

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05962

研究課題名(和文) 野生動物に分布する新規人獣共通感染Campylobacterの生態解明と病原評価

研究課題名(英文) Epidemiological clarifications and evaluation of the pathogenesis about novel zoonotic Campylobacter distributed among wild lives

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、わが国の野生鹿、猪におけるCampylobacter保菌状況を検討し、鹿(5.5%)に比べ、猪は高率(39.5%)にC. hyointestinalis (Ch)を保菌していることを明らかにした。野生鹿、猪由来Campylobacter分離株のWGSデータに基づくcgMLST法の開発と周辺家畜、環境由来株との系統解析法確立のためのデータベースを構築した。野生鹿、猪由来Campylobacter分離株のWGS解析による病原関連候補遺伝子の網羅的解析、および同株を用いたヒト腸管上皮細胞株への接着、侵入試験について検討し、同株は人に病原性を示す可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、全国的に増加しすぎた野生鹿や猪の個体数調整のために捕獲した鹿や猪を食用利用する試みが各地で行われている。その一方で各種食中毒事例も報告されているが、野生鳥獣肉のリスク評価は、必ずしも十分行われていなかった。本研究では、ジビエのリスク評価の一環として、Campylobacterに着目して検討したところ、従来注目されていなかったC. hyointestinalisが高率に分布し、人へのリスクとなりうることを明らかにした。本成績は今後のリスク管理を行う上で基礎的なデータとして活用できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated (1) the prevalence of Campylobacter species among wild deer and wild boars, and found that that in wild deer (39.5%) was higher than in deer (5.5%); (2) For the future development of cgMLST, which could be applied for the establishment of a phylogenetic analysis method using the isolates from livestock and environment, we developed a data base of WGS data on Campylobacter isolates from wild deer and wild boars. Comprehensive analysis of pathogen-related candidate genes by WGS of Campylobacter isolates derived from wild deer and wild boars, and We investigated the ability of the strains for the attachment and following invasion test for a human intestinal epithelial cell line and showed that the strain may be pathogenic to humans.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：Campylobacter 野生動物 鹿 猪 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 野生鳥獣肉の食用利用機会の増加：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。特に鹿や猪による被害は深刻で、平成 30 年度の農林水産省の報告では、農作物への被害だけでも併せて 101 億円に達している。増えすぎた野生動物に対して、わが国では「鳥獣被害防止特措法」ならびに「鳥獣保護法」を改正し、積極的な駆除を推進しており、環境省の統計では、令和元年度には 60.3 万頭の鹿、64.0 万頭の猪が捕獲されている。その一方で、捕獲した鹿や猪の肉をジビエとして活用し、地域の新たな特産とする試みが多く自治体で行われている。平成 30 年度に野生鳥獣のジビエ利用量は 1,887t で、前年度に比べ 15.8% 増加している。このような背景から、野生鹿や猪と人が接触する機会は以前に比べ格段に増加しており、実際にジビエを原因とする様々な人獣共通感染症の事例も散発的に報告されている。しかしながら、わが国の鹿、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、必ずしも十分に行われていない。
- (2) 野生鹿、猪における *Campylobacter* の保菌状況：これまでの我々は、野生鹿や猪における人獣共通感染症のリスク評価の一環として志賀毒素産生大腸菌 (STEC)、*Campylobacter*、*Yersinia*、*Arcobacter* 等の疫学的研究を一貫して遂行してきた。このうち、本研究で扱う *Campylobacter* については、わが国で最も多くの食中毒事例の原因となっているが、野生鹿や猪からは *Campylobacter jejuni*/*C. coli* は、全く検出されていない (未発表データ)。しかしながら、*Campylobacter hyointestinalis* が特に猪において高率に分離されるとの成績を得ている。*C. hyointestinalis* は、従来、主に豚や牛から分離される家畜感染症と考えられてきた。しかしながら、近年、下痢症患者からも分離されるとの報告が世界各地で蓄積されていることから、ヒトへの感染性、ならびに病原性が強く疑われている。
- (3) *C. hyointestinalis* 分離株の全ゲノム解析の状況：近年全ゲノムシーケンシング (Whole-genome sequencing; WGS) 解析が一般的に行われるようになり、各種病原体の全ゲノム情報に基づく系統解析や網羅的な病原関連遺伝子解析が行われるようになった。*Campylobacter* についても *C. jejuni*/*C. coli* を中心に WGS 解析が進められ、これまでに *C. jejuni* で 204 株、*C. coli* は 34 株がデータバンク上に登録されている (申請時現在)。このような WGS データに基づいて、*C. jejuni*/*C. coli* については、core genome multilocus sequence typing (cgMLST) による系統解析が開発され、従来不明であった家畜や家禽の保菌する *Campylobacter* の由来について解析が進んでいる。さらに、*C. jejuni*/*C. coli* には細胞接着や侵入、細胞毒素、薬剤耐性、ストレス応答など、80 種類の病原関連遺伝子が報告されている。
- (4) *C. hyointestinalis* 分離株の腸管上皮細胞障害性：*C. jejuni* による腸管上皮細胞への接着や侵入に関わる因子として、*cadF* などを含む 16 種類が報告されている。近年、腸管上皮細胞への侵入経路として、刷子縁側から接着、侵入する経路に加え、上皮細胞間のタイトジャンクションを破壊することにより、側細胞膜、および基底膜側から侵入する可能性も報告されている。一方、*C. hyointestinalis* による腸管上皮細胞への接着、侵入機構、ならびに宿主特異性は全く不明の状態である。

