された状態では、抗菌薬の暴露を受ける機会

が少ないと考えられるため、薬剤耐性菌を獲得しにくいと考えられている。従って、自然環境で生息する鹿や猪などの野生動物は、家畜に比べて、抗生物質による暴露の程度は低く、薬剤耐性菌を保菌する可能性は低いと考えられる。しかしながら、近年では、山岳地帯で捕獲される鹿においても、薬剤耐性株を保菌する個体数が増加していることから、野生動物が人や家畜と接触する機会が増え、両者の間で薬剤耐性菌が伝播している可能性がある[2]。実際、本研究では、U 県の STEC O157 を保菌していた猪の一部は、農場の近くで捕獲されたものであった。今後、わが国の野生鹿や猪が、どのような経路で耐性菌を保有するに至ったか、またどのような機序で EM 耐性を獲得したかを明らかにするとともに、野生動物と、家畜や人とが接触する機会を減らすことによって、薬剤耐性菌が、家畜や人、野生動物の間で伝播することを防ぐ必要があると思われた。

PFGE 解析では M 県で 2015 年の 6 月から 7 月に捕獲された 6 頭の鹿から分離された STEC O157 の 6 株中 5 株(15D98-2 株、15D124-1 株、15D128-2 株、15D129-1 株、15D131-1 株)が同一の PFGE パターンを示し、他の 1 株(15D133-2 株)は異なる PFGE パターンを示したことから、M 県では様々な遺伝子性状の株が分布していることが明らかとなった。また、同じ遺伝子性状を示す株も分布していることから、同じ鹿の群の個体間で STEC O157 が相互に伝播している可能性が示唆された。また、H 県で 2012 年 10 月と 2015 年 8 月と異なる時期に分離された鹿由来 2 株(12D102-4 株、15D138-1 株)の PFGE パターンが類似していたことから、H 県の鹿では長期間にわたり遺伝子性状の近縁な株が、鹿間で維持されていることが明らかとなった。U 県の猪由来 3 株(17B60-3 株、17B15-1 株、18B50-1 株)は、互いに異なる PFGE パターンを示したことから、U 県の猪には多様な遺伝子性状の株が分布していることが明らかとなった。今回の成績から、野生の鹿や

猪には、多様な遺伝子性状の STEC O157 株が分布している一方で、特定の地域では、遺伝子性状の同一な株や近縁な株が分布していることが明らかとなった。

U 県の猪由来 1 株(18B50-1 株)の PFGE パターンは、牛分離株(17C15-2 株)のパターンと一致した。この STEC O157 を保菌していた猪の捕獲地と牛が飼育されていた農場は、直線距離にして約 2km であった。Mora ら[80]も同様に、スペインの野生鹿、猪および飼育牛由来 STEC 株の PFGE 解析を行った結果、野生鹿、猪および飼育牛の PFGE パターンが類似していたことから、野生動物と牛との間で STEC が伝播した可能性を報告している。猪の行動圏は 60.3～112.5 ha であることから[53]、U 県で捕獲された当該猪は牛の農場内に侵入し、猪と牛の間で STEC O157 が伝播した可能性が示唆された。今後、STEC O157 の主要な保菌動物である牛と、野生鹿、猪が侵入あるいは接触しないよう農場に電気柵を設置する等の措置が本菌の拡大防止上重要であると思われた。

1.5 小括

鹿肉を原因とする STEC O157 の食中毒事例が国内外で報告されていることから、野生鳥獣の肉を消費する上で本菌の汚染は重要なリスク因子の一つである。本章では、わが国に生息する鹿、猪における STEC O157 の保菌状況を検討し、分離株については、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 頭の直腸便を用いて STEC O157 の分離を行った。分離株は ARMS-PCR ならびに、LSPA-6 による系統解析を行った。9 株の分離株について、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 Finder 2.0、ResFinder 4.1 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、STEC 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 STEC O157 株を加えて PFGE 解析により、分離株の由来を検討した。

鹿の 1.9% (9/474)、猪の 0.7% (3/426) から STEC O157 が分離され、わが国の鹿および猪は低率ながら STEC O157 を保菌していることが明らかとなった。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 Putative Clade12 に、猪由来 1 株は Putative Clade10 にそれぞれ分類された。Clade 1～Descendant clade 4/5 に属する株は、HC などの重篤な症状のある患者から分離される傾向があり、Clade 6～Putative clade 13 の株は、水様性下痢などの比較的軽度の症状のある患者から分離される傾向がある。従って、鹿および猪由来株は、いずれも水様性下痢を呈する人分離株が含まれる Clade に分類されたことから、重篤度は低い

と考えられた。

WGS 解析では、5,290,931～5,498,471bp の塩基配列が決定された。また、全ての分離株から、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。従って、わが国の鹿および猪の保菌する STEC O157 は人に対して病原性を示すとともに、マクロライド系薬剤耐性を示すものと考えられた。

PFGE 解析では、鹿分離株は 5 パターンに分かれた。M 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。H 県で異なる時期に分離した鹿由来 2 株は、類似したパターンを示した。猪分離株は全て異なるパターンに分類され、そのうち 1 株は、牛分離株と同一パターンであったことから、様々なゲノム性状の STEC O157 株が鹿および猪に分布していること、M 県では同一株が分布していること、H 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 STEC O157 が伝播した可能性が示唆された。

1.6 第1章で使用した試薬類の組成

*1. ノボビオシン加 mEC 培地の組成

ノボビオシン加 mEC 培地 (栄研化学株式会社)	36.6 g
再精製水	1,000 ml

ノボビオシン加 mEC 培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に 121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

*2. クロモアガーO157 培地の組成

CHROM agar O157 Base (CHROMagar 社)	29.2 g
再精製水	1,000 ml

CHROM agar O157 Base と再精製水を混和し、加温溶解した後に、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*3. CT-SMAC 培地の組成

ソルビットマッコンキー (SMC) 寒天培地 (栄研化学株式会社)	25 g
再精製水	500 ml
CT-Supplement (Merck 社、Darmstadt、Germany)	1 vial
滅菌再精製水	1 ml

ソルビットマッコンキー (SMC) 寒天培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に 121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、滅菌再精製水で溶解した CT-supplement を加え、十分混和し、これをシャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*4. 普通寒天培地の組成

普通寒天培地（栄研化学株式会社）	35 g
------------------	------

再精製水	1,000 ml
------	----------

普通寒天培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に 121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*5. LB ブロスの組成

LB Broth Base（Thermo Fisher Scientific 社、Waltham、USA）	10 g
---	------

再精製水	500 ml
------	--------

LB Broth Base と再精製水を混和し、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

*6. TE Buffer の組成

1M Tris-HCl (pH 8.0) ¹⁾	10 ml
------------------------------------	-------

0.5M EDTA (pH 8.0) ²⁾	2 ml
----------------------------------	------

再精製水	988 ml
------	--------

1M Tris-HCl、0.5M EDTA および再精製水を混和し、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

1) 1M Tris-HCl (pH 8.0) の組成

Tris (ヒドロキシメチル) アミノメタン (和光純薬工業株式会社) 121.1 g

再精製水 1,000 ml

Tris (ヒドロキシメチル) アミノメタンと再精製水を混和、溶解した後に、1N の塩酸で pH 8.0 に調整し、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

2) 0.5M EDTA (pH 8.0) の組成の組成

EDTA・2Na (株式会社同仁科学研究所、熊本) 186.1 g

水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社) 20 g

再精製水 1,000 ml

EDTA・2Na、水酸化ナトリウムおよび再精製水を混和、溶解した後に、1N の塩酸で pH 8.0 に調整し、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

*7. Cell Suspension Buffer (CSB) の組成

1M Tris-HCl (pH 8.0) 10 ml

0.5M EDTA (pH 8.0) 20 ml

再精製水 70 ml

1M Tris-HCl、0.5M EDTA および再精製水を混和し、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

*8. Proteinase K の組成

ProteinaseK from <i>Tritirachium album</i> (Sigma-Aldrich 社、Darmstadt、Germany)	20 mg
--	-------

滅菌再精製水	1 ml
--------	------

ProteinaseK from *Tritirachium album* と滅菌再精製水を混和、溶解させた。

*9. プラグ用 1% SeaKim Gold (SKG) アガロースの組成

SeaKim Gold Agarose (Lonza 社)	0.25 g
-------------------------------	--------

TE Buffer	25.ml
-----------	-------

SeaKim Gold Agarose と TE Buffer を混和し、電子レンジを使用して加熱溶解した後、55°Cまで冷ました。

*10. Cell Lysis/ProteinaseK Buffer の組成

Cell Lysis Buffer ³⁾	5 ml
---------------------------------	------

ProteinaseK	25 μ l
-------------	------------

Cell Lysis Buffer と ProteinaseK をよく混和した。

3) Cell Lysis Buffer の組成

1M Tris-HCl (pH 8.0)	25 ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	50 ml
N-Lauroylsarcosine sodium salt (Sigma-Aldrich 社)	5 g
再精製水	420 ml

1M Tris-HCl、0.5M EDTA、N-Lauroylsarcosine sodium salt および再精製水を混和、溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。

*11. 1x restriction buffer の組成

SuRE/Cut Buffer H (Roche 社、Basel、Swiss)	20 μ l
Nuclease Free Water (Invitrogen 社)	180 μ l

SuRE/Cut Buffer H と Nuclease Free Water をよく混和した。

*12. 制限酵素ミックスの組成

Restriction endonuclease <i>Xba</i> I (Roche 社)	5 μ l
SuRE/Cut Buffer H (Roche 社)	20 μ l
Bovine Serum Albumin (10mg/ml) (Biolabs 社)	2 μ l
Nuclease Free Water (Invitrogen 社)	173 μ l

Restriction endonuclease *Xba*I、SuRE/Cut Buffer H、Bovine Serum Albumin および Nuclease Free Water をよく混和した。

*13. 0.5x TBE Buffer の組成

TBE Buffer, 10x, Molecular Biology Grade (Promega 社)	100 ml
--	--------

再精製水	1,900 ml
------	----------

TBE Buffer, 10x, Molecular Biology Grade と再精製水をよく混和した。

*14. 1% SKG アガロースの組成

SeaKem Gold Agarose (Lonza 社)	1 g
-------------------------------	-----

0.5x TBE Buffer	100 ml
-----------------	--------

SeaKem Gold Agarose と 0.5x TBE Buffer を混和し、電子レンジを使用して加熱溶解した後、55°C まで冷ました。

第 2 章

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

2.1 はじめに

Campylobacter は、グラム陰性のらせん状桿菌で、運動性を有し、家畜から野生動物、人に至るまで多様な動物に分布している[57]。わが国では、1982年に食中毒菌として指定された *Campylobacter jejuni* および *C. coli* は人の下痢症の原因菌として広く知られており、世界でも主要な食中毒原因細菌として位置づけられている[57]。

鹿の *Campylobacter* 保菌率は、スペイン[21]とカナダ[114]では0%、ノルウェーでは0.3% [71]で、いずれも *C. jejuni* が低率に分布していることが報告されている。猪の *Campylobacter* 保菌率は、スペインでは1.6%から *C. jejuni* が、6.3%から *C. coli* がそれぞれ分離されている[14]。諸外国と同様に、わが国の鹿および猪の0~0.8%から、*C. jejuni* および *C. coli* が分離されている[106, 113]。このように低率ではあるが国内外の鹿や猪から *C. jejuni* や *C. coli* が分離されている。一方で、オーストラリアでは慢性下痢症を呈する鹿の96% [47]、ニュージーランドでは17.5%の鹿 [123]、フィンランドとノルウェーでは0.04~6.0%の鹿[43, 63]から、*C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* (*C. hyointestinalis*) が分離されている。わが国でも、5.6%の鹿と10.1~17.4%の猪から *C. hyointestinalis* が分離されている[106, 113]。

野生鹿や猪における *Campylobacter* 属菌の保菌状況を検討した従来の研究では、高温カンピロバクターである *C. jejuni* および *C. coli* を対象としていたため、その至適培養温度である42°Cでの増菌と分離培養を行っている[106, 113]。しかしながら、*C. hyointestinalis* の至適培養温度は37°Cである[75]ことから、従来の研究では、試料中の *C. hyointestinalis* が増殖に最適な温度

環境下におかれておらず、鹿や猪におけるその保菌率は過小に評価されていた可能性がある。

C. hyointestinalis は、1983 年に、増殖性腸炎の豚から初めて分離同定された菌種である[31]。豚における *C. hyointestinalis* の保菌率は 0.6%~66.6%と、広範にわたることが報告されている[31, 36, 41, 89, 93, 107]。近年、豚のみならず、様々な家畜にも本菌が広く分布していることが報告されている。本菌の牛における保菌率は 0.05%~85.7%[10, 13, 22, 32, 37, 42, 51, 101]、羊では 0%~3.2%[89, 110, 112]、山羊では 4.0%[97]とそれぞれ報告されている。他の動物でも、犬の 1.8%~7.9%[33, 82]、ネズミの 1.2%[76]が *C. hyointestinalis* を保菌していたとそれぞれ報告されている。以上のように、様々な哺乳類に *C. hyointestinalis* が広く分布していることが明らかになっている。また、下痢を呈した多くの患者からも本菌が検出されている[12, 27, 79, 102, 117]。2002 年には、オーストリアで 1 カ月以上慢性的な下痢症状を示していた 88 歳の女性から *C. hyointestinalis* が分離された[36]。この患者が経営していた農場の豚からも分離された株の pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析を行ったところ、同じ遺伝子型であったことから、豚と人の間で *C. hyointestinalis* が伝播した可能性が指摘されている。これらの事例から、*C. hyointestinalis* は新興人獣共通感染症の起病因菌の一つとして考えられている[123]。

Campylobacter の主要な病原因子として、細胞膨化致死毒素 (Cytotoxic Distending Toxin: CDT) が報告されている[18]。CDT は CdtA、CdtB 及び CdtC の 3 つのサブユニットからなるホロ毒素であり、それぞれ *cdtA*、*cdtB* および *cdtC* と 3 つの連続した遺伝子にコードされる。*C. jejuni*、*C. coli*、および *C. fetus* などの *Campylobacter* 属菌は CDT を産生することが明らかとなっている[4, 56, 126]。*C. hyointestinalis* のゲノムには本菌種に特有の Cdt をコードする 2 種類の *chcdt*

(*chcdt-I*, *chcdt-II*) が存在し、下痢症患者由来株や一部の豚分離株は *chcdt-I(A/B/C)*、*chcdt-II(A/B/C)* の両方を保有している。一部の豚分離株は *chcdt-II(A/B/C)* のみを保有していたことから、*C. hyointestinalis* の保有する *chcdt* は、宿主の動物種によって異なることが報告されている[60]。

次世代シーケンサーを用いた全ゲノム(Whole-Genome Sequencing: WGS)解析は近年、*Campylobacter* 属菌の包括的な遺伝子解析にも使用されている[17, 91]。*C. jejuni* および *C. coli* の完全長ゲノム配列が決定されて以後、本菌種の運動性、化学走性、細胞接着性、細胞侵入性、細胞毒素、莢膜形成、糖鎖付加、鉄利用、薬剤耐性、ストレス応答に関連するおよそ 80 種類の病原関連遺伝子が報告されている[8, 17, 91]。しかしながら、*C. hyointestinalis* については、人分離株の完全長ゲノム配列が 2016 年に決定されているものの[78]、病原関連遺伝子の保有状況については、ほとんど明らかにされていない。

C. jejuni および *C. coli* では、人の腸管上皮細胞などの様々な細胞を用いた接着・侵入実験が行われており、その *in vitro* での病原性が検討されている[124, 132]。しかしながら、*C. hyointestinalis* では人由来細胞を用いた *in vitro* の感染実験は行われておらず、その病原性についてはほとんど解明されていない。

本研究では、各種 *Campylobacter* 属菌に対する至適培養条件を用い、わが国の鹿および猪における *Campylobacter* 属菌の保菌状況を検討するとともに、鹿および猪から分離された *Campylobacter* 株の *cdt* の保有状況を検討した。一部の分離株については WGS 解析を行い、病原関連遺伝子の保有状況を網羅的に検討した。また、得られた分離株を用いて、人腸管上皮細胞(Caco-2)に対する接着、侵入試験を行い、人への病原性を評価した。

2.2 材料および方法

2.2.1 材料

2017年9月から2020年8月にかけて、14県(8地域)で捕獲した鹿253頭および、16県(8地域)で捕獲した猪321頭から直腸便をそれぞれ採取した。直腸便は無菌的に採取した後、4°C以下で直ちに、日本大学生物資源科学部獣医食品衛生学研究室に輸送した。全ての検体は、採取後72時間以内に実験に使用した。

