

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450412

研究課題名(和文) わが国の野生鹿における志賀毒素産生大腸菌の保菌状況と分離株の病原性評価

研究課題名(英文) Prevalence and evaluation of the pathogenicity of Shiga toxin producing Escherichia coli derived from wild deer in Japan.

研究代表者

壁谷 英則 (KABEYA, Hidenori)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10318389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：わが国の鹿323頭の直腸便から志賀毒素産生大腸菌(STEC)の分離を行ったところ、38頭(11.8%)から49株のSTECが、9頭(2.8%)から9株の0157が分離された。分離株は志賀毒素遺伝子や細胞接着因子などの病原関連遺伝子を保有していた。0157株の系統解析では、1株は出血性下痢患者由来株が多く含まれるClade7に、8株は水様性下痢の患者由来株が多く含まれるClade12にそれぞれ分類された。鹿由来STEC 31株について、24種類の病原関連遺伝子の保有パターンにより系統解析を行ったところ、05 STEC2株は人患者由来株と類似したパターンであり、人に病原性を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC) and STEC 0157 were isolated from 38 (11.8%) (49 strains) and 9 (2.8%) (9 strains) out of 323 deer in Japan. Some strains contained several pathogenicity-related genes, such as stx, eaeA and hlyA. Phylogenetic analysis of the STEC 0157 strains demonstrated that one and eight strains were grouped in Clades 7 and 12, respectively. The clades 7 and 12 included some strains derived from human patients with hemorrhagic- and watery- diarrhea, respectively. Thirty-one STEC strains derived from deer were used for the phylogenetic analysis based on the patterns of the presences of 24 pathogenicity-related genes and it was revealed that 2 strains of 05 STEC were significantly related to the strains derived from human patients, suggesting the possibility that the deer strains could 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 鹿 ジビエ 食中毒

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 社会的背景

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。特に野生鹿による被害は深刻で、2011年度の農林水産省の報告では、農作物への被害が83億円に達している。増えすぎた野生動物に対して、積極的な駆除を実施しており、環境省の統計では、2010年度には36.5万頭の野生鹿が捕獲されている。その一方で、捕獲した鹿の肉を新たな地域の特産として活用を試みる自治体もみられる。このような背景から、野生鹿と人が接触する機会は、以前に比べ格段に増加している。

狩猟者が素手で鹿を解体し、生あるいは生に近い肉や臓腑を喫食することが慣例的に行われており、鹿の血液や肉などを介して、人が各種病原体に感染する可能性が危惧される。しかしながら、鹿、猪などのゲームミートは、と畜場法によると畜検査の対象外であり、わが国における鹿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。

### (2) 国内外の野生鹿における STEC の保菌状況

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、0157 STEC の保菌率は、0~2.4%と牛に比べて低い。一方、わが国の調査では、各自治体単位で小規模な調査が実施されているが、いずれも0157 STEC は検出されていない。しかしながら、わが国でも1997年、2001年、および2009年に、いずれも猟師が狩猟した鹿肉を家族内で喫食したことにより、重篤な0157 STEC 感染事例が発生していることから、さらに広範囲かつ継続的な検討が急務の課題である。

これに対し海外では、野生鹿は血清型0157以外の STEC (non-0157 STEC) を高率に保菌していることが明らかとなっている。分離された non-0157 STEC 株の多くは志賀毒素を産生し、その他の病原性に関わる様々な遺伝子を保有していることも明らかとなっている。一方、国内の報告では、その多くが0157 STEC を対象とした検討である。野生鹿における non-0157 STEC の分布について広範に調査した報告は皆無であり、諸外国に比べて調査が全く十分ではない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、鹿肉を食用に供する際のリスク評価の一環として、わが国の野生鹿における STEC の分布状況を検討する。

(2) 新たな病原性評価法である PCR-binary typing system (P-BIT) 解析法、ならびに系統解析法を応用し、鹿由来 STEC の病原性を総合的に評価する。

## 3. 研究の方法

(1) STEC の分離培養、および STEC 分離

### 株の病原関連遺伝子性状解析

2013年9月から2016年5月までに、13県の鹿323頭から収集した直腸便を採取した。各糞便の5倍乳剤を作製し、クロモアガー STEC 培地または MacConkey 培地を用い、37、24時間で STEC を分離した。また、同乳剤をノボピオシン加 mEC 培地で42、18時間で増菌培養後、クロモアガー0157培地、CT-SMAC 培地に接種して、STEC と同様の条件で0157の分離を行った。各培地上の大腸菌のうち *stx* 遺伝子を保有する株を STEC とした。STEC と同定された株は、*stx* バリエーション、病原関連遺伝子 (*eaeA*, *hlyA*) の有無を検討した。