## 2. 研究の目的

本研究では、主に以下 4 点について検討する。

- (1) わが国の野生鹿、猪における *Campylobacter* 保菌状況の解明
- (2) 野生鹿、猪由来 *C. hyointestinalis* 分離株の WGS 解析
- (3) 野生鹿、猪由来 *C. hyointestinalis* 分離株の病原関連遺伝子保有状況
- (4) 野生鹿、猪由来 *C. hyointestinalis* 分離株を用いたヒト腸管上皮細胞株への接着、侵入試験

## 3. 研究の方法

- (1) わが国の野生鹿、猪における *Campylobacter* 保菌状況の解明：16 道府県で捕獲された鹿 292 頭、および 7 県で捕獲された猪 76 頭の糞便各 1g を 9ml の Preston 培地に接種し、微好気条件下、37 および 42 で 48 時間増菌培養後、mCCDA 寒天培地およびスキロー血液寒天培地で微好気条件下、37 および 42 で 48 時間分離培養した。PCR 法により菌種同定を行い、*C. jejuni*、*C. coli*、および *C. hyointestinalis* を含む *Campylobacter* の保菌状況を明らかにした。
- (2) 野生鹿、猪由来 *C. hyointestinalis* 分離株の WGS 解析：得られた分離株の WGS データについて、得られた 7 つの遺伝子 (*pgm*, *glnA*, *glyA*, *tkl*, *gltA*, *atpA*, *aspA*) の塩基配列の遺伝子型を決定し、PubMLST を用いて MLST 解析を行った。さらに、GenBank に登録されている *C.*

*hyointestinalis*株、LMG 9260株(ヒト由来)、S12株(牛舎由来)、CCUG 14169株(豚由来)の全ゲノム塩基配列についてin silico Molecular Cloningを使用して各株間で共通する遺伝子を探索した。

- (3) 野生鹿、猪由来*C. hyointestinalis*分離株の病源関連遺伝子保有状況：*C. hyointestinalis*と同定された株について、PCR法によりHigh temperature requirement A (*htrA*)、ならびに*C. hyointestinalis*の*cdt* { *chcdt* (A,B,C)、*chcdt* (A,B,C) } の保有状況を検討した。
- (4) 野生鹿、猪由来*C. hyointestinalis*分離株を用いたヒト腸管上皮細胞株への接着、侵入試験：*C. jejuni*、標準株 (NCTC11351<sup>T</sup>株)、*C. hyointestinalis* 標準株 (ATCC32517<sup>T</sup>株)、本研究で分離された猪由来Ch分離株 (22B17-2, 22B20-1, 22B24-3, 22B26-1, 22B29-1, 22B29-3, 計6株) 対照株として*E. coli* DH5 $\alpha$ 株をヒト結腸腺癌由来細胞株であるCaco-2細胞にMOI50で24時間感染させ、Millicell ERS-2を用いて経上皮電気抵抗値 (TER) を測定した。