2.2.2 *Campylobacter* の分離培養

直腸便の1g量を、9mLのプレストン増菌培地^{*1}に接種して、*C. jejuni* および *C. coli* と *C. hyointestinalis* のそれぞれの至適発育温度である42°Cおよび37°Cで、それぞれ48時間、微好気条件で増菌培養を行った。培養した、増菌培地の1白金耳量を Modified Charcoal cefoperazone deoxicholate Agar (mCCDA)^{*2} (Merck 社、Darmstadt、Germany)、スキロー血液寒天培地^{*3} (栄研化学株式会社、東京)に塗抹し、42°Cと37°Cを併用して、それぞれ48時間、微好気条件で分離培養を行った。各分離培地上に発育した *Campylobacter* を疑う透明で微小なコロニーを1検体あたり最大5コロニー釣菌し、5%馬血液加ミューラーヒントン寒天培地^{*4} (栄研化学株式会社)で37°Cと42°Cで、それぞれ48時間、微好気条件で純培養した。

2.2.3 分離株からの DNA 抽出

純培養した各分離株の約 1/4 白金耳量を採取し、1ml の滅菌 PBS を加えた 1.5ml 尖底プラスチックチューブ内で混和した。ボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、14,400×g (12,600 rpm) で 5 分間遠心洗浄した。上清を除去した後、InstaGene Matrix (Bio-Rad 社、Hercules、USA) を 30µl 加え、再び混和した後、56°C で 30 分間加熱処理した。ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、100°C で 8 分間煮沸した。再度ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、14,400×g (12,600rpm) で 5 分間遠心分離し、その上清を DNA 抽出原液とした。DNA 抽出原液は波長 260nm における吸光度 (OD) から DNA 濃度、ならびに OD 260nm/280nm 比から DNA 純度を算出し、OD 260nm/280nm 比が 1.8~2.0 の検体について、Nuclease-Free Water (Invitrogen 社、Waltham、USA) で DNA 濃度を 20ng/µl に調整した。

2.2.4 PCR およびシーケンス解析による *Campylobacter* の同定法

各コロニーから抽出した DNA について、*C. jejuni* および *C. coli* を検出する Multiplex PCR[120]ならびに *C. hyointestinalis* 特異的 PCR[52]によりそれぞれ *C. jejuni*、*C. coli*、および *C. hyointestinalis* を同定した。各 PCR に使用した試薬の組成を表 1-2 に示す。*Campylobacter* 属特異的 PCR および *C. jejuni*、*C. coli* 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列を表 2-1 に、*C. hyointestinalis* 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列は表 2-2 に、反応条件はそれぞれ表 2-3 および表 2-4 に示した。なお、陽性対照として *C. jejuni* ATCC33650^T 株、*C. hyointestinalis* NCTC11650^T 株から抽出した DNA 溶液、陰性対照として Nuclease-Free Water (Invitrogen 社) をそ

れぞれ用いた。

PCR 産物の確認のため、アガロースゲル電気泳動を行った。Mupid 電気泳動槽(株式会社 Mupid 社、東京)に TAE buffer を約 350ml 入れた後、2%アガロースゲル(Agarose S、ニッポン・ジーン社、東京)を泳動槽に設置した。各 PCR 産物の 5 μ l ならびに DNA サイズマーカーとして 100bp DNA ladder の 5 μ l をゲルのウェル内に添加し、電圧 100V 下で約 30 分間電気泳動した後、ゲルを 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で 10 分間染色した。染色したゲルは再精製水に 15 分間浸漬して脱色した後、紫外線ゲル撮影装置(アトー株式会社、東京)を用いてゲルの写真を撮影した。それぞれ 650bp、323bp、126bp、611bp 付近に増幅バンドが認められた株を *Campylobacter* 属菌、*C. jejuni*、*C. coli*、*C. hyointestinalis* と判定した。

PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社、Madison、USA)を用いて精製した。すなわち、PCR 産物 15 μ l に Membrane Binding Solution を 15 μ l 添加して充分混和した後、Wizard SV Mini columns (Promega 社)に滴下し、1 分間室温で静置した。その後、カラムを 15,800 \times g (13,200rpm)、1 分間遠心分離して濾液を除去した後、Membrane Wash Solution の 700 μ l を滴下し、再度 15,800 \times g (13,200rpm) で 1 分間遠心分離した。濾液を除去した後、Membrane Wash Solution の 500 μ l を再度滴下し、15,800 \times g (13,200rpm) で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、Wizard SV Mini columns を 1.5ml 尖底プラスチックチューブに装着し、カラム濾紙の中央に Nuclease-Free Water (Invitrogen 社)を 30 μ l 滴下して室温で 1 分間静置した。さらに、15,800 \times g (13,200rpm) で 2 分間遠心分離し、溶出液を精製 DNA 溶液とした。

滅菌した 0.2ml PCR 用マイクロチューブに 20ng/ μ l の濃度に調整した精製 DNA 溶液を

1 μ l、1.6 μ M の DNA シーケンス用プライマー(表 2-1、表 2-2)を 1 μ l、Nuclease-Free Water (Invitrogen 社)を 5.5 μ l、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、Waltham、USA)を 1 μ l、Sequence buffer (Applied Biosystems 社)を 1.5 μ l 加え、充分混和した。サイクルシーケンス反応は、96 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 15 秒間のアニーリング、および 60 $^{\circ}$ C で 4 分間の伸長反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。反応終了後、エタノール沈殿溶液 40 μ l を反応液に添加し、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、室温で 15 分間静置した。15,800 \times g (13,200rpm) で 20 分間遠心分離した後、上清を除去し、70%エタノールを 250 μ l 加え、さらに 15,800 \times g (13,200rpm) で 5 分間遠心分離した。再び、上清を除去して、50 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した後、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 社)を 15 μ l 加え、100 $^{\circ}$ C のヒートブロック上で 2 分間処理した後、チューブを 5 分間氷冷し、全量を DNA シーケンス用 96 穴プレートに移した。各 PCR 産物の塩基配列は Applied Biosystems model 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem 社)を用いて決定した。得られたシーケンス断片は、ATGC ソフトウェア(株式会社ゼネティックス、東京)を用いて結合した。各遺伝子領域の塩基配列を用いて BLAST 検索を行い、菌種を同定した。

2.2.5 *C. hyointestinalis* 株の *chcdt* の保有状況の検討

C. hyointestinalis 分離株については 2.2.3 に示した方法により DNA を抽出した後、Kamei ら[60]の方法に従って *chcdt*-I/II (A/B/C) の保有状況を検討した。各 PCR に使用した試薬の組成は表 1-2 と同じものとした。また、プライマーの配列を表 2-5 に、反応条件を表 2-6、表 2-7 にそれぞれ示す。

2.2.6 *C. hyointestinalis* 株の WGS 解析

i) DNA 抽出

純培養した各 *C. hyointestinalis* の株を、滅菌 PBS 1,000 μ l を加えた 1.5ml 尖底プラスチックチューブの中で混和し、OD600=1 の濁度に調整した。ボルテックスミキサーで十分に攪拌した後、14,400 \times g (12,600rpm) で 5 分間遠心洗浄し、上清を除去した後、DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen 社) の Buffer ATL を 180 μ l 添加した。充分混和した後に、Proteinase K (Sigma-Aldrich 社、Darmstadt, Germany) 20 μ l を添加し、56 $^{\circ}$ C、30 分間加熱処理した。ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌した後、200 μ l の Buffer AL をサンプルに添加して 10 秒間攪拌した後、200 μ l の 99.5% エタノールを添加して 10 秒間攪拌した。混合液を、新しい 2 ml コレクションチューブ中の DNeasy Mini Spin Column に移し、6,000 \times g (8,100rpm) で 1 分間遠心操作した後にろ液およびコレクションチューブを除去した。DNeasy Mini Spin Column を新たな 2 ml コレクションチューブに移し、500 μ l の Buffer AW1 を添加して 6,000 \times g (8,100rpm) で 1 分間遠心分離した。DNeasy Mini Spin Column を新たな 2 ml コレクションチューブに移し、500 μ l の Buffer AW2 を添加した後に 6,000 \times g (8,100rpm) で 3 分間遠心して DNeasy メンブレンを乾燥させた。DNeasy Mini Spin Column を新たな 1.5 ml 尖底チューブに移し、200 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加して室温で 1 分間インキュベートした後、6,000 \times g (8,100rpm) で 1 分間遠心分離し、溶出した。

DNA 抽出原液は Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 社、Waltham、USA) を用いて波長

260 nm における吸光度 (OD) から DNA 濃度、ならびに OD 260nm/280nm 比から DNA 純度を算出した。さらに、Qubit4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific 社、Waltham、USA) を用いて Double-stranded DNA (dsDNA) 濃度を測定した。得られた DNA は 1.2.8 に示した方法により断片化、精製およびライブラリー調整を行った。

ii) 次世代シーケンサーを用いた WGS 解析

調整したライブラリー dsDNA について、MiSeq Reagent Nano Kit v2 500-cycles (illumina 社、San Diego、USA) を用いて、次世代シーケンサー MiSeq (illumina 社) で全ゲノムの解析を行った。解析した全ゲノムデータは CLC Genomics Workbench Ver. 8.5.1 (Qiagen 社、Venlo、Nederland) を用いて、*de novo assembly* により塩基配列の決定を行った。トリミングする際のパラメーターは ambiguous limit, 2; quality limit, 0.05; number of 5 = terminal nucleotides, 20; number of 3 = terminal nucleotides, 5 に設定した。*de novo assembly* を行う際のパラメーターは mapping mode, create simple contig sequences (fast); bubble size, 50; word size, 21; minimum contig length, 1,000 bp; perform scaffolding, no; autodetect paired distances, yes に設定した。得られたドラフトゲノム配列を Fasta 形式で保存した。

iii) アノテーション

ドラフトゲノム配列については、DDBJ Fast Annotation Submission Tools (DFAST) website (<https://dfast.nig.ac.jp/>) 上でアノテーションを行い、CDS や tRNA を同定した。rRNA については

RNAmmer-1.2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?RNAmmer-1.29>) で同定した[69]。

2.2.7 *C. hyointestinalis* 株の病原関連遺伝子の検出

アノテーションした CDS について、Bolton ら[8]が報告しているおよそ 80 種の病原関連遺伝子の有無を網羅的に探索した。さらに、*C. jejuni* 81-176 株 (accession No. NC_008787.1)、*C. coli* 15-537360 株 (accession No. NC_022660.2) および *C. hyointestinalis* LMG9260 株 (accession No. NZ_CP015575.1) を参照株として加えて比較検討した。

2.2.8 PCR による *cadF*、*flaA*、*flaB* の検出

分離株の *cadF*、*flaA* および *flaB* の検出は、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR により行った。*cadF* 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列は表 2-8 に、反応条件は表 2-9 に、また *flaA* および *flaB* 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列は表 2-10 に、反応条件は、表 2-11 にそれぞれ示した[70]。

2.2.9 *C. hyointestinalis* 株の運動性試験の検討

滅菌 PBS 20 μ l をスライドガラスに滴下した後、純培養した各被検菌株の 1/2 コロニーをエーゼで採取し、滴下した PBS に懸濁した。空気が入らないようにカバーガラスを静かに載せ、暗視野顕微鏡下で運動性の有無を観察した。

2.2.10 *C. hyointestinalis* 株の Caco-2 細胞への感染実験

i) 細胞の調整

Caco-2 細胞は、5%牛胎子血清 (FBS) (Sigma-Aldrich 社、Waltham、USA)、1%非必須アミノ酸 (NEAA) (Gibco 社)、100 μ /ml ペニシリン・ストレプトマイシン (Pen Strep) (Gibco 社) 加 E-MEM (5%FBS 加 E-MEM(+)) で 2.0×10^5 個/ml に調整し、24 well プレート (TPP 社、Trasadingen、Switzerland) の各 well に 1ml 接種した後、37 $^{\circ}$ C、5 日間、5% O₂ 条件下で培養した。試験を行う前日にペニシリン・ストレプトマイシンを除いた培養液 (5% FBS 加 E-MEM(-)) に交換した。

ii) 接着・侵入試験

鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株 (18D42-2 株、19D10-1 株、18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株)、*C. jejuni* ATCC33650^T 株、*C. hyointestinalis* NCTC11650^T 株は、ミューラーヒントン寒天培地で 37 $^{\circ}$ C、48 時間、微好気条件で培養した。被検株は 3ml 量の 5%FBS 加 E-MEM (-) に懸濁し、100 \times g (1,100rpm) で 5 分間、遠心分離して上清を取り除き洗浄した。被検株の懸濁液の吸光度 600nm (OD600) を計測し、5%FBS 加 E-MEM(-) で MOI=10 の濃度となるように調整した。Caco-2 細胞を培養した 24well プレートの各 well に、調整した菌液を 1ml ずつ接種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下で接着試験は 3 時間、侵入試験は 6 時間培養を行った。接着試験では、培養上清を回収し、各 well を PBS で 3 回洗浄後、200 μ l の 1% Triton-X (Gibco 社) を各 well に加

え、15 分間処理した。1%Triton-X 処理後、細胞を剥離し、1.5ml 尖底プラスチックチューブに回収し滅菌 PBS を用いて 10 倍階段希釈を作製した。各希釈液 100 μ l 量をミューラーヒントン寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ C、48 時間培養後、コロニー数をカウントすることで、Caco-2 細胞に接着した菌数を算出した。侵入試験では、ゲンタマイシン処理によって、細胞表面に接着した *C. hyointestinalis* を殺菌することで、Caco-2 細胞内に侵入した菌数を算出した。すなわち、細胞表面を滅菌 PBS で 3 回洗浄後、ゲンタマイシン 100 μ l/ml (Gibco 社) を各 well に 500 μ l ずつ接種して、1 時間作用させ、各 well 内の細胞を PBS で 3 回洗浄した。続いて、200 μ l の 1.0 % Triton-X (Gibco 社) を各 Well に加え、15 分間処理し、接着試験と同様に希釈液を作製して、Caco-2 細胞内に侵入した菌数を算出した。接着・侵入試験は、各被検株につき 3 回行い、それぞれの試験における被験株の菌数の平均値を測定し、以下の式で接着、侵入率を算出した。

接着(侵入)率 = 接着(侵入)した菌数 (CFU/ml) / 接種した菌数 (= 2.0×10^6) (CFU/ml) (%)

2.2.11 統計学的解析

野生鹿および猪における *Campylobacter* 属菌の保菌率の差については、Minitab 統計ソフトウェア (Minitab 社、Coventry、UK) を用いて、 χ^2 検定を実施し有意差 ($p < 0.05$) を求めた。

表 2-1. *Campylobacter* 属菌、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的 PCR と DNA シーケンスに用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

菌種	遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>Campylobacter</i> 属	23Sr RNA	23SF	TATACCGGGTAAGGAGTGCTGGAG	650bp
		23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG	
<i>C. jejuni</i>	<i>hipO</i>	CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323bp
		CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC	
<i>C. coli</i>	<i>glyA</i>	CCF	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126bp
		CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG	

表 2-2. *C. hyointestinalis* 特異的 PCR と DNA シーケンスに用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

菌種	遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>C. hyointestinalis</i>	23Sr RNA	HYO1F	TATACCGGGTAAGGAGTGCTGGAG	611bp
		HYOFET 23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG	

表 2-3. *Campylobacter* 属菌、*C. jejuni* および *C. coli* 特異的 PCR の反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	95	540
増幅 (×30)	熱変性	30
	アニーリング	30
	伸長反応	30
最終伸長 (×1)	72	420

表 2-4. *C. hyointestinalis* 特異的 PCR の反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	95	900
増幅 (×25)	熱変性	30
	アニーリング	90
	伸長反応	60
最終伸長 (×1)	72	600

表 2-5. *chcdt-I(A/B/C)*、*chcdt-II(A/B/C)* 特異的 PCR に使用したプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>chcdt-IA</i>	F	GTTGCTCTAGCAAAGCC	582
	R	AACACTCTTTGGAAGCG	
<i>chcdt-IB</i>	F	ACTTGGAATTTGCAAGC	720
	R	TCTAAAATTTACHGGAAAATG	
<i>chcdt-IC</i>	F	GAAGATGACAATGTTATGCC	417
	R	GATGTTTGACTTCTCGTCC	
<i>chcdt-IIA</i>	F	ACTAGGGATAACCTAGGG	418
	R	AATTTGGCTCTAGCGTGC	
<i>chcdt-IIB</i>	F	ACTTGGAATATGCAAGGA	737
	R	CCAAATGTTATAGGAAAGTG	
<i>chcdt-IIC</i>	F	ATGAGAGTTTGGGATTTGC	494
	R	TGTGCTTATACATTGCGCC	

