

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06423

研究課題名（和文）新興する鶏病原性大腸菌の流行調査とゲノム情報を利用した特徴解析

研究課題名（英文）Epidemic survey of emerging avian pathogenic Escherichia coli and characteristic analysis using genomic information

研究代表者

井口 純（Iguchi, Atsushi）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00437948

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：鶏大腸菌症は、ブロイラー（肉用鶏）で頻発する細菌感染症である。日本における鶏大腸菌症による経済的損失は大きく、農畜産分野において改善すべき課題の一つに挙げられる。本研究では、ブロイラーの主要生産地である宮崎県内の養鶏場において、鶏大腸菌症に起因するであろう大腸菌の分離と詳細な解析を行った。病鶏由来株276株と健康鶏由来188株のゲノム配列を決定して詳細な解析をおこなったところ、078、0115、0161などの血清型に属する系統的に非常に近縁な一つの群（系統G）が、国内で流行している実態が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった、国内で近年流行している鶏大腸菌症に起因する大腸菌の特徴が明らかとなった。病鶏から分離された大腸菌の血清型は多様であったが、ゲノム解析の結果、それらの一部は進化系統的に極めて近縁であった。つまり、同一起源から派生した、血清型が異なる大腸菌の一群が国内で流行している実態が明らかとなった。以上の結果は、対象菌を制御するためのワクチン開発などにとって、有用な情報になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Avian colibacillosis is a bacterial infectious disease that frequently occurs in broilers. The economic loss due to avian colibacillosis in Japan is large, and it is one of the matter of concerns to be improved in the field of agriculture and livestock. In this study, we performed isolation and detailed analysis of E. coli that may be caused by Avian colibacillosis at a poultry farm in Miyazaki Prefecture, which is the main production area of broilers. When the genome sequences of 276 strains derived from diseased chickens and 188 strains derived from healthy chickens were determined and analyzed in detail, one group that is phylogenetically very closely related, but strains show several different O-serogroups including 078, 0115, and 0161. From the above results, it became clear that a group of E. coli derived from the same origin and having different serotypes is prevalent in Japan.

研究分野：細菌学

キーワード：鶏 大腸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 鶏大腸菌症 (avian colibacillosis: AC) は、ブロイラー (肉用鶏) で頻発する細菌感染症である。日本における AC による経済的損失は年間 100 億円以上と考えられており、農畜産分野において改善すべき課題の一つに挙げられる。AC の病型は、敗血症、心膜炎、腹膜炎などの病態を示す内臓型 AC と、皮下に化膿性の炎症 (蜂窩織炎) を呈する皮下型 AC に大別される。内臓型 AC は 35 日齢から出荷 (50 日齢前後) までの間に多発し、呼吸器症状や下痢症などを呈して急死することが多い。一方、皮下型 AC は生前には気付かず、食鳥処理場における脱羽後に初めて病変が発見される場合が多い。食鳥検査で AC 病態が認められた場合は全部廃棄とすることが食鳥検査法で定められている。飼育現場における AC の予防対策としては、適切な衛生管理と飼養管理に加え、ワクチン接種などが推奨されているが、多くの農場で集団または散发事例が頻発している。

(2) AC の低減や制御を目指す上で、原因となる鶏病原性大腸菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*: APEC) の詳細な理解が必要となる。国内外でこれまでに発表されてきた成書や総説の多くでは、APEC の主要な血清型 (菌体表層糖鎖のタイプ) は 01、02、078 の 3 種類であると記述されている。しかし、この根拠は 1990-2000 年代に行われたいくつかの調査結果によるものであり¹⁾、近年の報告では、調査した APEC の多くが上記 3 種類には属さないことがわかっている。流行する APEC の血清型がこの 10-20 年の間に大きく変化しているものと予想されるが、180 種類を超える大腸菌血清型のフルタイピングには、1 検体あたり 2 万円程度 (抗血清試薬をフルセットで購入すると約 470 万円) のコストがかかるため、大規模かつ詳細な流行調査は長年行われておらず、流行タイプの傾向も把握できていない現状にある。

(3) 一方、AC 発症機序や APEC 病原因子の解明に関する報告も複数あるが、その大半では全ゲノムの公開されている 01 または 078 の血清型株が使用されている。それらから見出された病原性関連遺伝子は、一部の APEC に限って分布するものがほとんどであり、広く APEC に共通する病原性関連因子はこれまでに同定されていない。

2. 研究の目的

「新興する APEC タイプの不理解」は、AC/APEC 研究を進展させる上でのボトルネックとなっている。そこで本研究では、AC の低減と制御に向けた新興する APEC の総合的な理解を目的とし、まずは、現在流行している APEC の特徴を横断的な調査により理解する。さらに、流行要因 (汚染源) の予測、ゲノム解析を基盤とした病原性関連因子の同定へと展開させる。

3. 研究の方法

(1) 国内で流行する APEC タイプの解明: 宮崎県内の複数農場において、皮下型 AC と内臓型 AC を発症した鶏の病変部から、DHL 寒天平板培地を用いて大腸菌 (1 羽から 1 株) 計 600 株程度を分離した。PCR 法を用いて大腸菌の同定を行った。*E. coli* 0g-typing PCR (01 から 0187 に対応)²⁾と *E. coli* Hg-typing PCR (H1 から H56 に対応)³⁾を用いて、0 血清群遺伝子型 (0g 型) と H 型遺伝子型 (Hg 型) の詳細を判定した。