#### 4. 研究成果

- (1) わが国の野生鹿、猪における*C. hyointestinalis*保菌状況の解明：鹿18頭 (6.2%)、および猪36頭 (47.4%) から*Campylobacter*が分離された。猪は鹿に比べて有意 ( $p<0.01$ ) に高率に*Campylobacter*を保菌していた。菌種別では、*C. hyointestinalis*が鹿16頭 (5.5%)、猪30頭 (39.5%) から計120株、*C. coli*が猪1頭 (1.3%) から4株、*Campylobacter* spが鹿2頭 (0.7%)、猪7頭 (9.2%) から計22株がそれぞれ分離された
- (2) 野生鹿、猪由来*C. hyointestinalis*分離株のWGS解析：22B17株の全ゲノム解析の結果、1,914,671bpの塩基配列が決定され、542個のCDSが得られた。MLST解析に使用する7つの遺伝子の塩基配列が決定されていることを確認し、現在、MLST解析を実施している。また、3株の*C. hyointestinalis*に保存されている遺伝子として1394種のCDSが認められた。今後、これらの解析候補遺伝子を用いたcgMLST法を開発し、これまでに得られた*C. hyointestinalis*分離株間の系統関係を検討する必要がある。
- (3) 野生鹿、猪由来*C. hyointestinalis*分離株の病源関連遺伝子保有状況：検討した全ての*C. hyointestinalis*分離株は*htrA*を保有していた。*chcdt*保有パターンは6種類すべて保有する株が61株(54.5%)と最も多く、2種類保有する株1株(0.9%)まで、計14種類の保有パターンが認められた。特に両遺伝子のサブユニットB(*chcdt* / B)を欠損している株は5株認められた。検討した分離株の54.5%は全ての*chcdt*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考えられた。
- (4) 野生鹿、猪由来*C. hyointestinalis*分離株を用いたヒト腸管上皮細胞株への接着、侵入試験：Caco-2細胞に各菌株を感染させたところ、感染0時間後のTER値を100%とした時の感染24時間後のTER値の比は、非感染細胞は93.9%、*E. coli* DH5 $\alpha$ 株は98.2%であったのに対して、*C. jejuni*、標準株は59.6%、*C. hyointestinalis*標準株は72.2%、*C. hyointestinalis*分離株は74.7%~89.0%であった。*C. jejuni*、標準株および*C. hyointestinalis*標準株、*C. hyointestinalis*分離株6株の感染24時間後のTER値の比は、非感染細胞および*E. coli* DH5 $\alpha$ 株に比べ有意 ( $p<0.01$ ) に低値を示した。さらに、*C. hyointestinalis*標準株と*C. hyointestinalis*分離株を比較したところ、一部の分離株 (22B24-3、22B29-1) は標準株よりもTER値の比が有意 ( $p<0.05$ ) に高値を示した。*C. hyointestinalis*標準株および*C. hyointestinalis*分離株の全てが*htrA*を保有し、全ての*C. hyointestinalis*分離株において、TER値が有意に低下したことから、*C. jejuni*と同様に細胞接着に関与するタンパク質を切断し、腸管上皮細胞のTJを破壊する可能性が示唆された。また、一部の*C.*

*hyointestinalis*分離株は*C. hyointestinalis*標準株よりもTER値の比が有意に高値を示したため、分離株間で*htrA*の配列や発現量、あるいは活性などが異なり、腸管上皮細胞への障害性に差がある可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morita S, Sato S, Maruyama S, Miyagawa A, Nakamura K, Nakamura M, Asakura H, Sugiyama H, Takai S, Maeda K, Kabeya H.	4. 巻 82
2. 論文標題 Prevalence and whole-genome sequence analysis of <i>Campylobacter</i> spp. strains isolated from wild deer and boar in Japan.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Comp Immunol Microbiol Infect Dis .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cimid.2022.101766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Morita, Shingo Sato, Soichi Maruyama, Asuka Miyagawa, Kiriko Nakamura, Mizuki Nakamura, Hiroshi Asakura, Hiromu Sugiyama, Shinji Takai, Ken Maeda, Hidenori Kabeya	4. 巻 82
2. 論文標題 Prevalence and whole-genome sequence analysis of <i>Campylobacter</i> spp. strains isolated from wild deer and boar in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Comp Immunol Microbiol Infect Dis .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cimid.2022.101766	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣木勇太、有吉夏鈴、青山新、寺橋寛太、伊藤恭大、妻神理乃、佐藤真伍、丸山総一、壁谷英則
2. 発表標題 野生鹿・猪における <i>Campylobacter</i> 属菌および <i>Al iarcobacter</i> 属菌の保菌状況と分離株の病原関連遺伝子の保有状況
3. 学会等名 令和5年度関東・東京合同地区獣医師大会・三学会（埼玉）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣木勇太、有吉夏鈴、青山新、寺橋寛太、森田聡志、宮川彩日香、中村きり子、中村水紀、佐藤真伍、丸山総一、壁谷英則
2. 発表標題 わが国の野生鹿・猪における <i>Campylobacter</i> の保菌状況と分離株の病原性解析
3. 学会等名 第23回人と動物の共通感染症研究会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 壁谷英則
2. 発表標題 野生動物におけるカンピロバクター保菌状況
3. 学会等名 第16回日本カンピロバクター研究会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 壁谷英則
2. 発表標題 One Health 野生動物に関わる諸問題と獣医学 「食中毒を引き起こす病原微生物」
3. 学会等名 日本学会議 公開シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石井 香菜、鈴木 綾乃、田中 裕梨、佐藤 真伍、丸山 総一、壁谷 英則
2. 発表標題 野生鳥獣食肉処理工程における拭き取り検体を対象とした細菌叢解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤真伍、西岡絵夢、壁谷英則、丸山総一
2. 発表標題 人およびサルから分離した塹壕熱原因菌Bartonella quintanaの完全長ゲノムの比較解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 聡志、宮川 明日香、中村 きりこ、中村 水紀、佐藤 真伍、丸山 総一、壁谷 英則
2. 発表標題 わが国の鹿、猪におけるCampylobacterの保菌状況と分離株の全ゲノムシーケンスによる病原関連遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（酪農学園大学）
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関