表 2-6. *chcdt-I(A/C)*、*chcdt-II(A/B/C)* 特異的 PCR に用いた反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	95	900
増幅 (×25)	熱変性	30
	アニーリング	30
	伸長反応	60
最終伸長 (×1)	72	600

表 2-7. *chcdt-I(B)* 特異的 PCR に用いた反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	95	900
増幅 (×25)	熱変性	30
	アニーリング	30
	伸長反応	60
最終伸長 (×1)	72	600

表 2-8. *cadF* 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>cadF</i>	cadF-F	GGTACTCCAAAAGGCGTTGT	304bp
	cadF-R	CGCCAAATCCCTCTGTAGTG	

表 2-9. *cadF* 特異的 PCR に用いた反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	94	180
増幅 (×35)	熱変性	30
	アニーリング	60
	伸長反応	30
最終伸長 (×1)	72	300

表 2-10. *flaA* および *flaB* 特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>flaA</i>	flaA-F	AATAAAAATGCTGATAAAACAGGTG	855bp
	flaA-R	TACCGTTCCAATGTCTGCTCTGATT	
<i>flaB</i>	flaB-F	AAGGATTTAAAATGGGTTTTAGAATGGACACC	260bp
	flaB-R	GCTCATCCATAGCTTTATCTGC	

表 2-11. *flaA* および *flaB* 特異的 PCR に用いた反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	94	240
増幅 (×30)		
熱変性	94	60
アニーリング	53	60
伸長反応	72	60
最終伸長 (×1)	72	300

2.3 成績

2.3.1 わが国の野生鹿および猪における *C. jejuni*、*C. coli*、*C. hyointestinalis* の保菌状況

鹿 253 頭中 7 頭 (2.8%)、猪 321 頭中 71 頭 (22.1%) から *C. hyointestinalis* が分離された (表 2-12)。野生猪における保菌率は鹿と比べて有意 ($p < 0.05$) に高値を示した。*C. hyointestinalis* が分離された鹿の捕獲地は 19 県のうち 6 県 (A 県、D 県、K 県、M 県、Q 県、R 県) で、2.9~11.1% の保菌率であった。一方、同猪では 8 県 (D 県、E 県、J 県、M 県、N 県、P 県、Q 県、R 県) で、10~50% の保菌率であった。*C. jejuni* および *C. coli* は、検討した全ての検体から分離されなかった。

2.3.2 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の *chcdt* 保有状況

本研究で得られた *C. hyointestinalis* 23 株のうち、全ての鹿由来株および 141 株 (72.7%) の猪由来株は、*chcdt-I*(A/B/C) と *chcdt-II*(A/B/C) の全てを保有していた。他の猪由来 53 株 (27.3%) は *chcdt-II*(A/B/C) のみを保有していた (表 2-13)。

2.3.3 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の WGS 解析

鹿由来 2 株 (18D42-2 株および 19D10-1 株)、猪由来 3 株 (18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株) の計 5 株について、WGS 解析を行った (表 2-14)。各被検株のドラフトゲノム配列は 29、24、32、18、および 28 本の Contig 配列で構成され、1,716,126~1,773,046bp の塩基配列がそれぞれ決定された (表 2-15)。各ドラフトゲノム配列の GC 含量は 34.0~34.3% であった。アノテーション

オンにより、1,724~1,817 のコード配列(CDS)、3 個の rRNA、および 33~42 個の tRNA が検出された。一方、参考配列とした LMG9260 株では、ゲノムサイズが 1,753,385bp、GC 含量が 34.0%、CDS が 1,771 個、rRNA は 9 個、tRNA は 45 個であった。

2.3.4 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株における病原関連遺伝子の保有状況

WGS 分析により、検討した 5 株からは、運動性関連遺伝子 (*flaB*、*fliA*、*fliF*、*fliK*、*fliM*、*fliY*、*flgE*、*flgH*、*flgI*、および *rpoN*)、化学走性関連遺伝子 (*cheA*、*cheB*、*cheR*、*cheV*、*cheW*、*CheY*、および *luxS*)、細胞接着関連遺伝子 (*cadF* および *pldA*)、細胞毒素遺伝子 (*cdt*)、細胞侵入関連遺伝子 (*flhA*、*flhB*、*fliP*、*fliQ*、*fliR*、*flaC*、*ciaB*、および *htrA*)、糖鎖付加関連遺伝子 (*pgl*)、鉄利用関連遺伝子 (*cfrA* および *fur*)、薬剤耐性コード遺伝子 (*cmeA*、*cmeB*、および *cmeC*)、およびストレス応答遺伝子 (*spoT*、*katA*、*ahpC*、*tpx*、*sod*、および *dnaJ*) の計 40 種類の病原異関連遺伝子を保有していることが明らかとなった(表 2-16)。

運動性に関与する *flaB* は、鹿由来 2 株(18D42-2 株および 19D10-1 株)で、細胞接着に関連する *cadF* は、猪由来 1 株(18B189-1 株)、鉄利用に関連する *cfrA* は鹿由来 1 株(18D42-2 株)で、それぞれ検出されなかった。

対照とした下痢症患者分離株 (*C. jejuni* 81-176 株および *C. coli* 15-537360 株)は、*C. hyointestinalis* 株で同定された 40 個の遺伝子すべてを保有していた。

2.3.5 PCR による鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の *cadF*、*flaA*、*flaB* の保有状況

検討した全ての分離株において *flaA* は検出されなかった(図 2-1)。一方、18B213-2 株を除く各分離株で *flaB* が検出された(図 2-2)。また、*cadF* は全ての分離株において検出された(図 2-3)。

2.3.6 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の運動性試験

検討した全ての分離株で *C. hyointestinalis* ATCC32517^T 株、*C. jejuni* NCTC11351^T 株と同様に活発な運動性が確認された。

2.3.7 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株における Caco-2 細胞への感染実験

i) 接着試験

接着率は、各鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株で 3.4~5.2%、ATCC32517^T 株で 3.8% であり、*C. jejuni* NCTC11351^T 株 の 2.3% に比べ有意 ($p<0.05$) に高値を示した。また、18D42-2 株の接着率は、ATCC32517^T 株、18B189-1 株および 18B213-2 株に比べ有意 ($p<0.05$) に高値を示した(図 2-4)。

ii) 侵入試験

侵入率は、各鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株で 0.04~0.05%、ATCC32517^T 株および *C. jejuni* NCTC11351^T 株の侵入率はいずれも 0.04% で、有意差は認められなかった。また、18B213-2 株は ATCC32517^T 株と 18B189-1 株に比べ有意 ($p<0.05$) に高値を示した(図 2-5)。

表 2-12. わが国の野生鹿および猪における *Campylobacter* の保菌状況

地方	県	鹿		猪	
		検体数	陽性検体数 (%)	検体数	陽性検体数 (%)
東北	A	9	1 (11.1)		NT
北関東/ 甲信	B	3	0	4	0
	C	17	0		NT
南関東	D	34	1 (2.9)	26	6 (23.1)
	E	23	0	2	1 (50)
北陸	F		NT	9	0
	G		NT	2	0
東海	H	20	0	1	0
	I	3	0		NT
近畿	J	4	0	2	1 (50)
	K	16	1 (6.3)	4	0
中国	L		NT	2	0
	M	33	1 (3.0)	8	2 (25)
四国	N	45	0	52	14 (26.9)
	O		NT	12	0
九州	P		NT	7	1 (14.3)
	Q	14	1 (7.1)	154	43 (27.9)
	R	30	2 (3.3)	30	3 (10)
	S	2	0	6	0
計		253	7 (2.8)	321	71 (22.1)

NT : 未検討

表 2-13. 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の *chcdt* 保有状況

由来動物種	株数(%)	<i>chcdt-I</i>			<i>chcdt-II</i>		
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
鹿	23 (100)	+	+	+	+	+	+
猪	141 (72.7)	+	+	+	+	+	+
	53 (27.3)	—	—	—	+	+	+

表 2-14. WGS 解析に使用した鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の由来動物種、捕獲地(県)、および *chcdt* 保有状況

株名	由来動物種	県	<i>chcdt-I(A/B/C)</i>	<i>chcdt-II(A/B/C)</i>
18D42-2	鹿	D	+	+
19D10-1	鹿	Q	+	+
18B171-2	猪	Q	—	+
18B189-1	猪	D	+	+
18B231-2	猪	Q	+	+

表 2-15. 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の WGS 解析結果

由来 動物種	株名	全塩基数	Contig 数	GC 含量(%)	CDS 数	rRNA 数	tRNA 数	DRA or Accession numbers
人 (参考)	LMG9260	1,753,385	1	34.0	1,771	9	45	NC_008787.1
鹿	18D42-2	1,745,589	29	34.2	1,795	3	42	DRA012536
	19D10-1	1,759,837	24	34.2	1,792	3	33	DRA012537
猪	18B171-2	1,773,046	32	34.3	1,815	3	41	DRA012533
	18B189-1	1,756,055	18	34.0	1,817	3	42	DRA012534
	18B213-2	1,716,126	28	34.2	1,724	3	42	DRA012535

表 2-16. 鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の病原関連遺伝子の保有状況

機能	遺伝子	<i>C. jejuni</i> 株	<i>C. coli</i> 株	<i>C. hyointestinalis</i> 株					
		81-176	15-537360	LMG 9260	18D42-2	19D10-1	18B171-2	18B189 -1	18B213-2
運動性	<i>flaB</i>	+	+	+	-	-	+	+	+
	<i>fliA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliK</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliM</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliY</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>flgE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>flgH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>flgI</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>rpoN</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
化学走性	<i>cheA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cheB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cheR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cheV</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cheW</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cheY</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>luxS</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
接着	<i>cadF</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
	<i>pldA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
毒素	<i>cdt</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
侵入	<i>flhA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

	<i>flhB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliP</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliQ</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>fliR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>flaC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>ciaB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>htrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
糖鎖付加	<i>pgl</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鉄利用	<i>cfrA</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>fur</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
薬剤耐性	<i>cmeA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cmeB</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>cmeC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ストレス応答	<i>spoT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>katA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>ahpC</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>tpx</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sod</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>dnaJ</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

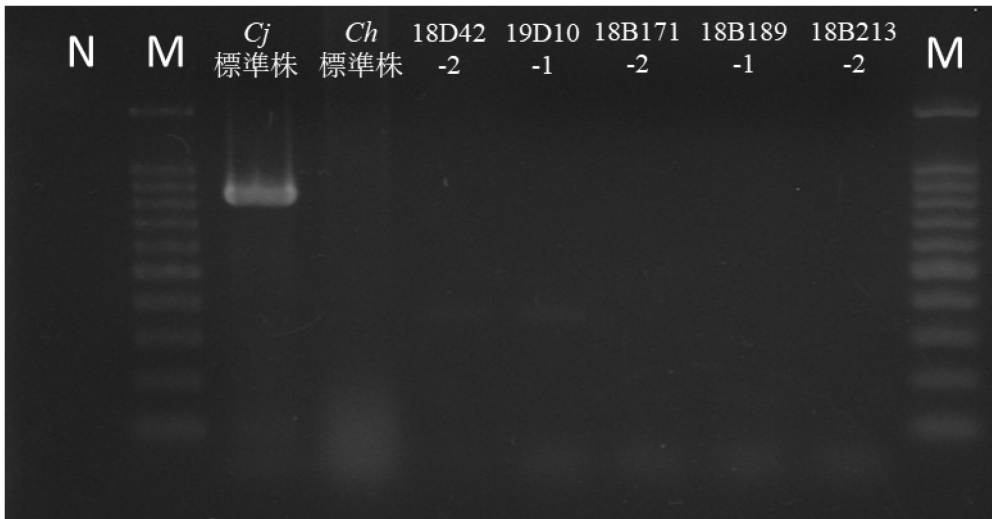


図 2-1. わが国の野生鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株 からの *flaA* の検出状況

各株から DNA を抽出し、PCR により、*flaA* (855bp) を検出した。

N は陰性コントロール、M は 100bpDNA マーカー、*Cj* 標準株は *C. jejuni* NCTC11351^T 株、*Ch* 標準株は *C. hyointestinalis* ATCC32517^T 株、分離株 (18D42-2 株、19D10-1 株、18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株) をそれぞれ示す。

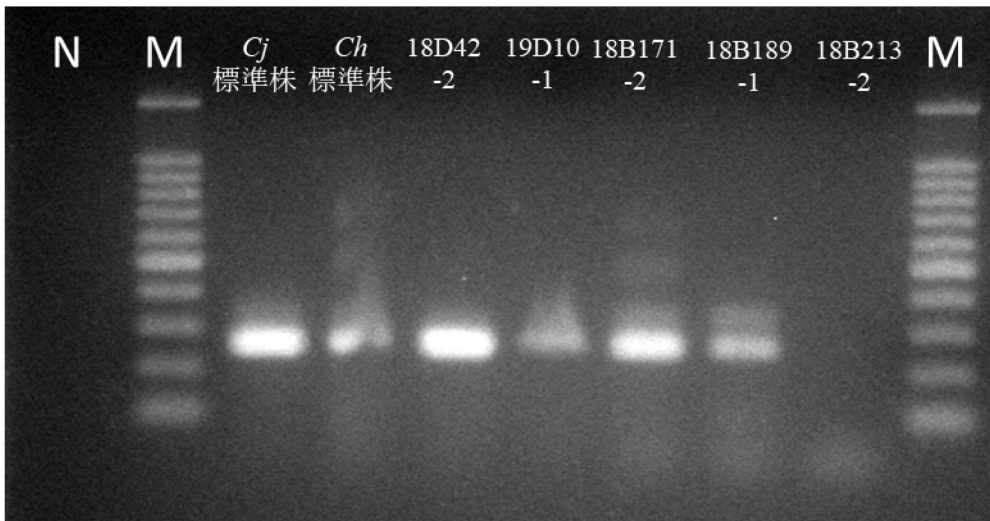


図 2-2. わが国の野生鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* からの *flaB* の検出状況

各株から DNA を抽出し、PCR により、*flaB* (260bp) を検出した。

N は陰性コントロール、M は 100bpDNA マーカー、*Cj* 標準株は *C. jejuni* NCTC11351^T 株、*Ch* 標準株は *C. hyointestinalis* ATCC32517^T 株、分離株 (18D42-2 株、19D10-1 株、18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株) をそれぞれ示す。

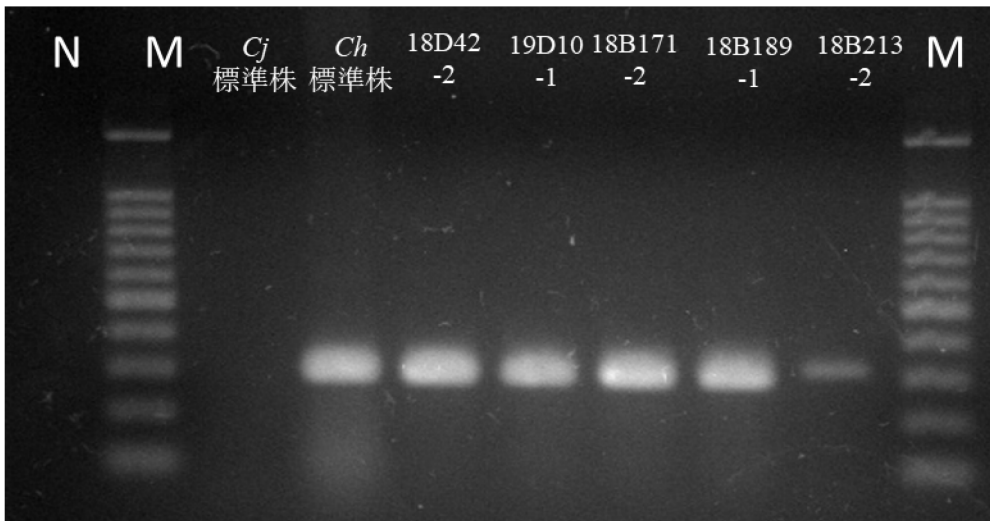


図 2-3. わが国の野生鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株からの *cadF* の検出状況

各株から DNA を抽出し、PCR により、*cadF*(304bp)を検出した。

N は陰性コントロール、M は 100bpDNA マーカー、*Cj* 標準株は *C. jejuni* NCTC11351^T 株、*Ch* 標準株は *C. hyointestinalis* ATCC32517^T 株、分離株(18D42-2 株、19D10-1 株、18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株)をそれぞれ示す。

