

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08087

研究課題名(和文)全ゲノムシーケンス解析を応用した鹿由来志賀毒素産生大腸菌のリスク評価

研究課題名(英文) Application of whole genome sequence analysis for the risk assessment of Shiga Toxin producing Escherichia coli derived from deer

研究代表者

壁谷 英則 (KABEYA, Hidenori)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10318389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鹿や猪における志賀毒素産生大腸菌(STEC)の分布状況を検討し、分離株について全ゲノムシーケンス解析により病原性を評価した。鹿の11.0%(70/639頭)、猪の3.3%(16/487頭)からSTECが、鹿の1.1%(7頭)、猪の0.6%(3頭)から0157が分離された。全ゲノム解析では、0157で5,294,527bp～5,498,450bp、non0157 STECでは3,769,174～4,961,358bpの塩基配列が決定され、0157では20～22個、05_026では21個、083で5個、0104で13個の病原関連遺伝子が検出されたことから、人への病原性を示す可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、我が国の野生鹿、猪においても、比較的高率にSTECが、低率ながら0157 STECも分布することが明らかとなった。従来の一義的なSTEC病原性評価に対し、全ゲノム解析による網羅的なゲノム解析法を用いた総合的解析法を応用することにより、鹿、猪由来STECは人の患者由来株同様に、強い病原性を示す可能性が示唆された。また、マイナーな血清型のSTECにおいても全ゲノム解析を実施し、一部は人に病原性を示す可能性が明らかとなった。本研究成果は、鹿肉の食用利用において貴重な基礎データとして活用でき、将来的には普段の一般的な食卓においても、安全・安心な鹿肉の活用に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)： We examined the prevalence of Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC) among wild deer and wild boar in Japan and evaluated the pathogenicity of the isolates by whole genome sequence analysis.

STEC was isolated from 11.0% of deer (70/639) and 3.3% (16/487) of the wild boars. Of them, 0157 STEC was isolated from 1.1% (7) of deer and 0.6% (3) of wild boars. Whole genome sequence analysis determined the nucleotide sequences of 5,294,527bp - 5,498,450bp of the 0157 strains and 3,769,174 - 4,961,358bp of the non-0157 STEC strains, and detected 20-22, 21, 5 and 13 pathogenicity-related genes from the 0157, 05 and 083 and 0104 STEC strains, respectively. These results indicate the possibility of the strains to show pathogenicity to humans.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：志賀毒素産生大腸菌 0157 鹿 猪 全ゲノム解析 病原遺伝子 ジビエ 食品衛生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在わが国では一部の野生動物の生息数が増加し大きな社会問題となっている。このため積極的な管理捕獲や狩猟が進められている。これに伴い、捕獲した鹿や猪の肉を食用に利用する機会が増えているが、鹿、猪由来の各種人獣共通感染症に関するリスク評価ならびにリスク管理は、必ずしも十分行われていない。

鹿や猪における志賀毒素産生大腸菌 (STEC) の分布状況に関する報告は、特にここ数年間で、欧米から盛んに報告されている。米国、スペイン、ベルギーの各種野生鹿を対象とした調査では、O157 STEC の保菌率は、0~2.4%と牛に比べて低い。米国では、肥育牛と野生鹿との間で STEC が伝播する可能性が報告されている。一方、わが国の鹿については、申請者らの研究により、(1) O157 STEC 保菌率は全体で 2.5% (9/323) であること、(2) 鹿は血清型 O157 以外の STEC (non-O157 STEC) を高率 (21.0%) に保菌していること、(3) 一部の鹿由来 non-O157 STEC 分離株 (O5 STEC など) は、病原関連遺伝子保有パターンの解析から、人への病原性を示す可能性があることを明らかにした。実際に、国内外で野生鹿由来 STEC による集団食中毒事例も報告されており、野生動物肉を原因とする STEC に対する対策は急務の課題である。

STEC を含む大腸菌のリスク評価には、菌の検出のみならず分離株の病原性評価が重要である。STEC の病原性評価には、血清型別や系統型別、および志賀毒素産生能や腸管上皮細胞への接着能など各種病原因子の有無などによって行う。しかし鹿由来 STEC は、これまでに報告の少ないマイナーな血清型が多く含まれ、既存の方法では型別が困難である。さらに各種病原因子単独の役割に関する報告はあるが、それらを組み合わせた総合的な病原性評価が行われていない。これまでに申請者は、24 種類の病原関連遺伝子保有パターンを総合的に解析する PCR-binary typing system (P-BIT) を開発し、鹿由来 non-O157 STEC 分離株に応用している。