(2) APEC 汚染源の予測: 宮崎県内の複数農場で肥育された健康鶏 100 羽の消化管内容物 (直腸と盲腸) から、DHL 寒天平板培地を用いて大腸菌 (1 羽から 2 株) 計 200 株程度を分離した。PCR 法を用いて大腸菌の同定を行った。*E. coli* 0g/Hg-typing PCR を用いて 0 血清群遺伝子型 (0g 型) と H 型遺伝子型 (Hg 型) を判定した。

(3) 血清耐性能の評価: 市販のニワトリ血清と菌液 (10^4 CFU) を混和し、37 °C で 2 時間静置した後の生菌数を測定し、菌数の増減をコントロールと比較した。

(4) ゲノム解析による新興株の詳細解析: 上記で分離した大腸菌から代表株を選抜し、MiSeq システムにより全ゲノム配列を決定した。既に公開されている大腸菌ゲノム情報を加えて、進化系統関係、既知病原性関連遺伝子の保有、薬剤耐性遺伝子の分布を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 病鶏由来株の 0g:Hg の特徴: 皮下型 AC 由来大腸菌 (47 農場・365 羽由来) 365 株と、内臓型 AC 由来大腸菌 (59 農場・304 株) 304 株を分離し、0g 型と Hg 型を判定した。皮下型 AC 由来株では 45 種類の 0g 型 (上位から 0g78、0g25、0g109、0g15、0g115) と 30 種類の Hg 型 (Hg4、Hg21、Hg19、Hg9、Hg16) が確認された (図 1)。また、内臓型 AC 由来株では、46 種類の 0g 型 (0g36、0g115、0g6、0g71、0g109) と 27 種類の Hg 型 (Hg4、Hg21、Hg16、Hg31、Hg10) が確認された (図 2)。0g:Hg の組み合わせは、皮下型 AC 由来大腸菌では 71 種類、内臓型 AC 由来大腸菌では 72 種類が確認された。主要な型としては、0g6:Hg16 (計 46 株)、0g15:Hg10 (29 株)

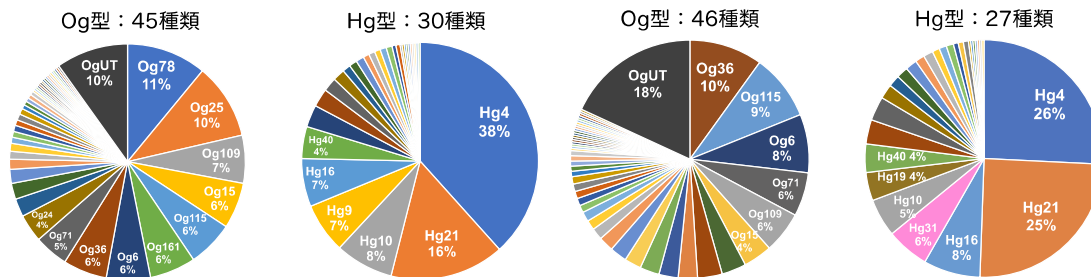


図1. 皮下型AC由来株のOg型とHg型の結果

図2. 内臓型AC由来株のOg型とHg型の結果

Og36:Hg21 (43株)、Og71:Hg4 (35株)、Og78:Hg4 (27株)、Og109:Hg40 (28株)、Og115:Hg4 (31株)、Og161:Hg4 (31株)が挙げられた。以上の結果より、近年流行しているAPECの血清型の特徴が明らかとなった。

(2) 健康鶏由来株のOg型の特徴：健康鶏(20農場・100羽由来)から200株を分離し、Og型を判定した。68種類のOg型が確認され、上位からOg18(6%)、Og166(4%)、Og81(4%)、Og83(3%)、Og69(3%)であった。病鶏由来株と共通するOg型はOg15、Og25、Og45、Og71、Og109、Og161など35種類が確認された。

(3) 血清耐性能の評価：病鶏由来16株と健康鶏由来16株の血清耐性能を評価したところ、病鶏由来株では100%、健康鶏株では75%の大腸菌が耐性であった。以上の結果から、健康鶏の消化管内に定着する大腸菌の多くは、APEC病原因子の一つである血清耐性能を有していることが確認された。

(4) ゲノム解析：先進ゲノム支援のサポートにより、上記の大腸菌から464株(病鶏由来株276株と健康鶏由来188株)を選抜し、ゲノム配列を決定して詳細な解析をおこなった。その結果、Og78、Og115、Og161など少なくとも9種類のOg型を含む大腸菌が、系統的に非常に近縁な一つの群(系統G)を形成していることが明らかとなった。この系統Gは病鶏由来株全体の約30%を占め、ほぼ全てがHg4に分類された。以上の結果より、同一起源から派生した、O血清群の異なる大腸菌の一群が、国内で流行している実態が明らかとなった。

<引用文献>

- 1) Susantha M et al, Can Vet J, 38:159-162(1997)
- 2) Iguchi A et al, J Clin Microbiol. 53(8):2427-32(2015)
- 3) Banjo M et al, J Clin Microbiol 56(6):e00190-18(2018)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------