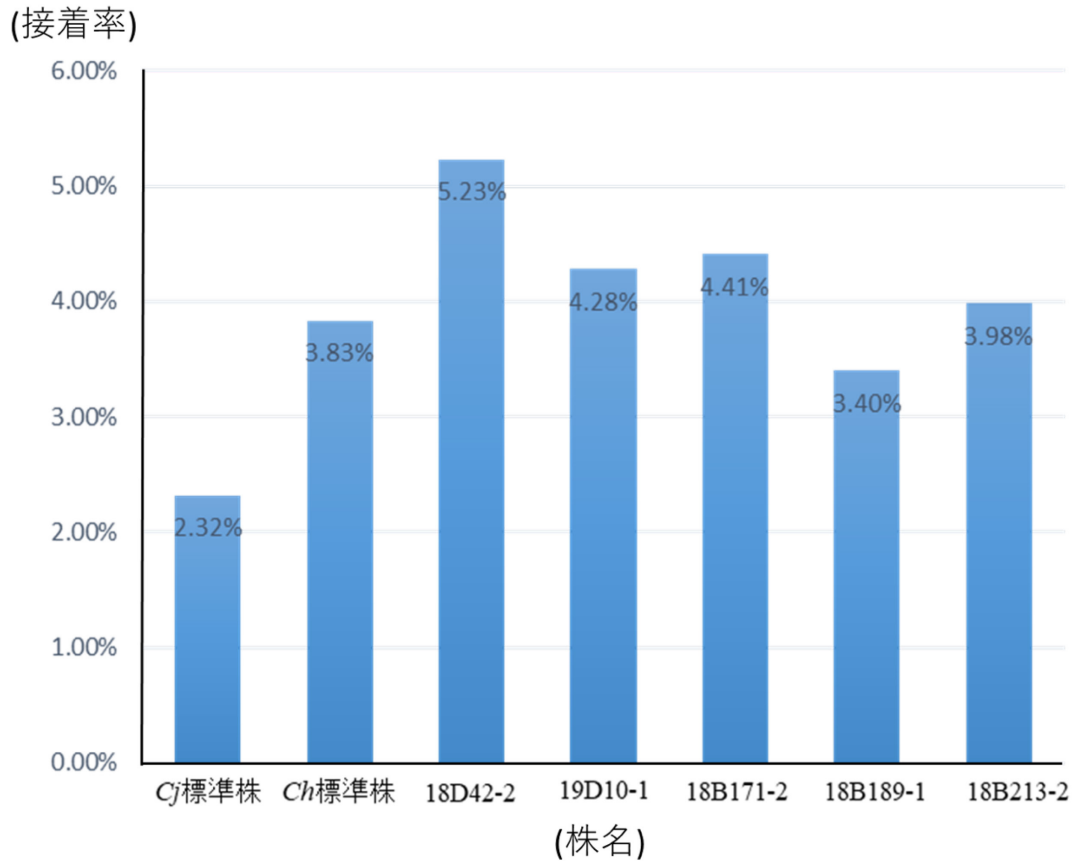


図 2-4. わが国の野生鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の Caco-2 細胞への接着率

各株を MOI=10 で Caco-2 細胞へ感染させ、3 時間培養した。培養後、Caco-2 細胞を洗浄し、同細胞に接着した各菌数を測定した。試験は、各被検株につき 3 回行い、被験株の菌数の平均値を計測し、接着率 = 接着した菌数 (CFU/ml) / 接種した菌数 ($=2.0 \times 10^6$) (CFU/ml) により接着率 (%) を算出した。Cj 標準株は *C. jejuni* NCTC11351^T 株、Ch 標準株は *C. hyointestinalis* ATCC32517^T 株、分離株 (18D42-2 株、19D10-1 株、18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株) をそれぞれ示す。

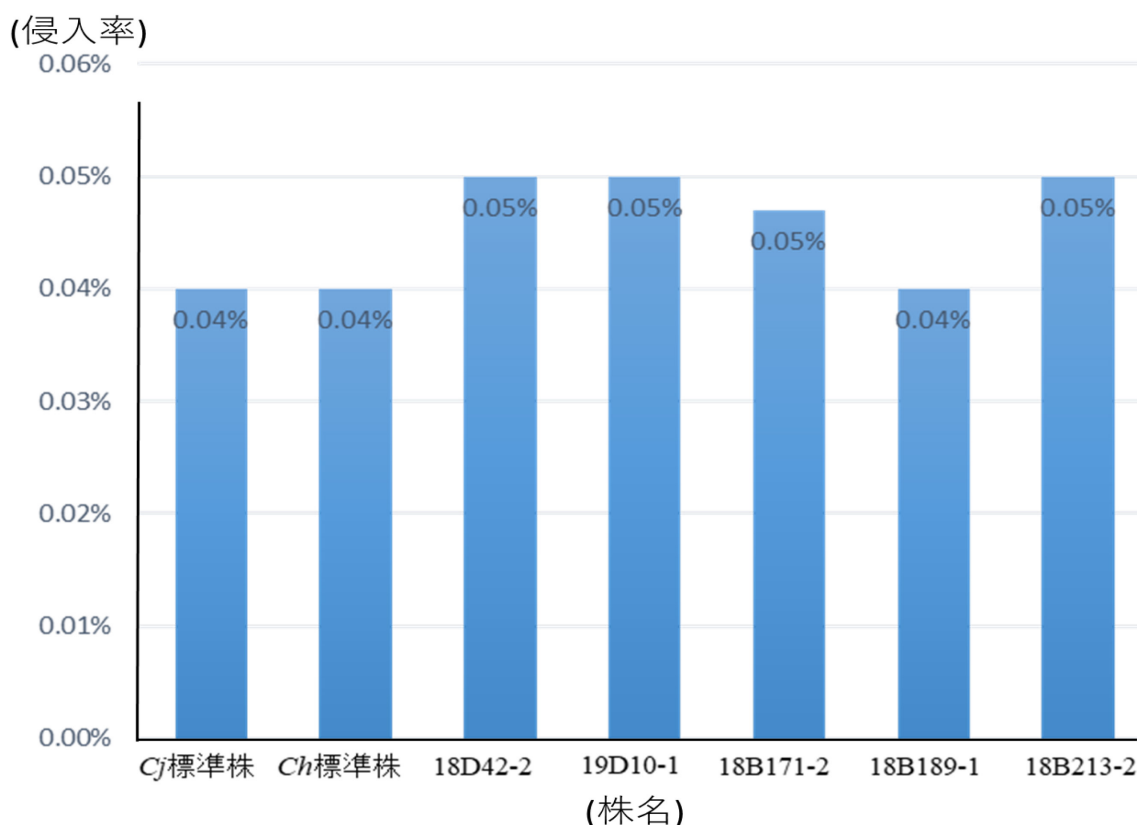


図 2-5. わが国の野生鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株の Caco-2 細胞への侵入率

各株を MOI=10 で Caco-2 細胞へ感染させ、6 時間培養した。培養後、Caco-2 細胞を洗浄し、ゲンタマイシン処理を行った後、再び、Caco-2 細胞を洗浄し、同細胞に侵入した各菌数を測定した。試験は、各被検株につき 3 回行い、被験株の菌数の平均値を計測し、侵入率 = 侵入した菌数 (CFU/ml) / 接種した菌数 (= 2.0×10^6) (CFU/ml) により侵入率 (%) を算出した。Cj 標準株は *C. jejuni* NCTC11351^T 株、Ch 標準株は *C. hyointestinalis* ATCC32517^T 株、分離株 (18D42-2 株、19D10-1 株、18B171-2 株、18B189-1 株、18B213-2 株) をそれぞれ示す。

2.4 考察

本研究により、わが国の野生鹿 2.8%(7/253)および猪の 22.1%(71/321) がそれぞれ *C. hyointestinalis* を保菌していることが明らかとなった。これまでに、野生鹿の *C. hyointestinalis* 保菌率は、カナダでは 0%、ノルウェーでは 0.04%、フィンランドでは 6.0%、猪では、スペインでは 17.4%と報告されている[21, 43, 63, 114]。本研究で得られたわが国の野生猪における *C. hyointestinalis* 保菌率は、過去の海外の保菌率に比べ、高率であった。過去の *C. hyointestinalis* の検出は、*C. jejuni* および *C. coli* の至適培養温度である 42°C で増菌し、分離培養を行っている。本研究の増菌ならびに分離培養時には、42°C に加え *C. hyointestinalis* の至適培養温度である 37°C を併用した。実際に、本研究で得られた分離株のうち、37°C での培養により分離された株数は 217 株と、42°C で分離された株数 63 株より多く、42°C で分離された 63 株の全てが 37°C でも分離された。このため、*C. hyointestinalis* をより効率的に分離することが可能となり、正確な保菌率が反映されたものと考えられた。従って、*C. jejuni*、*C. coli* ならびに *C. hyointestinalis* を対象とした保菌調査を行う際には、37°C と 42°C を併用するべきであると考えられた。

海外の野生鹿および猪における *C. jejuni* と *C. coli* の保菌率は 0~6.3% と低率であることが報告されている[14, 21]。また、わが国でも、野生鹿で 0~4.5%、野生猪で 0.8~6.5% と、海外の報告と同様に、低率な保菌率であることが報告されている[106, 113]。本研究では、検討した野生鹿および猪から *C. jejuni* と *C. coli* は分離されなかったことから、わが国の野生鹿、猪における *C. jejuni* および *C. coli* の保菌状況は極めて低いと思われる。

本研究では、野生猪の *C. hyointestinalis* 保菌率(22.1%)は、野生鹿(2.8%)に比べ、有意に高値であることが明らかとなった。その理由として、雑食性の猪は、草食性の鹿よりも *C. hyointestinalis* に汚染された感染源に暴露される機会が多いためであると考えられる。さらに、野生猪は、体表に付着しているダニなどの外部寄生虫を落とすため、湖沼付近にぬた場を形成し、泥を浴びる習性がある[9]。ぬた場を介した泥浴びの習性により、鹿に比べて猪は、*C. hyointestinalis* を保菌した他の猪の糞便に暴露される機会が多かった可能性が考えられた。さらに、スペインでは人工の水場の周辺で捕獲された猪は、別の場所で捕獲された猪よりも *Campylobacter* の保菌率が高いことも報告[14]されていることから、ぬた場や水場を介して同菌が伝播した可能性は極めて高いと考えられる。

本研究で得られたすべての *C. hyointestinalis* 株は *chcdt-II*を保有していた。Kameiら[60]は、さまざまな動物から分離した株の遺伝子を解析したところ、全ての *C. hyointestinalis* 株が *chcdt-II*を保有していたことから検討した株では *chcdt-II*が特異的な *cdt* であることを報告した。その一方で、下痢症患者に由来する *C. hyointestinalis* Ch022 株は、*chcdt-I*と *chcdt-II* の両方を保有していたことから、両遺伝子を保有する株は人に病原性を示す可能性がある [60]。本研究で得られた、全ての野生鹿由来 23 株と猪由来 141 株(72.7%)は、*chcdt-I* および *chcdt-II*の双方を保有していたことから、人に対して病原性を示す可能性がある。*chcdt-I*と *chcdt-II* の両方を保有する菌株は、豚、牛、猿、象などのさまざまな動物からも分離されている[60]ことから、今後、*C. hyointestinalis* の *chcdt* の機能解析を行うとともに、人への病原性発現における役割を検討することが、本菌の病態を解明する上で重要であると思われる。

WGS 解析により、検討した全ての *C. hyointestinalis* 株から、*C. jejuni* および *C. coli* でも確認された 84 個の病原関連遺伝子のうち 40 個が検出された[8]。下痢症患者由来 *C. jejuni* 81-176 株および *C. coli* 15-537360 株は、今回、鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株から検出された 40 個の遺伝子すべてを保有していた。40 個の遺伝子のうち、38 個の病原体関連遺伝子は、全ての株に共通であったが、鹿由来 2 株 (18D42-2 株および 19D10-1 株) では *flaB* が、18B189-1 株では *cadF* が、18D42-2 株では *cfrA* がそれぞれ検出されなかった。

WGS 解析で検出されなかった *flaA*、*flaB*、および *cadF* の各株における保有状況を PCR にて再検討したところ、*flaA* は全ての株で検出されず、WGS 解析と PCR の成績は一致した。また、*cadF* は全ての株から検出されたのに対し、*flaB* は 18D42-2 株および 19D10-1 株からは検出されたものの、18B213-2 株からは検出されなかった。以上の成績から、18B213-2 株の *flaB* は、本研究で使用した PCR のプライマーが増幅する領域において、塩基配列に突然変異が生じるなどして検出されなかった可能性が考えられた。今後、*flaB* を検出する別のプライマーを設計し、改めて 18B213-2 株の *flaB* 保有状況を検討する必要があると思われる。

WGS 解析で得られたデータを基に、*de novo assembly* によってドラフトゲノム配列を決定した際、各株の総塩基数は 1,716,126~1,773,046bp と参考株である LMG9260 株の 1,753,385bp と類似した値であったが、各株で決定されたドラフトゲノム配列は、18~32 本と多くの Contig に分かれた。各株のドラフトゲノム配列の Contig 間には、未決定のゲノム配列領域が存在することから、今回、各株から検出されなかった各種病原関連遺伝子は、未決定のゲノム配列領域にコードされている可能性がある。今後、ロングリードシーケンス法を用いて、完全長ゲノム配列を決定し、鹿や

猪が保有する *C. hyointestinalis* の暴言関連遺伝子を明らかにすることで人に対する病原性を正しく評価する必要がある。

Caco-2 細胞への接着・侵入試験により、鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株が Caco-2 細胞に接着・侵入することが明らかとなった。また、*C. hyointestinalis* 株の細胞接着率は *C. jejuni* NCTC11351^T 株と比べ、有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した一方で、侵入率は同程度であった。接着試験で検討した全ての *C. hyointestinalis* 株は、*cadF* を保有していたものの、*C. jejuni* NCTC11351^T 株の *cadF* の塩基配列の相同性値が 54% (569/1,026bp) と低値であった (結果は示さず)。これにより、*C. jejuni* と *C. hyointestinalis* の CadF の機能は異なっている可能性がある。また、接着率、侵入率ともに、有意差を示す株があることも明らかとなった。検討した全ての鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株は、接着に関わる *cadF* および侵入に関わる *ciaB* を保有していたことから、各株間で、接着、侵入に関連するこれらの遺伝子の塩基配列に違いがや機能に差があり、また、両遺伝子のプロモーターの違いによって、それらのタンパクの発現量に違いがある可能性などが考えられる。

Campylobacter の鞭毛は、2 つの相同性の高いメジャーフラジェリン (FlaA) とマイナーフラジェリン (FlaB) で構成されている[8]。Guerry ら[40]は、*flaA* の変異した *C. jejuni* 株は鞭毛が短縮し、運動性が大幅に低下したことから、FlaA が *C. jejuni* の運動性の発現に重要であることを明らかにした。また、同株を鶏に感染させたところ、鶏腸管内における *C. jejuni* のコロニー形成率が低下したことから、*C. jejuni* 感染が成立するためには、*C. jejuni* の運動性が重要であることを明らかにした。さらに、この変異株を *in vitro* で腸管上皮細胞に感染させたところ、親株に比べると侵入

率が低下したことから、腸管上皮細胞への侵入には、運動性が必要であることが明らかとなっている[39]。一方、*flaB* の変異した *C. jejuni* 株は、運動性が保存されていたことから、*C. jejuni* では FlaB が運動性に不可欠ではないことが報告されている[121]。興味深いことに、全ての鹿および猪由来 *C. hyointestinalis* 株からは *flaA* が検出されなかったにもかかわらず活発な運動性を示すことが判明した。以上の成績から、*C. jejuni* と異なり *C. hyointestinalis* の運動性の発現に FlaA は必須の要素ではないと考えられる。今後、*flaB* をノックアウトした株を作製し、運動性や Caco-2 細胞への接着・侵入試験を行い、*C. hyointestinalis* における *flaB* の機能を解析するとともに病原性発現との関係性を評価する必要がある。

cfrA は、鉄をキレートする外膜タンパク質である CfrA をコードする。CfrA は、鉄イオンが不足している宿主環境において、様々な細菌が鉄イオンを取り込みやすくする機能を持つことが報告されている[40]。また、*cfrA* を変異した *C. jejuni* 株は親株と比べて、ニワトリの腸管へのコロニー形成率が有意に低くなることが報告されている[8, 90]。本研究では、18D42-2 株は *cfrA* が欠損していたことから、同株は他の株と比較して、鉄利用の働きや腸管への定着性に違いがある可能性がある。今後、18D42-2 株を用いて、人の腸管上皮細胞や実験動物への感染実験を行い、*C. hyointestinalis* における CfrA の機能を明らかにしていきたい。