次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンシング (Whole-genome sequencing; WGS) 解析による網羅的なゲノム解析は STEC を含む各種病原細菌の病原性解析、あるいは系統解析に応用されている。しかしながら、鹿や猪由来 STEC 分離株については、全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、我が国の鹿、および猪を対象として、STEC、ならびに O157 STEC の分布状況を検討する。さらに、得られた鹿および猪由来 STEC 分離株について WGS 解析を行い、得られたデータを用いて、(1) *in silico* serotyping、(2) 網羅的病原関連遺伝子の検索を行い、病原性を評価する。さらに、(3) 特に肥育牛と鹿や猪との間で STEC が伝播する可能性を検討するため、牧場とその周辺で鹿あるいは猪が捕獲される地域を選定し、当該地域における牛、ならびに野生鹿あるいは猪由来 STEC を分離し、比較ゲノム解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 検体の収集：

2013年9月から2020年3月にかけて、23府県の鹿639頭、19府県の猪487頭の直腸便を供試した。各地域の野生鳥獣処理施設等の協力の下、各地域で捕獲された野生鹿、および猪から糞便を採取した。さらに、我が国の牧場周辺で捕獲された野生鹿や猪と肥育牛を対象とし、鹿、猪ならびに肥育牛の糞便を採取した。

(2) STEC の分離培養、生化学性状解析：

STEC の分離は、糞便 1 白金耳量を直接マッコンキー培地摂取して、37℃、24 時間培養した。STEC を疑うコロニーを回収し、PCR により *stx* 遺伝子が陽性が確認されたものを STEC とした。O157 STEC の分離は、糞便 0.5g 量を 4.5mL のノボピオシン加 mEC 培地に接種して 42℃ で 18 時間増菌培養後、クロモアガー O157 培地、CT-SMAC 培地に塗抹し 37℃、24 時間培養した。各培地上的 O157 STEC を疑うコロニーを回収し、PCR により *stx* 遺伝子が陽性かつ *rfbE* O157 遺伝子を保有し、O157 スライドラテックス凝集反応で陽性となった株を O157 と同定した。

(3) 系統解析：

O157 STEC 分離株についてはパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析、LSPA-6 解析、ARMS-PCR 解析による系統解析を行った。

(4) STEC 分離株の WGS 解析：

鹿、および猪由来 O157 STEC、ならびに non-O157 STEC 各分離株について、PFGE 解析を実施し、分離株の型別を行い、WGS 解析に用いる分離株を選定した。選択した鹿、および猪由来 STEC 分離株について、次世代シーケンサーにより WGS 解析を行った。

(5) WGS データの解析：

WGS 解析により得られたデータを用いて、Center for Genomic Epidemiology (SerotypeFinder 1.1、VirulenceFinder 1.5、ならびに rResfinder 2.1) 等を活用し、各種 *in silico* 解析を行った。

4. 研究成果

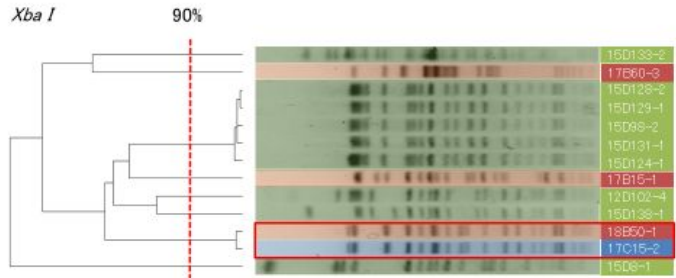
(1) 我が国の野生鹿、および猪における STEC、および O157 STEC の保菌状況：

本研究では、鹿の 11.0% (70/639 頭) 猪の 3.3% (16/487 頭) から STEC が分離された。また、鹿の 1.1% (7/639 頭) 猪の 0.6% (3/487 頭) から O157 STEC が分離された。