### (2) 0157 STEC 分離株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析

本研究で分離された9株の鹿由来0157 STEC 分離株について、制限酵素 *Xba*I でゲノム DNA を処理し、PFGE 解析を行った。

### (3) 0157 STEC 分離株の系統解析

Clade 解析: 0157 STEC の7つの SNP を含む遺伝子座 (ECs2521, ECs3881, ECs4130, ECs3942, ECs0517, ECs2357, ECs0654) を ARMS-PCR によりそれぞれ増幅した後、SNP の組み合わせにより、8つの Clade に分類した。

Lineage 解析: 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-icIR*) を PCR によりそれぞれ増幅後、増幅塩基長の組み合わせにより、3つの Lineage に分類した。

Clade 解析と Lineage 解析を合わせて計13の新 Clade に分類した。すなわち、Lineage の Clade 4/5 の株は新 Descendant Clade 4/5、Lineage / の Clade 4/5 の株は新 Ancestral Clade 4/5、Lineage の Clade 9 の株は新 Putative Clade 10、Lineage の Clade 8 の株は新 Putative Clade 11、Lineage の Clade 7 の株は新 Clade 12、Lineage の Clade 4/5 の株は新 Putative Clade 13 とした。

### (4) non 0157 STEC 分離株の P-BIT 解析

2010年3月から2013年5月にかけてわが国の鹿30頭から分離した系31株の non0157 STEC 分離株を本研究に用いた。各 STEC 鹿分離株から抽出した DNA を用いて、24種類の病原性関連遺伝子 (*ECs3737*, *pic*, *espC*, *iha*, *eae*, *nleB*, *nleC*, *nleG2-3*, *nleG*, *agn43EDL933*, *paa*, *ureC*, *ehxA*, *etpD*, *katP*, *espP*, *stx2*, *stx2c*, *lpfA026*, *fyuA*, *cif*, *stx1*, *stx2d* および *iutA*) を標的とした PCR を行った。各遺伝子保有の有無に基づき、BioNumerics software version 5.10 (Applied Maths, Belgium) を用いて、ward 法、neighbor-net 法、および Bayes 法によるクラスター解析を行った。さらに、本研究では、日本の人から分離された STEC 12株、ニュージーランドの人、家畜および食品から分離された STEC 29株、計41株を加えて解析

を行った。

#### 4. 研究成果

(1) STEC の分離培養、および STEC 分離株の病原関連遺伝子性状解析

本研究では7県の鹿38頭(11.8%)から49株の STEC が分離され、そのうち2県の鹿9頭由来の9株は0157であった。鹿由来 STEC 株の *stx* バリエーションとその組み合わせは、*stx2c* が8株、*stx2b+2c+2d* が7株、*stx2b+2c+2d+2g* が7株、*stx2b+2d+2g* が4株、*stx1a* が3株、*stx2b+2d* が3株、*stx2a* が2株、*stx2g* が2株、*stx2d* が1株、*stx2c+2d* が1株、*stx1a+2c* が1株、*stx1a+2c+2d* が1株、*stx1c+2b+2c+2d* が1株、*stx2* 型別不能が8株であった。さらに *eaeA*(+) は鹿由来 STEC 13株、*hlyA*(+) は鹿由来 STEC 36株であった。一方、鹿由来0157株では *stx2c* が8株、*stx1a+stx2c* が1株で、全ての株が *eaeA*(+)、*hlyA*(+) であった。

(2) 0157 STEC 分離株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析(図1)