2.5 小括

国内外の猪からは *C. hyointestinalis* が高率に分離されることが報告されている。近年、*C. hyointestinalis* 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。本章では、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 Caco-2 細胞を用いた感染試験により、*C. hyointestinalis* の人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 頭の直腸使用にて *C. jejuni*、*C. coli* および *C. hyointestinalis* の分離を行った。分離株は *chcdt* の保有状況を検討した。一部の株は 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。また、接着関連遺伝子 *cadF*、鞭毛関連遺伝子 *flaA*、*flaB* の保有状況を PCR により解析するとともに、Caco-2 細胞への接着、侵入試験および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 *C. hyointestinalis* が分離された。猪は鹿と比べて高率に保菌していることが明らかとなった。

chcdt の保有状況の検討では、鹿由来 23 株の全て、猪由来 141 株 (72.7%) が下痢症患者分離株と同様に *chcdt-I* と *chcdt-II* の両者を保有していた。また、WGS 解析では、1,716,126～1,773,046bp の塩基配列が決定され、*C. jejuni* や *C. coli* と同様の病原関連遺伝子が 38～40 種検出された。よって鹿および猪の分離株の一部は人に対し病原性を示す可能性が示唆された。

PCR の結果、全ゲノム解析の結果と同様に鞭毛遺伝子である *flaA* は検討した全ての分離株から検出されなかった。その一方で、全ての分離株が *C. jejuni* と同様に活発な運動性を有していることが明らかとなった。これにより、*C. hyointestinalis* は *flaA* 以外の機能を用いて活発な運動性を示していると考えられた。また、*C. hyointestinalis* は *C. jejuni* と比較して Caco-2 細胞に対し接着しやすく、同程度の侵入能を有していることが明らかとなった。

2.6 第2章で使用した試薬類の組成

*2-1. プレストン増菌培地

Nutrient broth (BBL 社、Franklin Lakes、USA)	12.5 g
馬脱繊維血液	25 ml
再精製水	475 ml
Modified Preston Campylobacter Selective Supplement (Oxoid 社、Waltham、USA)	1 bial
滅菌再精製水	1 ml

Nutrient broth と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、馬脱繊維血液と滅菌再精製水で溶解したプレストン選択サプリメントを加え、十分混和し、9ml ずつ滅菌小試験管に分注した。

*2-2. mCCDA 培地

mCCDA 寒天培地 (Merck 社)	45.5 g
再精製水	500 ml
mCCDA Selective Supplement (Merck 社)	1 bial
滅菌再精製水	1 ml

mCCDA 寒天培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、滅菌再精製水で溶解した mCCDA Selective Supplement を加え、十分混和し、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*2-3. スキロー血液寒天培地

ミューラーヒントン S 寒天培地 (栄研化学株式会社)	12.5 g
馬脱纖維血液	25 ml
再精製水	475 ml
Campylobacter Selective Supplement (Skirrow) (Oxoid 社)	1 bial
滅菌再精製水	1 ml

ミューラーヒントン S 寒天培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、馬脱纖維血液と滅菌再精製水で溶解した Campylobacter Selective Supplement (Skirrow)を加え、十分混和し、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*2-4. 5%馬血液加ミューラーヒントン培地

ミューラーヒントン S 寒天培地 (栄研化学株式会社)	12.5 g
馬脱纖維血液	25 ml
再精製水	475 ml

ミューラーヒントン S 寒天培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、馬脱纖維血液を加え、十分混和し、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

第3章

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

3.1 はじめに

Arcobacter 属菌は 1977 年、牛流産胎子から初めて分離された細菌である[26]。本菌はグラム陰性で、S 字状またはカンマ状の形態を示し、好気条件や 15°C の低温でも発育可能であることから *Campylobacter-like bacteria* または *Aerotolerant-Campylobacter* と呼ばれてきた。Vandamme ら[116]は、ドットブロットハイブリダイゼーション解析等の結果から、本菌を *Arcobacter* と命名し、現在までに、21 菌種が認められている。これらのうち、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus*、*A. skirrowii* の 3 菌種は人に病原性を有する主要な菌種である[94]。

食品や飲料水を原因とする *A. butzleri* による食中毒事例は、欧米で報告されている[65, 98, 111]。1983 年、下痢は認められなかったものの、腹痛を訴えたイタリアの小学校の教師と生徒の糞便から *A. butzleri* が分離されている[115]。さらにわが国においても、2005 年に胆管切除・胆管空腸吻合術を受けた後、2 週間にわたり発熱を呈した 61 歳の女性の血液から *A. butzleri* が分離されている[129]。一方、アメリカでは、健常者の糞便の 6.2 % から *Arcobacter* 属菌が分離されている[116]。このように、*A. butzleri* は食中毒事例のみならず、健常者や下痢症状を示さない患者からも分離されていることから、日和見感染症の起因为菌としても認識されはじめています。

2002 年に、国際食品微生物規格委員会 (International Commission on Microbiological Specifications for Foods: ICMSF) は、*Arcobacter* 属菌を「人の健康に重大な危険をもたらす病原体」として分類した[50]。近年では、食中毒事例や下痢症患者から *A. butzleri*、*A. skirrowii* および *A. cryaerophilus* が散発的に分離される事例が報告されていることから、Miller ら[77]は、これら 3 菌

種は食中毒を引き起こす「新興病原体」として提唱している。さらに、ドイツ連邦リスク評価研究所 (Bundesinstitut für Risikobewertung: BfR) は、2007 年に「生肉中の *Arcobacter* 属菌は食中毒を引き起こす原因となる可能性がある」とする意見書を公表した[7]。わが国では、2016 年に農林水産省食品・安全局により、「有害微生物の優先リストの見直し案及び実態調査の中期計画案(平成 29~33 年度)に対するアンケート調査」が行われ、「有害微生物の優先リストの見直しを行う対象」の一つとして *Arcobacter* 属菌が挙げられた[86]。その後、同局による平成 28 年度リスク管理検討会において、「新たに優先的にリスク管理の対象とすることを検討中の危害要因のリスクプロファイル案等」において、*A. butzleri* の病原性に関する情報や汚染の可能性のある食品の種類及び汚染報告例が取りまとめられている[87]。このように、わが国をはじめ、世界各国において *Arcobacter* は新たな有害微生物として注目されるようになった。

家畜の *Arcobacter* 属菌の保菌状況は、イギリスの鶏で 65.9% [108]、オーストラリアの牛で 21.8% [72]、オーストラリアの羊で 15.3% [49]と報告されている。一方、わが国でも鶏の 14.5~62.5% [59, 81]、豚の 10~23.8%[59, 81]、牛の 3.6~4.0%[59, 81]から *Arcobacter* 属菌が分離されている。以上の成績から、*Arcobacter* 属菌は、家畜の中でも特に鶏から最も高率に分離されることが判明している。一方、野生鹿や猪における *Arcobacter* 属菌の保菌状況については、イランの鹿で 11.1%、ブラジルの猪で 14.2%という報告がある[20, 64]。しかしながら、わが国の野生鹿および猪における *Arcobacter* 属菌の保菌状況については全く検討されていない。

Arcobacter 属菌は新興病原細菌であるが、その研究報告は少なく、特に病原関連遺伝子に関する研究は限られている。Miller ら[77]は、下痢症患者由来 *A. butzleri* RM4018 株の全ゲノム

(Whole-Genome Sequencing: WGS)解析を行い、*Campylobacter*、*Salmonella*、*E. coli*、*Mycobacterium*、*Vibrio cholerae* ならびに腸内細菌科の細菌が保有する9つの病原関連遺伝子を検出している(表 3-1)。それらのうち、*cadF*(*Campylobacter* adhesion to Fibronectin)、*cj1349*(*Campylobacter* adhesion to Fibronectin)、*ciaB*(*Campylobacter* Invasion antigen B) および *pldA*(Outer membrane phospholipase A) は、*Campylobacter* から検出された人腸管上皮細胞への接着および侵入に必要な遺伝子である。*mviN*(Integral membrane protein MviN) は、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium や *E. coli* が保有し、細胞膜合成に関与する遺伝子である。*tlyA*(Hemolysin A) は、*Campylobacter* や *Mycobacterium* などから検出され、赤血球の溶血に関与する遺伝子である。*hecA*(Hemolysin/hemagglutinin-like protein A) および *hecB*(Hemolysin/hemagglutinin-like protein B) は、*Campylobacter* や大腸菌などの多くの腸内細菌科が保有し、赤血球の凝集に関与する遺伝子である。*irgA*(Iron-regulated outer membrane protein A) は、*Vibrio cholerae* や大腸菌などの腸内細菌から検出され、菌体内への鉄の取り込みの調節に関与する遺伝子である。以上のように、*Arcobacter* 属菌も他の食中毒細菌と同様の病原関連遺伝子を保有していることから、人に対しても病原性を有している可能性が示唆されている[77]。

Douidah ら[24]は、下痢症患者由来 *A. butzleri* LMG10828^T 株、*A. butzleri* LMG11632 株など様々な由来の *Arcobacter* 属菌の病原関連遺伝子を解析した結果、下痢症患者から分離された株は Miller ら[77]によって報告された 9 つの病原関連遺伝子を全て保有する株、もしくは *hecA* を除く 8 つの病原関連遺伝子を保有する株であったことを報告している。以上の成績から、これらの病原関連遺伝子を保有する株は、人に対して下痢原性を示す可能性があるかと推測されている。

Doudahら[24]は過去に様々な国から分離された牛由来の *A. butzleri* 29 株、*A. cryaerophilus* 9 株、および *A. skirrowii* 23 株の病原関連遺伝子の保有状況を検討したところ、全ての *A. butzleri* 株は、*cadF*、*cj1349*、*ciaB*、*mviN*、*tlyA*、*pldA* を保有しており、*hecB* は 86.2%の株から検出されたのに対し、*hecA* および *irgA* は、48.2～58.6%の株からのみ検出されることを報告している。また、*A. cryaerophilus* 株の *ciaB*、*mviN* の保有率は 77.7～88.8%と高率で、*pldA*、*tlyA*、*cadF*、*cj1349* の保有率は 33.3～55.5%、*hecA*、*irgA*、*hecB* の保有率は 0～11.1%と低率であったこと、全ての *A. skirrowii* 株は *ciaB* を保有していたのに対し、他の 8 つの病原関連遺伝子は、0～34.8%といずれも低率であったと報告している。しかしながら、各種 *Arcobacter* 属菌の病原性発現に、9 つの病原関連遺伝子がどのように関与しているか、未だ解明されていない。

本研究では、わが国の鹿および猪における *Arcobacter* 属菌の保菌状況を検討するとともに、分離株の病原関連遺伝子の保有状況を検討することにより、人に対する *Arcobacter* 属菌の潜在的な病原性を評価した。

表 3-1. *Arcobacter* 属菌の病原関連遺伝子の名称と機能

遺伝子	名称	機能
<i>cadF</i>	<i>Campylobacter</i> adhesion to fibronectin	接着
<i>cj1349</i>	Fibronectin-binding protein	
<i>ciaB</i>	<i>Campylobacter</i> invasion antigen B	侵入
<i>mviN</i>	Integral membrane protein MviN	細胞膜合成
<i>tlyA</i>	Hemolysin A	血球溶血
<i>hecA</i>	Hemolysin/hemagglutinin-like protein A	凝集
<i>hecB</i>	Hemolysin/hemagglutinin-like protein B	
<i>irgA</i>	Iron-regulated outer membrane protein A	鉄調節外膜
<i>pldA</i>	Outer membrane phospholipase A	外膜タンパク

3.2 材料および方法

3.2.1 材料

2017年9月から2020年8月にかけて、14県(8地域)で捕獲した鹿253頭および、16県(8地域)で捕獲した猪321頭からの直腸便を採取した。直腸便は無菌的に採取した後、4°C以下で直ちに、日本大学生物資源科学部獣医食品衛生学研究室に輸送した。全ての検体は、検体採取後72時間以内に、実験に使用した。

3.2.2 *Arcobacter* の分離培養

直腸便の1g量を、9mLの *Arcobacter* Selective broth (ASB)^{*1}(BD社、Franklin lakes、USA)に接種して、25°Cで72時間、微好気条件で増菌培養した。培養した増菌培地の1白金耳量を *Arcobacter* Selective Medium (ASM)^{*2}(BD社)とスキロー血液寒天培地(栄研化学株式会社、東京)に塗抹し、25°Cで72時間、微好気条件で分離培養を行った。各分離培地上に発育した *Arcobacter* を疑う透明で微小なコロニーを、1検体あたり最大5コロニー釣菌し、ブルセラ寒天培地^{*3}で25°C、72時間、微好気条件で純培養を行った。DNA抽出は2.2.3の方法に従って行った。

3.2.3 PCR およびシーケンス解析による *Arcobacter* の同定法

各分離株から抽出したDNAについて、*Arcobacter* 属特異的PCR[6]により *Arcobacter* 属であることの確認を行った。*Arcobacter* 属であることが確認された株については、*A. butzleri*、*A.*

cryaerophilus 1A、*A. cryaerophilus* 1B および *A. skirrowii* を特異的に検出する One-Step PCR 法により、それぞれの菌種を同定した[58]。属特異的 PCR に使用した試薬の組成は表 1-2 で示すものを用いた。*Arcobacter* 属特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列は表 3-2 に、PCR の反応条件を表 3-3 にそれぞれ示した。また、One-Step PCR 法に用いたプライマーの塩基配列は表 3-4 に、試薬の組成を表 3-5 に、One-Step PCR の反応条件は表 3-6 にそれぞれ示した。なお、陽性対照は *A. butzleri* ATCC49616^T 株、*A. cryaerophilus*1A ATCC43158^T 株、*A. cryaerophilus*1B ATCC49615^T 株、*A. skirrowii* ATCC51132^T 株からそれぞれ抽出した DNA 溶液、陰性対照は Nuclease-Free Water (Invitrogen 社)をそれぞれ用いた。PCR 産物は、1.2.4 で示した方法により電気泳動を行い、それぞれ 331bp、692bp、728bp、152bp、448bp 付近に PCR 産物が認められた株を、それぞれ *Arcobacter* 属菌、*A. butzleri*、*A. cryaerophilus* 1A、*A. cryaerophilus* 1B および *A. skirrowii* と判定した。得られた PCR 産物は、2.2.4 に示した方法により精製後、塩基配列を決定し、BLAST 検索を行い、菌種を同定した。

3.2.4 *Arcobacter* 株の 9 種類の病原関連遺伝子の保有状況の検討

Arcobacter 株については、2.2.3 に示した方法で DNA を抽出した後、Doudiah ら[24]の方法に従って 9 種類の病原関連遺伝子の保有状況を検討した。各 PCR に使用した試薬の組成は表 1-2 の方法に準拠した。各病原関連遺伝子特異的プライマーの塩基配列を表 3-7 に、*cadF*、*thyA*、*hecB*、*pldA* 特異的 PCR に用いた反応条件を表 3-8 に、*cj1349*、*ciaB*、*mviN*、*hecA*、*irgA* 各特異的 PCR に用いた反応条件を表 3-9 にそれぞれ示した。

3.2.5 統計学的解析

野生鹿および猪における *Arcobacter* の保菌率と各病原関連遺伝子の保有率の差については、Minitab 統計ソフトウェア (Minitab 社、Coventry、UK) を用いて、 χ^2 検定を実施し有意差 ($p < 0.05$) を求めた。

表 3-2. *Arcobacter* 属特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー名	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
23Sr RNA	Arco1	GTCGTGCCAAGAAAAGCCA	331
	Arco2	TTCGCTTGCGCTGACAT	

表 3-3. *Arcobacter* 属特異的 PCR の反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	94	180
増幅 (×27)	熱変性	94
	アニーリング	61
	伸長反応	72
最終伸長 (×1)	72	600

表 3-4. *Arcobacter* 種特異的 One- Step PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

菌種	プライマー名	フォワードプライマー (F) リバースプライマー (R)	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>A. butzleri</i>	N.butz	F	AGCGTTCTATTCAGCGTAGAAGATGT	692bp
<i>A. cryaerophilus</i> 1A	N.c.1A	F	ACCGAAGCTTTAGATTCTGAATTTATTCG	728bp
<i>A. cryaerophilus</i> 1B	N.c.1B	F	GGACTTGCTCCAAAAAGCTGAAG	152bp
<i>A. skirrowii</i>	N.ski	F	CGAGGTCACGGATGGAAGTG	448bp
<i>Arcobacter</i> 属菌	ARCO-U	R	TTCGCTTGCGCTGACATCAT	—

表 3-5. *Arcobacter* 種特異的 One- Step PCR に用いた試薬の組成

Go Taq Master Mix (promega 社)	10 μ l
DNA 溶液	1 μ l
0.5 μ M プライマー (N.c.1A および ARCO-U)	各 1 μ l
0.05 μ M プライマー (N.butz、N.c.1B および N.ski)	各 1 μ l
Nuclease Free Water (Invitrogen 社)	Up to 20 μ l