(2) O157 STEC が分離された猪の由来に関する検討：

O157 STEC を保菌する猪の捕獲地付近の農場 A の牛 1 頭からも O157 が 1 株分離された。各分離株(鹿由来 9 株、猪由来 3 株、牛由来 1 株)を PFGE 解析した結果、鹿由来株は 5 パターン、猪由来株は全て異なるパターンを示した(右図)。このうち 1 株は、牛由来 1 株と一致した。猪の捕獲地と農場 A は、直線距離で 2km と近接し、十分に農場内に侵入可能であることから、今回分離された猪と牛の間で O157 STEC が伝播した可能性が示唆された。

鹿・猪・牛由来 O157 分離株の PFGE 解析



(3) 鹿、および猪由来 O157 STEC 分離株の系統解析：

LSPA-6 及び ARMS-PCR 解析では、鹿由来 1 株、猪由来 1 株が、出血性下痢症患者由来株が多く含まれる Clade7 に、鹿由来 8 株、猪由来 1 株、牛由来 1 株は水様性下痢症患者由来株が多く含まれる Clade12、残る猪由来 1 株も、水様性下痢症患者由来株が含まれる Clade10 にそれぞれ分類された。

(4) 鹿、および猪由来 O157 STEC 分離株の WGS 解析：

これまでに我々が分離した全ての O157 STEC 分離株(鹿 5 株、猪 3 株)、および鹿由来 05,026,083,0104 各 STEC 分離株の WGS 解析では、O157 STEC で 5,294,527bp ~ 5,498,450bp、non-O157 STEC では 3,769,174 ~ 4,961,358bp の塩基配列が決定され、O157 STEC では 20 ~ 22 個、05,026STEC では 21 個、083STEC で 5 個 O104STEC で 13 個の病原関連遺伝子が検出された(右表)。

我が国の野生鹿、猪由来 O157 STEC 分離株の保有する病原関連遺伝子

病原関連遺伝子	12D102-4	15D8-1	15D138-1	17B15-1	17B60-3	18B50-1	17C15-2	15D133-2	15D98-2	Sakai株
エフェクター蛋白										
espA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
espB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
espF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
espJ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
nleA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
nleB	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
nleC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
tccP	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
tir	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
接着因子										
eae	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
gad	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ihp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
血清抵抗性因子										
iss	3	1	3	1	3	3	3	2	1	2
毒素産生										
ostA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
stx1	stx1A	-	1	-	1	-	-	-	-	1
			variant a		variant a					variant a
	stx1B	-	1	-	1	-	-	-	-	1
			variant a		variant a					variant a
stx2	stx2A	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			variant c		variant c					variant c
	stx2B	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			variant c		variant c					variant c
O157の保有する病原関連遺伝子の種類/数		16/22	18/22	16/22	18/22	16/22	16/22	16/20	18/21	18/23

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内海優子, 藤本 翼, 佐藤真伍, 丸山総一, 奈良崎孝一郎, 奈良崎和孝, 鶴田 忠, 横山栄二, 朝倉 宏, 杉山 広, 高井伸二, 壁谷英則
2. 発表標題 わが国の鹿・猪における志賀毒素産生大腸菌の保菌状況およびO157分離株の全ゲノム解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田聡志, 内海優子, 藤本 翼, 佐藤真伍, 丸山総一, 奈良崎孝一郎, 奈良崎和孝, 鶴田 忠, 高井伸二, 壁谷英則
2. 発表標題 わが国の鹿・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全ゲノム解析
3. 学会等名 平成30年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田聡志, 宮川明日香, 佐藤真伍, 丸山総一, 奈良崎孝一郎, 奈良崎和孝, 壁谷英則
2. 発表標題 わが国の鹿・猪におけるCampylobacterおよびArcobacterの保菌状況と分離株の病原性解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 壁谷英則
2. 発表標題 野生動物が原因となる細菌性人獣共通感染症
3. 学会等名 日本防菌防黴学会 第46回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 壁谷英則
2. 発表標題 野生動物の有効利用と注意すべき感染症 - 細菌性感染症 -
3. 学会等名 令和元年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 4) 森田聡志、宮川明日香、佐藤真伍、丸山総一、奈良崎孝一郎、奈良崎和孝、壁谷英則
2. 発表標題 わが国の鹿・猪におけるCampylobacterおよびArcobacterの保菌状況と分離株の病原性
3. 学会等名 令和元年度 日本獣医師会獣医学術学会年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	横山 栄二 (YOKOYAMA Eiji) (40370895)	千葉県衛生研究所・細菌研究室・室長 (82507)	