表 3-6. *Arcobacter* 種特異的 One- Step PCR の反応条件

反応 (サイクル数)	温度 ($^{\circ}$ C)	時間 (秒)
初期熱変性 (\times 1)	95	240
熱変性	95	30
増幅 (\times 30)	アニーリング	60
	伸長反応	30
最終伸長 (\times 1)	72	300

表 3-7.9 種類の病原関連遺伝子特異的 PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

遺伝子領域	プライマー	塩基配列 (5'-3')	増幅塩基長
<i>cadF</i>	cadF-F	TTACTCCTACACCGTAGT	283bp
	cadF-R	AAACTATGCTAACGCTGGTT	
<i>cj1349</i>	cj1349-F	CCAGAAATCACTGGCTTTTGAG	659bp
	cj1349-R	GGGCATAAGTTAGATGAGGTTCC	
<i>ciaB</i>	ciaB-F	TGGGCAGATGTGGATAGAGCTTGGA	284bp
	ciaB-R	TAGTGCTGGTCGTCCACATAAAG	
<i>mviN</i>	<i>mviN</i> -F	TGCACTTGTTGCAAACGGTG	294bp
	<i>mviN</i> -R	TGCTGATGGAGCTTTTACGCAAGC	
<i>tlyA</i>	<i>tlyA</i> -F	CAAAGTCGAAACAAAGCGACTG	230bp
	<i>tlyA</i> -R	TCCACCAGTGCTACTTCCTATA	
<i>hecA</i>	<i>hecA</i> -F	GTGGAAGTACAACGATAGCAGGCTC	537bp
	<i>hecA</i> -R	GTCTGTTTTAGTTGCTCTGCACTC	
<i>hecB</i>	<i>hecB</i> -F	CTAAACTCTACAAATCGTGC	528bp
	<i>hecB</i> -R	CTTTTGAGTGTTGACCTC	
<i>irgA</i>	<i>irgA</i> -F	TGCAGAGGATACTTGGAGCGTAACT	437bp
	<i>irgA</i> -R	GTATAACCCCATTTGATGAGGAGCA	
<i>pldA</i>	<i>pldA</i> -F	TTGACGAGACAATAAGTGCAGC	293bp
	<i>pldA</i> -R	TCCACCAGTGCTACTTCCTATA	

表 3-8. *cadF*、*tlyA*、*hecB*、*pldA* 特異的 PCR に用いた反応条件

反応 (サイクル数)	温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)	94	180
熱変性	94	45
増幅 (×32)	アニーリング	45
	伸長反応	45
最終伸長 (×1)	72	180

表 3-9. *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *hecA*, *irgA* 特異的 PCR に用いた反応条件

反応 (サイクル数)		温度 (°C)	時間 (秒)
初期熱変性 (×1)		94	180
熱変性		94	45
増幅 (×32)	アニーリング	56	45
	伸長反応	72	45
最終伸長 (×1)		72	180

3.3 成績

3.3.1. わが国の野生鹿および猪における *Arcobacter* の保菌状況

鹿 253 頭中 17 頭 (6.7%) から 32 株、猪 321 頭中 63 頭 (19.6%) から 153 株の *A. butzleri* が、猪 4 頭 (1.2%) から 6 株の *A. cryaerophilus* がそれぞれ分離された (表 3-10)。*Arcobacter* 属菌は 19 県のうち 7 県 (A 県、D 県、H 県、K 県、M 県、N 県、R 県) で捕獲された鹿から分離され、その保菌率は 2.9~22.2% の保菌率であった。

猪では、9 県 (D 県、F 県、M 県、N 県、O 県、P 県、Q 県、R 県、S 県) で捕獲された個体から *Arcobacter* 属菌が分離され、その保菌率は 7.7~30% であった。野生猪における保菌率は鹿の保菌率と比べて有意 ($p<0.05$) に高値であった。

3.3.2. 鹿、猪由来 *A. butzleri* 株および *A. cryaerophilus* 株の病原関連遺伝子の保有状況

鹿由来 *A. butzleri* 32 株における各病原関連遺伝子の保有率は、*cadF* は 100% (32/32)、*cj1349* は 93.8% (30/32)、*ciaB* は 100%、*mviN* は 90.6% (29/32)、*tlyA* は 93.8% (30/32)、*hecA* は 6.3% (2/32)、*hecB* は 53.1% (17/32)、*irgA* は 18.8% (6/32)、*pldA* は 93.8% (30/32) であった (表 3-11)。

猪由来 *A. butzleri* の 153 株における各病原関連遺伝子の保有率は、*cadF* が 100% (153/153)、*cj1349* が 94.8% (145/153)、*ciaB* が 100% (153/153)、*mviN* が 88.2% (135/153)、*tlyA* が 96.7% (148/153)、*hecA* が 19.0% (29/153)、*hecB* が 64.7% (99/153)、*irgA* が 79.3% (122/153)、

pldA が 93.5% (143/153) であった。また、猪由来 *A. cryaerophilus* の 6 株の病原関連遺伝子に保菌率は、*cadF* が 83.3% (5/6)、*ciaB* が 100% (6/6)、*mviN* が 33.3% (2/6)、*tlyA* が 66.7% (4/6)、*pldA* が 66.7% (4/6) で、*cj1349*、*hecA*、*hecB*、*irgA* は全ての株から検出されなかった。

鹿由来 *A. butzleri* 株は 3~8 種類、猪由来 *A. butzleri* 株は 3~9 種類、猪由来 *A. cryaerophilus* 株は 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 (表 3-12、3-13)。猪由来の 14 株 (9.2%) は、9 種類全ての病原関連遺伝子 (パターン 1)、26 株 (17.0%) は *hecA* を除く 8 遺伝子を保有していた (パターン 2)。一方、鹿由来 *A. butzleri* の 23 株および猪由来 *A. cryaerophilus* の 6 株からは、パターン 1 および 2 の株は分離されなかった。

表 3-10. わが国の野生鹿および猪における *Arcobacter* 保菌状況

地方	県	鹿		猪	
		検体数	陽性検体数 (%)	検体数	陽性検体数 (%)
東北	A	9	2 (22.2)		NT
北関東/ 甲信	B	3	0	4	0
	C	17	0		NT
南関東	D	34	1 (2.9)	26	2 (7.7)
	E	23	0	2	0
北陸	F		NT	9	1 (11.1)
	G		NT	2	0
東海	H	20	1 (5)	1	0
	I	3	0		NT
近畿	J	4	0	2	0
	K	16	3 (18.8)	4	0
中国	L		NT	2	0
	M	33	2 (6.1)	8	1 (12.5)
四国	N	45	4 (8.9)	52	10 (19.2)
	O		NT	12	2 (16.6)
九州	P		NT	7	1 (14.2)
	Q	14	0	154	40 (25.9)
	R	30	4 (13.3)	30	9 (30)
	S	2	0	6	1 (16.6)
計		253	17 (6.7)	321	67 (20.8)

NT : 未検討

表 3-11. 鹿および猪由来 *Arcobacter* 株の病原関連遺伝子の保有状況

由来 動物種	菌種 (株数)	病原関連遺伝子 保有株数(%)								
		<i>cadF</i>	<i>cj1349</i>	<i>ciaB</i>	<i>mviN</i>	<i>tlyA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>irgA</i>	<i>pldA</i>
鹿	<i>A. butzleri</i> (32 株)	100%	93.8% (30/32)	100%	90.6% (29/32)	93.8% (30/32)	6.3% (2/32)	53.1% (17/32)	18.8% (6/32)	93.8% (30/32)
猪	<i>A. butzleri</i> (153 株)	100%	94.8% (145/153)	100%	88.2% (135/153)	96.7% (148/153)	19.0% (29/153)	64.7% (99/153)	79.3% (122/153)	93.5% (143/153)
	<i>A. cryaerophilus</i> (6 株)	83.3% (5/6)	0	100%	33.3% (2/6)	66.7% (4/6)	0	0	0	66.7% (4/6)

表 3-12. 鹿および猪由来 *A. butzleri* 株の病原関連遺伝子の保有状況

保有 パターン	病原関連遺伝子									保有 遺伝子数	株数	
	<i>cadF</i>	<i>cj1349</i>	<i>ciaB</i>	<i>mviN</i>	<i>tlyA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>irgA</i>	<i>pldA</i>		鹿分 離株 (%)	猪分 離株 (%)
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	0	14 (9.2)
2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	8	0	26 (17.0)
3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	8	0	6 (3.9)
4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	2 (6.3)	4 (2.6)
5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	8	0	2 (1.3)
6	+	+	+	+	+	-	-	+	+	7	2 (6.3)	3 (2.0)
7	+	+	+	+	+	-	+	-	+	7	6 (18.8)	21 (13.7)
8	+	+	+	+	-	-	+	+	+	7	2 (6.3)	8 (5.2)
9	+	+	+	+	+	-	+	-	+	7	1 (3.1)	4 (2.6)
10	+	+	+	-	+	+	+	-	+	7	0	2 (1.3)
11	+	+	+	+	+	+	+	-	-	7	0	1 (0.7)
12	+	+	+	-	+	-	+	+	+	7	2 (6.3)	3 (2.0)
13	+	+	+	+	+	-	-	-	+	6	10 (31.3)	32 (21)
14	+	+	+	-	+	-	+	-	+	6	2 (6.3)	12 (7.8)
15	+	-	+	+	+	-	+	-	+	6	2 (6.3)	2 (1.3)
16	+	+	+	-	+	-	-	-	+	5	1 (3.1)	4 (2.6)

17	+	-	+	-	+	-	-	+	-	4	0	2 (1.3)
18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	3	2 (6.3)	3 (2.0)
19	+	-	+	-	+	-	-	-	-	3	0	4 (2.6)

表 3-13. 鹿および猪由来 *A. cryaerophilus* 株の病原関連遺伝子の保有状況

保有 パターン	病原関連遺伝子									保有 遺伝子数	株数 猪由 来株 (%)
	<i>cadF</i>	<i>cj1349</i>	<i>ciaB</i>	<i>mviN</i>	<i>tlyA</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>irgA</i>	<i>pldA</i>		
1	+	-	+	-	+	-	-	-	+	4	4 (66.7)
2	+	-	+	+	-	-	-	-	-	3	1 (16.7)
3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	2	1 (16.7)

3.4 考察

本研究では、わが国の野生鹿の 6.7% (17/253)、猪の 19.6% (63/321)が *A. butzleri* を、また、猪の 1.2% (4/321)が *A. cryaerophilus* を保菌していることを初めて明らかにした。これまでに、中東のイランや南米のブラジルでは、野生鹿および猪から *Arcobacter* 属菌が分離されている[20, 64]。わが国においても、野生鹿や猪が、*Arcobacter* 属菌の重要なキャリアーである可能性が示唆された。

今回、猪が鹿に比べ高率に *Arcobacter* 属菌を保菌していることが明らかとなった。第 2 章でも考察したように、猪の食性や泥浴びの習性が猪における *Arcobacter* 属菌の保菌率の高さに深く関与している可能性が考えられる。特に、*Arcobacter* は水中で 16 日間と長期間にわたり生残することが報告[98]されていることから、湿潤な環境が *Arcobacter* 属菌の生育と伝播に重要な役割を担っている可能性が考えられる。今後、野生動物の水飲み場やぬた場などにおいて *Arcobacter* 属菌の分布状況を検討するとともに、それらが野生鹿や猪など野生動物への伝播に関与している可能性について検討する必要がある。

本研究で分離された *Arcobacter* 株の病原関連遺伝子の保有状況は、一部の遺伝子を除いて鹿および猪分離株で類似していた。すなわち、鹿および猪分離株に共通して *cadF*、*cj1349*、*ciaB*、*mviN*、*tlyA*、*pld* は 85~100%と高率に保有されており、*hecB* の保有率は 50~65%、*hecA* の保有率は 10~30%であった。一方、*irgA* は鹿由来 *A. butzleri* 株の 18.8%が保有していたのに対し、猪由来 *A. butzleri* 株は 79.3%と有意 ($p<0.05$) に高い値で保有していた。*Vibrio cholerae* の保有す

る *irgA* は、低鉄環境下において、コレラ毒素、ノイラミニダーゼや溶血素といった細胞外分泌タンパクの産生を促進することが報告されている[34]。また、腸内細菌の保有する *irgA* は菌体内に鉄を取り込むことにより、宿主腸管内における生残性を高めていることが報告されている[77]。これにより、*Arcobacter* 属菌の保有する *irgA* も細胞外へのタンパク分泌の調整や鉄の取り込みに関与するとともに、鹿および猪における宿主特異性に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

下痢症患者由来 *Arcobacter* 株は、本研究で検討した病原関連遺伝子の 9 種類全てを、もしくは *hecA* を除く 8 種類を保有していたことから、これらの病原関連遺伝子を保有する株は、人に対して病原性を示す可能性が示されている[24]。本研究では猪由来 *A. butzleri* の 14 株 (9.2%) および、26 株 (17.0%) は、人分離株と同様のパターンの病原関連遺伝子を保有していたことから、人に対して病原性を示す可能性が示唆された。

一方、鹿および猪由来 *A. cryaerophilus* 株は、*A. butzleri* 株と同様に、*Campylobacter* 属菌の主要な接着、侵入関連遺伝子である *cadF* および *ciaB* を保有していたことから、人の腸管上皮に感染する可能性が考えられる。しかしながら、今回検討した 9 種類の病原関連遺伝子をほとんど保有していないことが明らかとなった。Doudah ら[24]も *A. cryaerophilus* 株は *A. butzleri* 株に比べると、保有する病原関連遺伝子が少ない傾向にあることを報告している。*A. butzleri* 株および *A. cryaerophilus* 株は、未だ、病原関連遺伝子の網羅的な解析はほとんど行われていない。今後、野生鹿および猪の由来 *A. butzleri* 株および *A. cryaerophilus* 株の WGS 解析を行い、両菌種における病原関連遺伝子保有状況を詳細に検討し、腸管定着性と病原性発現の関連性についても検討したい。

hecA は *Campylobacter* 属菌や *Bordetella pertussis* などが保有している遺伝子で、赤血球を凝集する機能の他に、III型分泌機構を構成し、細胞への接着や侵入に関与することから、人への下痢原性に関与する可能性が示唆されている[77]。*A. butzleri* の *hecA* も同様の機能を有している可能性が考えられているが、未だその機能は解明されていない[77]。今後、*hecA* をノックアウトした株を作製し、感染実験を行い、*hecA* の機能と病原性との関係性を明らかにしていきたい。

これまでに、わが国では、*A. butzleri* による食中毒事例は報告されていない。*Arcobacter* 属菌は微好気または好気条件で 25℃の低温下で 3 から 5 日間、培養する必要があり、培地上に発育したコロニーは透明で微小であることから、通常の食中毒発生時の検査では分離することが極めて難しく、見逃されている可能性が高い[64]。今後、食中毒事例において人 *Arcobacte* 属菌を対象とした培養も実施し、食中毒原因菌としての可能性を明らかにするとともに、わが国の野生鹿、猪ならびに、各種家畜における分布状況と分離株の詳細な病原関連遺伝子の情報を明らかにすることで *Arcobacter* 属菌による食中毒の疫学を解明していきたい。

3.5 小括

Arcobacter 属菌は、近年、新興食中毒起因菌として注目されている。様々な家畜や家禽から *Arcobacter* 属菌が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* 属菌は、9 種類の病原関連遺伝子 (*cadF*、*cj1349*、*ciaB*、*mviN*、*tlyA*、*hecA*、*hecB*、*irgA*、*pldA*) を保有し、これらの遺伝子が病原性に関与していると考えられている。本章では、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し、人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 頭の直腸便を用いて *Arcobacter* 属菌の分離を行った。分離株は 9 種類の病原関連遺伝子の保有状況を検討し、同遺伝子保有パターンから、人に対する病原性の可能性を解析した。

鹿 17 頭 (6.7%) から 32 株、猪 63 頭 (19.6%) から 153 株の *A. butzleri* が、猪 4 頭 (1.2%) から 6 株の *A. cryaerophilus* がそれぞれ分離された。わが国の野生鹿および猪は *Arcobacter* 属菌を保菌し、また、猪は鹿と比べて高率に保菌していることが初めて明らかとなった。

鹿由来 *A. butzleri* 株は、3~8 種類、猪由来 *A. butzleri* 株は 3~9 種類、猪由来 *A. cryaerophilus* 株は 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 *A. butzleri* 14 株 (9.2%) および 26 株 (17.0%) は下痢症患者由来 *A. butzleri* 株と同じく 9 つの病原関連遺伝子全てを保有するパターン 1 または *hecA* を除く 8 つの遺伝子を保有するパターン 2 であることから、人に病原性を示す可能性が示唆された。

3.6 第3章で使用した試薬類の組成

*1. Arcobacter Selective broth (ASB)

Brucella broth (BD 社)	14 g
馬脱繊維血液	25 ml
再精製水	475 ml
Piperacillin (Sigma-Aldrich 社)	37.5 mg
Cefoperazone (Sigma-Aldrich 社)	6 mg
Trimethoprim (Sigma-Aldrich 社)	10 mg
Cycloheximide (Sigma-Aldrich 社)	50 mg
95%エタノール	5 ml
滅菌再精製水	5 ml

Brucella broth と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、馬脱繊維血液とエタノールで溶解した Trimethoprim、ならびに滅菌再精製水で溶解した Piperacillin、Cefoperazone、Cycloheximide を加えた後、十分混和し、9ml ずつ滅菌小試験管に分注した。

*2. Arcobacter Selective medium (ASM)

ミューラーヒントン寒天培地 (BD 社)	19 g
馬脱纖維血液	25 ml
再精製水	465ml
Piperacillin (Sigma-Aldrich 社)	37.5 mg
Cefoperazone (Sigma-Aldrich 社)	6 mg
Trimethoprim (Sigma-Aldrich 社)	10 mg
Cycloheximide (Sigma-Aldrich 社)	50 mg
95%エタノール	5 ml
滅菌再精製水	5 ml

ミューラーヒントン寒天培地と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、馬脱纖維血液と 95%エタノールで溶解した Trimethoprim、ならびに滅菌再精製水で溶解した Piperacillin、Cefoperazone、Cycloheximide を加えた後、十分混和し、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*3. ブルセラ寒天培地

Brucella Agar (BD 社)	19 g
再精製水	500 ml

Brucella Agar と再精製水を混和し、加温溶解した後に、121°Cで 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、50°Cまで冷却し、シャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

第4章

総括

本学位論文では、野生鳥獣の食用利用機会の増加を受け、それらのリスク評価の一環として、わが国の鹿、猪における細菌性食中毒起因菌の分布状況を検討した。対象とした細菌性食中毒起因菌は、近年、新興食中毒起因菌として注目されている志賀毒素産生大腸菌 (STEC) O157、*Campylobacter* 属菌ならびに *Arcobacter* 属菌とした。さらに、得られた各種分離株について、全ゲノム (Whole-Genome Sequencing: 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、人に対する潜在的な病原性を評価した。その結果、① STEC O157 は鹿だけでなく、猪からも低率に分離されること、② 同分離株は比較的病原性は高くない可能性があること、③ 猪は、鹿に比べて高率に *Campylobacter hyointestinalis* を保菌していること、④ 同分離株は *C. jejuni*、*C. coli* を含む各種病原細菌が保有する病原関連遺伝子を保有し、人に病原性を示す可能性があること、⑤ 猪は、鹿に比べて高率に *Arcobacter butzleri* や *A. cryaerophilis* を保菌していること、⑥ 同 *A. butzleri* 株の病原関連遺伝子保有パターンから、人に病原性を示す可能性があることを明らかにした。以下、対象とした各細菌性食中毒起因菌に本研究で得られた概要を記す。

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 STEC 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。本章では、わが国に生息する野生鹿、猪における STEC 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した。さ

らに、STEC O157 を保菌していることが確認された猪の捕獲地近辺に農場があり、家畜との間で伝播した可能性が考えられたことから、当該農場で飼育されている牛からも STEC O157 を分離し、猪分離株と分子生物学的性状を比較検討することにより、猪と牛の間における本菌の伝播の可能性を検討した。

鹿 474 頭中 9 頭 (1.9%)、猪 426 頭中 3 頭 (0.7%) から STEC 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 株と同様に 20 種類、27～29 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、鹿分離株は 5 パターンに分かれた。M 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。H 県で異なる時期に分離した鹿由来 2 株は、類似したパターンを示した。猪分離株は全て異なるパターンに分類され、そのうち 1 株は、牛分離株と同一パターンであった。

以上の成績から、わが国の鹿および猪は、低率ながら STEC O157 を保菌していることを明らかにした。鹿、猪分離株はいずれも水様性下痢を呈する患者分離株が含まれる 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 STEC O157 株が鹿および猪に分布し

ていること、M 県では同一株が分布していること、H 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 STEC 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* subsp. *hyointestinalis* (*C. hyointestinalis*) が高率に分離されることが報告されている。近年、*C. hyointestinalis* は、下痢症患者からも分離されていることから、本菌は新たな人獣共通感染症起因菌として注目されている。本章では、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、ならびに人腸管上皮細胞株 (Caco-2) を用いた感染試験により、*C. hyointestinalis* 株の人に対する潜在的な病原性を検討した。

鹿 253 頭中 7 頭 (2.8%) から 23 株、猪 321 頭中 71 頭 (22.1%) から 194 株の *C. hyointestinalis* が分離された。全ての検体から *C. jejuni* や *C. coli* 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 *C. hyointestinalis* 株から、*C. jejuni* や *C. coli* 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 *C. hyointestinalis* 株から検出されなかった。一方、18D42-2 株および 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、ATCC35217^T 株を含む全ての *C. hyointestinalis* 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、ATCC35217^T 株の接着率 (3.8%) は、*C. jejuni* NCTC11351^T 株 (2.3%) に比べ有意 ($p<0.05$) に高値を示した。一方、鹿、猪由来 *C. hyointestinalis* 株の Caco-2 細胞侵入率は 0.04~0.05%、ATCC35217^T 株および NCTC11351^T 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、一部の鹿、猪由来 *C. hyointestinalis* 株間で有意差 ($p<0.05$) が認められた。

以上の成績から、わが国の鹿および猪には *C. hyointestinalis* 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 *C. hyointestinalis* 株は *C. jejuni* および *C. coli* 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、運動性や人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 *C. hyointestinalis* は人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 属菌は、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。*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 *A. butzleri* 株は 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。本章では、わが国に生息する鹿、猪における *Arcobacter* 属菌の保菌状況を検討するとともに、分離株の病原関連遺伝子の保有状況を解析することで、人に対する潜在的な病原性を評価した。

鹿 253 頭中 17 頭 (6.7%) から 32 株、猪 321 頭中 63 頭 (19.6%) から 153 株の *A. butzleri* が、猪 4 頭 (1.2%) から 6 株の *A. cryaerophilus* がそれぞれ分離された。鹿由来 *A. butzleri* 株は、3～8 種類、猪由来 *A. butzleri* 株は 3～9 種類、猪由来 *A. cryaerophilus* 株は 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 *A. butzleri* 14 株 (9.2%) はパターン 1、猪由来 *A. butzleri* 26 株 (17.0%) はパターン 2 であった。

以上の成績から、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分離株は、下痢症患者分離株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、人に病原性を示す可能性が示された。

以上 4 章からなる本研究により、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。厚生労働省は、野生鳥獣肉による食中毒の発生を防止するため、「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針 (ガイドライン)」を作成し、衛生的な野生鳥獣の解体処理法を示している。野生鳥獣の解体作業者は、糞便や消化管内容物から枝肉への二次汚染を可能

な限り減らすため、上記ガイドラインで示された衛生的な解体処理技術を習得することが重要である。また、枝肉から食肉加工する際には、食肉からまな板やナイフ等の器具を介した二次汚染防止対策を講ずる必要がある。さらに、消費者には、確実な衛生対策と加熱調理を行うことが求められる。本研究の結果は、野生鳥獣肉の加工、流通に至る一連の工程に携わる人や消費者へ、野生鳥獣肉の食中毒リスクを啓発し、予防対策を講ずるための有益な情報となることが期待される。

引用文献

- [1] Agüero, M.E., Aron, L., DeLuca, A.G., Timmis, K.N. and Cabello, F.C. 1984. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect. Immun.* **46**: 740-746.
- [2] Asai, T., Usui, M., Sugiyama, M., Izumi, K., Ikeda, T. and Andoh, M. 2020. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates obtained from wild mammals between 2013 and 2017 in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **82**: 345-349.
- [3] Asakura, H., Ikeda, T., Yamamoto, S., Kabeya, H., Sugiyama, H. and Takai, S. 2017. Draft genome sequence of five shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from wild deer in Japan. *Genome. Announc.* **5** : e01455-16
- [4] Asakura, M., Samosornsuk, W., Taguchi, M., Kobayashi, K., Misawa, N., Kusumoto, M., Nishimura, K., Matsuhisa, A. and Yamasaki, S. 2007. Comparative analysis of cytolethal distending toxin(*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.* **42**: 174-183.
- [5] Ateba, C.N. and Bezuidenhout, C.C. 2008. Characterisation of *Escherichia coli* O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. *Int. J. Food. Microbiol.* **128**: 181-188.
- [6] Bastyns, K., Cartuyvels, D., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H. and De Wachter, R 1995. A Variable 23S rDNA Region is a Useful discriminating target for genus-specific and species-specific PCR amplification in *Arcobacter* species. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 353–356.

- [7] BfR. 2007. *Arcobacter* spp. in rohem Fleisch kann beim Menschen Lebensmittel-infektionen auslösen.
- [8] Bolton, D.J. 2005. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol.* **48**: 99-108.
- [9] Bracke, M.B.M. 2011. Review of wallowing in pigs: Description of the behaviour and its motivational basis. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **132**: 1–13.
- [10] Brown, P.E., Christensen, O.F., Clough, H.E., Diggle, P.J., Hart, C.A., Hazel, S., Kemp, R., Leatherbarrow, A.J., Moore, A., Sutherst, J., Turner, J., Williams, N.J., Wright, E.J. and French, N.P. 2004. Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6501-6511.
- [11] Browne, A.S., Biggs, P.J., Elliott, A., Jaros, P., French, N.P. and Midwinter, A.C. 2018. Draft whole-genome sequences of three diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from farmed deer in New Zealand. *Genome. Announc.* **6**: e00300-18
- [12] Bullman, S., O'Leary, J., Corcoran, D., Sleator, R.D. and Lucey, B. 2012. Molecular-based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis. *Epidemiol. Infect.* **140**: 684-688.
- [13] Busato, A., Hofer, D., Lentze, T., Gaillard, C. and Burnens, A. 1999. Prevalence and infection risks of zoonotic enteropathogenic bacteria in Swiss cow-calf farms. *Vet. Microbiol.* **69**: 251-263.
- [14] Carbonero, A., Paniagua, J., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Borge, C. and Garcia-Bocanegra, I. 2014. *Campylobacter* infection in wild artiodactyl species from southern Spain: occurrence, risk factors and antimicrobial susceptibility.

Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **37**: 115-121.

- [15] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). 2017. Standard operating procedure for pulsenet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*.
- [16] Cepeda-Molero, M., Berger, C.N., Walsham, A.D.S., Ellis, S.J., Wemyss- Holden, S., Schuller, S., Frankel, G. and Fernandez, L.A. 2017. Attaching and effacing(A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. *PLoS. Pathog.* **13**: e1006706.
- [17] Chen, Y., Mukherjee, S., Hoffmann, M., Kotewicz, M.L., Young, S., Abbott, J., Luo, Y., Davidson, M.K., Allard, M., McDermott, P. and Zhao, S. 2013. Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **57**: 5398-5405.
- [18] Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E. and Gross, U. 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**: 205-211.
- [19] Day, M., Doumith, M., Jenkins, C., Dallman, T.J., Hopkins, K.L., Elson, R., Godbole, G. and Woodford, N. 2017. Antimicrobial resistance in shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 isolated from human cases of diarrhoeal disease in England, 2015. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**: 145-152.
- [20] de Oliveria, S.J., Wesley, I.V., Baetz, A.L., Harmon, K.M., Kader, II and de Uzeda, M. 1999. *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter butzleri* isolated

- from preputial fluid of boars and fattening pigs in Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**: 462-464.
- [21] Diaz-Sanchez, S., Sanchez, S., Herrera-Leon, S., Porrero, C., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, J.E., Mora, A., Mateo, R., Hanning, I. and Vidal, D. 2012. Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in large game animals intended for consumption: relationship with management practices and livestock influence. *Vet. Microbiol.* **163**: 274-281.
- [22] Diker, K.S., Diker, S. and Ozlem, M.B. 1990. Bovine diarrhea associated with *Campylobacter hyointestinalis*. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* **37**: 158-160.
- [23] Douellou, T., Delannoy, S., Ganet, S., Mariani-Kurkdjian, P., Fach, P., Loukiadis, E., Montel, M. and Thevenot-Sergentet, D. 2016. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products - Genetic diversity and virulence gene profiles. *Int. J. Food Microbiol.* **232**: 52-62.
- [24] Doudah, L., de Zutter, L., Bare, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., Van den Abeele, A.M. and Houf, K. 2011. Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* **50**: 735-741.
- [25] Dunn, J.R., Keen, J.E., Moreland, D. and Alex, T. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana. *J. Wildl. Dis.* **40**: 361-365.
- [26] Ellis, W.A., Neill, S.D., O'Brien, J.J., Ferguson, H.W. and Hanna, J. 1977. Isolation of spirillum/*Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Vet. Rec.* **100**:

451-452.

- [27] Fennell, C.L., Rompalo, A.M., Totten, P.A., Bruch, K.L., Flores, B.M. and Stamm, W.E. 1986. Isolation of "*Campylobacter hyointestinalis*" from a human. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 146-148.
- [28] Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W.L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. and Karch, H. 2002. *Escherichia coli* harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* **185**: 74-84.
- [29] Fukushima, H., Hashizume, T., Morita, Y., Tanaka, J., Azuma, K., Mizumoto, Y., Kaneno, M., Matsuura, M., Konma, K. and Kitani, T. 1999. Clinical experiences in Sakai city hospital during the massive outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai city, 1996. *Pediatr. Int.* **41**: 213-217.
- [30] Gaytan, M.O., Martinez-Santos, V.I., Soto, E. and Gonzalez-Pedrajo, B. 2016. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6**: 129.
- [31] Gebhart, C.J., Ward, G.E., Chang, K. and Kurtz, H.J. 1983. *Campylobacter hyointestinalis*(new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 361-367.
- [32] Giacoboni, G.I., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, E. and Mitsuoka, T. 1993. Comparison of fecal *Campylobacter* in calves and cattle of different ages and areas in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **55**: 555-559.
- [33] Giacomelli, M., Follador, N., Coppola, L.M., Martini, M. and Piccirillo, A.

2015. Survey of *Campylobacter* spp. in owned and unowned dogs and cats in Northern Italy. *Vet. J.* **204**: 333-337.
- [34] Goldberg, M.B., DiRita, V.J. and Calderwood, S.B. 1990. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using TnpHoA mutagenesis. *Infect. Immun.* **58**: 55-60.
- [35] Gonzalez, J., Sanso, A.M., Cadona, J.S. and Bustamante, A.V. 2017. Virulence traits and different *nle* profiles in cattle and human verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains from Argentina. *Microb. Pathog.* **102**: 102-108.
- [36] Gorkiewicz, G., Feierl, G., Zechner, R. and Zechner, E.L. 2002. Transmission of *Campylobacter hyointestinalis* from a pig to a human. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2601-2605.
- [37] Grau, F.H. 1988. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis* in the intestinal tract and on the carcasses of calves and cattle. *J. Food. Prot.* **51**: 857-861.
- [38] Gruenheid, S., Sekirov, I., Thomas, N.A., Deng, W., O'Donnell, P., Goode, D., Li, Y., Frey, E.A., Brown, N.F., Metalnikov, P., Pawson, T., Ashman, K. and Finlay, B.B. 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **51**: 1233-1249.
- [39] Guerry, P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol.* **15**: 456-461.
- [40] Guerry, P., Alm, R.A., Power, M.E., Logan, S.M. and Trust, T.J. 1991. Role

- of two flagellin genes in *Campylobacter* motility. *J. Bacteriol.* **173**: 4757-4764.
- [41] Gwimi, P.B., Faleke, O. O., Salihu, M. D., Magaji, A. A., Abubakar, M. B., Nwankwo, I. O. and Ibitoye, E. B. 2015. Prevalence of *Campylobacter* species in fecal samples of pigs and humans from Zuru Kebbi State, Nigeria. *Int. J. One Heal.* **1**: 1–15.
- [42] Hakkinen, M., Heiska, H. and Hanninen, M.L. 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3232-3238.
- [43] Hanninen, M.L., Sarelli, L., Sukura, A., On, S.L., Harrington, C.S., Matero, P. and Hirvela-Koski, V. 2002. *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, a common *Campylobacter* species in reindeer. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 717-723.
- [44] Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M. and Shinagawa, H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* **8**: 11-22.
- [45] Hedberg, C.W., Savarino, S.J., Besser, J.M., Paulus, C.J., Thelen, V.M., Myers, L.J., Cameron, D.N., Barrett, T.J., Kaper, J.B. and Osterholm, M.T. 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM,

- an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* **176**: 1625-1628.
- [46] Herman, L., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Vandekerchove, D., Rollier, I. and De Zutter, L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect.* **131**: 1169-1180.
- [47] Hill, B.D., Thomas, R.J. and Mackenzie, A.R. 1987. *Campylobacter hyointestinalis*-associated enteritis in Moluccan rusa deer (*Cervus timorensis* subsp. *Moluccensis*). *J. Comp. Pathol.* **97**: 687-694.
- [48] Hirai, S., Yokoyama, E. and Yamamoto, T. 2013. Linkage disequilibrium of the IS629 insertion among different clades of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7/H-strains. *Infect. Genet. Evol.* **18**: 94-99.
- [49] Hsu, T.T. and Lee, J. 2015. Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses Public Health* **62**: 579-589.
- [50] ICMSF 2002. Microorganisms in Foods 7, Microbiological testing in food safety management. New York: Kluwer academic/plenum publisher. 171
- [51] Inglis, G.D., Morck, D.W., McAllister, T.A., Entz, T., Olson, M.E., Yanke, L.J. and Read, R.R. 2006. Temporal prevalence of antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. from beef cattle in Alberta feedlots. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4088-4095.
- [52] Inglis, G.K., LD. 2003. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3435-3447.
- [53] Janoska, F., Farkas, A., Marosan, M., and Fodor, J.T. 2018. Wild boar (*Sus*

scrofa) home range and habitat use in two romanian habitats. *Acta Silv. Lign. Hung.* **14**: 51-63.

- [54] Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D. and Kaper, J.B. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **87**: 7839-7843.
- [55] Johnson, T.J., Wannemuehler, Y.M. and Nolan, L.K. 2008. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2360-2369.
- [56] Johnson, W.M. and Lior, H. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* **4**: 115-126.
- [57] Kaakoush, N.O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H.M. and Man, S.M. 2015. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**: 687-720.
- [58] Kabeya, H., Kobayashi, Y., Maruyama, S. and Mikami, T. 2003. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 163-168.
- [59] Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Kubo, M., Yamamoto, K., Arai, S., Izumi, T., Kobayashi, Y., Katsube, Y. and Mikami, T. 2003. Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Vet. Microbiol.* **93**: 153-158.
- [60] Kamei, K., Hatanaka, N., Asakura, M., Somroop, S., Samosornsuk, W., Hinenoya, A., Misawa, N., Nakagawa, S. and Yamasaki, S. 2015 *Campylobacter hyointestinalis* isolated from pigs produces multiple variants of biologically active cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **83**: 4304-

4313.

- [61] Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. and Kaper, J.B. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4930-4940.
- [62] Karmali, M.A., Petric, M. and Bielaszewska, M. 1999. Evaluation of a microplate latex agglutination method (Verotox-F assay) for detecting and characterizing verotoxins (Shiga toxins) in *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 396-399.
- [63] Kemper, N., Aschfalk, A. and Holler, C. 2006. *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., and *Cryptosporidium* oocysts in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Northern Finland and Norway. *Acta. Vet. Scand.* **48**: 7-16
- [64] Khoshbakht, R., Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H. and Shayegh, H. 2015. Distribution of *Salmonella*, *Arcobacter*, and thermophilic *Campylobacter* spp. among persian fallow deer (*Dama mesopotamica*) population in Dasht-e-Arzhan wildlife refuge, southern Iran. *Comp. Clin. Path.* **24**: 777-781..
- [65] Kiehlbauch, J.A., Brenner, D.J., Nicholson, M.A., Baker, C.N., Patton, C.M., Steigerwalt, A.G. and Wachsmuth, I.K. 1991. *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 376-385.
- [66] 国立感染症研究所, 2017. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル

ル

- [67] 国立感染症研究所, 2021. 腸管出血性感染症 2021年3月. *IASR*. **42**: 87-89
- [68] 厚生労働省, 医薬、生活衛生局食品監視安全課通知. 「野生鳥獣肉による食中毒防止の徹底について(令和元年 薬生食環監発1220第2号)」 令和元年12月20日
- [69] Lagesen, K., Hallin, P., Rodland, E.A., Staerfeldt, H.H., Rognes, T. and Ussery, D.W. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic. Acids. Res.* **35**: 3100-3108.
- [70] Laprade, N., Cloutier, M., Lapen, D.R., Topp, E., Wilkes, G., Villemur, R. and Khan, I.U. 2016. Detection of virulence, antibiotic resistance and toxin (VAT) genes in *Campylobacter* species using newly developed multiplex PCR assays. *J. Microbiol. Methods*. **124**: 41-47.
- [71] Lillehaug, A., Bergsjø, B., Schau, J., Bruheim, T., Vikoren, T. and Handeland, K. 2005. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta. Vet. Scand.* **46**: 23-32.
- [72] Logan, E.F., Neill, S.D. and Mackie, D.P. 1982. Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *campylobacter*. *Vet. Rec.* **110**: 229-230.
- [73] Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C.H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C.G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S. and Shinagawa, H. 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak.

DNA Res. **5**: 1-9.

- [74] Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Ouellette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S.E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D. and Whittam, T.S. 2008. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**: 4868-4873.
- [75] Marroki, A., Leila, B. 2019. *Campylobacter* in poultry: species emergence, pathogenesis and antibiotic-resistance prevalence. *approaches poultry, Dairy Vet. Sci.* **5**: 479-489.
- [76] Meerburg, B.G., Jacobs-Reitsma, W.F., Wagenaar, J.A. and Kijlstra, A. 2006. Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 960-962.
- [77] Miller, W.G., Parker, C.T., Rubenfield, M., Mendz, G.L., Wosten, M.M., Ussery, D.W., Stolz, J.F., Binnewies, T.T., Hallin, P.F., Wang, G., Malek, J.A., Rogosin, A., Stanker, L.H. and Mandrell, R.E. 2007. The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS. One.* **2**: e1358.
- [78] Miller, W.G., Yee, E. and Chapman, M.H. 2016. Complete genome sequences of *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* strain LMG 9260 and *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii* strain LMG 15993. *Genome. Announc.* **4**: 665–681.
- [79] Minet, J., Grosbois, B. and Megraud, F. 1988. *Campylobacter hyointestinalis*: an opportunistic enteropathogen? *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2659-2660.

- [80] Mora, A., Lopez, C., Dhabi, G., Lopez-Beceiro, A.M., Fidalgo, L.E., Diaz, E.A., Martinez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J.E., Blanco, M. and Blanco, J. 2012. Seropathotypes, phylogroups, Stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2578-2585.
- [81] 森田幸雄, 壁谷英則, 石岡大成, 阪脇廣美, 長井章, 鈴木宣夫, 中林良雄, 丸山総一. 2003. 家畜および市販ひき肉における *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella* の分布状況. *日本獣医公衆衛生学会誌*. **57**: 393-397.
- [82] Mughini Gras, L., Smid, J.H., Wagenaar, J.A., Koene, M.G., Havelaar, A.H., Friesema, I.H., French, N.P., Flemming, C., Galson, J.D., Graziani, C., Busani, L. and W, V.A.N.P. 2013. Increased risk for *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infection of pet origin in dog owners and evidence for genetic association between strains causing infection in humans and their pets. *Epidemiol. Infect.* **141**: 2526-2535.
- [83] Nagano, H., Hirochi, T., Fujita, K., Wakamori, Y., Takeshi, K. and Yano, S. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of beta-D-glucuronidase-positive shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. *J. Med. Microbiol.* **53**: 1037-1043.
- [84] Nataro, J.P. and Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
- [85] Navarro-Gonzalez, N., Porrero, M.C., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos,

- A., Cabal, A., Dominguez, L. and Lavin, S. 2015. *Escherichia coli* O157:H7 in wild boars (*Sus scrofa*) and Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sharing pastures with free-ranging livestock in a natural environment in Spain. *Vet. Q.* **35**: 102-106.
- [86] 農林水産省. 2016. 農林水産省が優先的にリスク管理を行う有害微生物についてのアンケート及び情報・意見募集結果
- [87] 農林水産省. 2016b. 平成28年度リスク管理検討会(第2回)配付資料
- [88] 大谷勝実. 1997. 鹿肉の生食による腸管出血性大腸菌(O157:H7)感染事例について—山形県. *病原微生物検出情報* **18**: 84.
- [89] Oporto, B. and Hurtado, A. 2011. Emerging thermotolerant *Campylobacter* species in healthy ruminants and swine. *Foodborne. Pathog. Dis.* **8**: 807-813.
- [90] Palyada, K., Threadgill, D. and Stintzi, A. 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **186**: 4714-4729.
- [91] Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S. and Barrell, B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* **403**: 665-668.
- [92] Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman,

- T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. and Blattner, F.R. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. **409**: 529-533.
- [93] Pezzotti, G., Serafin, A., Luzzi, I., Mioni, R., Milan, M. and Perin, R. 2003. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int. J. Food. Microbiol.* **82**: 281-287.
- [94] Ramees, T.P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R.S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y.S. and Singh, R.K. 2017. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control - a comprehensive review. *Vet. Q.* **37**: 136-161.
- [95] Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. and Swerdlow, D.L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 603-609.
- [96] Rani, A., Ravindran, V.B., Surapaneni, A., Mantri, N. and Ball, A.S. 2021. Review: Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. *Int. J. Food. Microbiol.* **349**: 109233.
- [97] Rapp, D.a.R., C. M. 2012. Prevalence of six *campylobacter* species in a New Zealand dairy goat herd. *New Zeal. J. Agric. Res.* **55**: 235–240.
- [98] Rice, E.W., Rodgers, M.R., Wesley, I.V., Johnson, C.H. and Tanner, S.A. 1999. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**: 31-35.

- [99] Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. and Cohen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **308**: 681-685.
- [100] Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J. and Nolan, L.K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet. Res.* **36**: 241-256.
- [101] Salihu, M.D., Abdulkadir, J.U., Oboegbulem, S.I., Egwu, G.O., Magaji, A.A., Lawal, M. and Hassan, Y. 2009. Isolation and prevalence of *Campylobacter* species in cattle from Sokoto state, Nigeria. *Vet. Ital.* **45**: 501-505.
- [102] Samosornsuk, W., Asakura, M., Yoshida, E., Taguchi, T., Eampokalap, B., Chaicumpa, W. and Yamasaki, S. 2015. Isolation and characterization of *Campylobacter* Strains from diarrheal patients in central and suburban Bangkok, Thailand. *Jpn. J. Infect. Dis.* **68**: 209-215.
- [103] Sanchez, S., Martinez, R., Garcia, A., Vidal, D., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Herrera-Leon, S., Echeita, A., Alonso, J.M. and Rey, J. 2010. Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Vet. Microbiol.* **143**: 420-423.
- [104] Sanchez, S., Martinez, R., Rey, J., Garcia, A., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Herrera-Leon, S., Echeita, A. and Alonso, J.M. 2010. Phenotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet. Microbiol.* **142**: 445-449.
- [105] Sargeant, J.M., Hafer, D.J., Gillespie, J.R., Oberst, R.D. and Flood, S.J. 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer sharing

- rangeland with cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **215**: 792-794.
- [106] Sasaki, Y., Goshima, T., Mori, T., Murakami, M., Haruna, M., Ito, K. and Yamada, Y. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Foodborne. Pathog. Dis.* **10**: 985-991.
- [107] Schweitzer, N., Damjanova, I., Kaszanyitzky, E., Ursu, K., Samu, P., Toth, A.G., Varga, J. and Dan, A. 2011. Molecular characterization of *Campylobacter lanienae* strains isolated from food-producing animals. *Foodborne. Pathog. Dis.* **8**: 615-621.
- [108] Scullion, R., Harrington, C.S. and Madden, R.H. 2006. Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland. *J. Food. Prot.* **69**: 1986-1990.
- [109] Singh, P., Sha, Q., Lacher, D.W., Del Valle, J., Mosci, R.E., Moore, J.A., Scribner, K.T. and Manning, S.D. 2015. Characterization of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**: 29.
- [110] Stanley, K.N., Wallace, J.S., Currie, J.E., Diggle, P.J. and Jones, K. 1998. Seasonal variation of thermophilic campylobacters in lambs at slaughter. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1111-1116.
- [111] Taylor, D.N., Kiehlbauch, J.A., Tee, W., Pitarangsi, C. and Echeverria, P. 1991. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea. *J. Infect. Dis.* **163**: 1062-1067.
- [112] Terzolo, H.R. 1988. Identification of *campylobacters* from bovine and ovine

- faeces. *Rev. Argent. Microbiol.* **20**: 53-68.
- [113] 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. and Chuma, T. 2020. Surveillance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Campylobacter* spp. in wild Japanese deer (*Cervus nippon*) and boar (*Sus scrofa*). *J. Vet. Med. Sci.* **82**: 1287-1294.
- [114] Van Donkersgoed, J., Janzen, E., Chirino-Trejo, M. and Dunn, C. 1990. Saskatchewan. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in pronghorns and mule deer in southern Saskatchewan. *Can. Vet. J.* **31**: 302-303.
- [115] Vandamme, P., Giesendorf, B.A., van Belkum, A., Pierard, D., Lauwers, S., Kersters, K., Butzler, J.P., Goossens, H. and Quint, W.G. 1993. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 3317-3319.
- [116] Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J.P. and Vandamme, P. 2004. *Arcobacter* species in humans. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 1863-1867.
- [117] Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J.P. and Dediste, A. 2006. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 908-913.
- [118] Wahlstrom, H., Tysen, E., Olsson Engvall, E., Brandstrom, B., Eriksson, E.,

- Morner, T. and Vagsholm, I. 2003. Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. *Vet. Rec.* **153**: 74-80.
- [119] Wang, G., Clark, C.G. and Rodgers, F.G. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3613-3619.
- [120] Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L. and Rodgers, F.G. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4744-4747.
- [121] Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M. and van der Zeijst, B.A. 1991. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. *Embo. J.* **10**: 2055-2061.
- [122] Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 577-585.
- [123] Wilkinson, D.A., O'Donnell, A.J., Akhter, R.N., Fayaz, A., Mack, H.J., Rogers, L.E., Biggs, P.J., French, N.P. and Midwinter, A.C. 2018. Updating the genomic taxonomy and epidemiology of *Campylobacter hyointestinalis*. *Sci. Rep.* **8**: 2393.
- [124] Wysok, B., Wojtacka, J. and Kivisto, R. 2020. Pathogenicity of *Campylobacter* strains of poultry and human origin from Poland. *Int. J. Food. Microbiol.* **334**: 108830.

- [125] Xiong, L., Korkhin, Y. and Mankin, A.S. 2005. Binding site of the bridged macrolides in the *Escherichia coli* ribosome. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **49**: 281-288.
- [126] Yamasaki, S.A., M. Tsukamoto, T. Faruque, SM. Deb, Rt Ramamurthy, T. 2006 Cytolethal distending toxin (CDT): genetic diversity, structure and role in diarrheal disease. *Tox. Rev.* **25**: 61-88.
- [127] Yang, Z., Kovar, J., Kim, J., Nietfeldt, J., Smith, D.R., Moxley, R.A., Olson, M.E., Fey, P.D. and Benson, A.K. 2004. Identification of common subpopulations of non-sorbitol-fermenting, beta-glucuronidase-negative *Escherichia coli* O157:H7 from bovine production environments and human clinical samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6846-6854.
- [128] Yokoyama, E., Hashimoto, R., Etoh, Y., Ichihara, S., Horikawa, K. and Uchimura, M. 2011. Biased distribution of IS629 among strains in different lineages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serovar O157. *Infect. Genet. Evol.* **11**: 78-82.
- [129] 依田清江,内村真佐子,村田正太,土岐朋子,土岐朋. 敗血症の起因菌として *Arcobacter butzleri* を分離・同定した1例—日本で初めてのヒトからの *Arcobacter butzleri* 検出例 (Vol.27 p 15-16:2006年1月号)
- [130] Yokoyama, E., Hirai, S., Hashimoto, R. and Uchimura, M. 2012. Clade analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7/H- strains and hierarchy of their phylogenetic relationships. *Infect. Genet. Evol.* **12**: 1724-1728.
- [131] Zhang, Y., Laing, C., Steele, M., Ziebell, K., Johnson, R., Benson, A.K.,

Taboada, E. and Gannon, V.P. 2007. Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC. Genomics*. **8**: 121.

- [132] Zheng, J., Meng, J., Zhao, S., Singh, R. and Song, W. 2006. Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products. *J. Food. Prot.* **69**: 768-774.