今回鹿から分離された鹿由来0157、9株および2012年に鹿から分離された0157、1株の計10株のPFGE解析の成績を図1に示した。地域Aで捕獲した5頭の鹿由来の5株(それぞれ15D98-2株、15D124-1株、15D128-2株、15D129-1株、15D131-1株)は、いずれも同一のPFGEパターンを示し、1つのクラスターを形成した。地域Aで近い時期に捕獲された鹿7頭由来7株のうち、5株は同一のパターンを示したことから、この地域でクロノラルに広まっていたと考えられた。一方で、同地域で捕獲した2頭の鹿由来の2株(15D133-2株、15D136-1株)は先の5株と異なるPFGEパターンを示した。2012年に地域Bの鹿から分離された12D102-4株と2015年に分離された15D138-1株はいずれも類似したPFGEパターンを示した。一方、2015年に地域Bで分離された15D8-1株は他の株とは異なるPFGEパターンを示した。また、地域Bで異なる時期に捕獲された2頭の鹿由来2株は、類似したパターンを示したことから、この地域で近縁株が維持されていると考えられた。

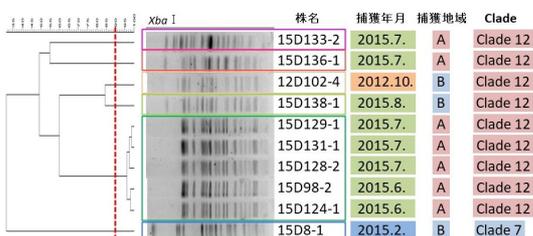


図1 鹿由来0157分離株のPFGE解析

(3) 0157 STEC 分離株の系統解析

0157 分離株の Clade 解析: Clade 解析の結果、すべて Clade 7 に分類された。

0157 分離株の Lineage 解析: Lineage 解析の結果、1株は Lineage 1 に、その他の8株はすべて Lineage 2 に分類された。

0157 分離株の系統解析の新分類: Clade 解析および Lineage 解析の結果、1株は新 Clade 7 に、その他8株はすべて新 Clade 12 に分類された。

Clade12 は、水様性下痢が主症状の0157 感染症由来の株が多く含まれる。一方、Clade7 は、出血性下痢が主症状の同患者由来の株が多く含まれる。また、Clade7 および12 は、いずれもわが国の0157 感染症由来からも多く検出されていることから、鹿は人への0157 感染源となる可能性が示唆された。

(4) non 0157 STEC 分離株の P-BIT 解析

検討した31株のわが国の鹿由来 non 0157 STEC 分離株は、24種類の病原関連遺伝子の保有パターンにより2つのクラスターに分類された(図2)。2頭の野生鹿から分離された2株の05 STEC 株は、人患者由来株と共に一つのクラスターを形成したことから、当該分離株の病原関連遺伝子は、人患者由来株と有意に類似していることが明らかとなった。一方、その他の検討したすべての non 0157 STEC 分離株は、異なるクラスターを形成し、このクラスターには、食品、家畜、および一部の人患者由来株と同一のクラスターを形成した。以上の成績から、一部の鹿由来 non 0157 STEC には、人に対して病原性を示す可能性が考えられた。

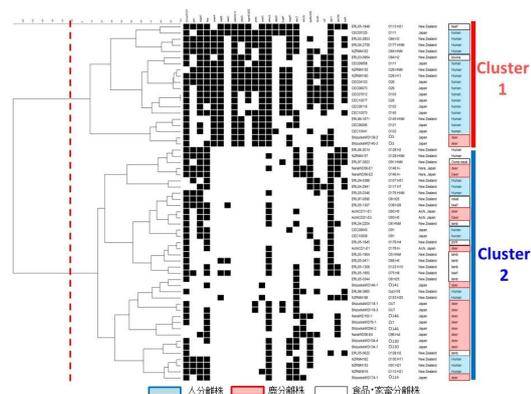


図2 鹿由来 non 0157 STEC 分離株の P-BIT 解析

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kabeya H, Sato S, Oda S, Kawamura M, Nagasaka M, Kuranaga M, Yokoyama E, Hirai S, Iguchi A, Ishihara T, Kuroki T, Morita-Ishihara T, Iyoda S, Terajima J, Ohnishi M, Maruyama S. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from feces of sika deer (*Cervus nippon*) in Japan using PCR binary typing analysis to evaluate their potential human pathogenicity. *J Vet Med Sci.* (査読有) 2017 May 3;79(5):834-841.

壁谷英則、佐藤真伍、丸山総一 野生動物の食用利用と人獣共通感染症 日本獣医師会雑誌 (査読無) 2016 69: 277 - 283

[学会発表](計4件)

壁谷英則、佐藤真伍、村上昂、黒田恵美、横山栄二、丸山総一 わが国の鹿における志賀毒素産生大腸菌保菌状況と 0157 分離株の系統解析 平成 28 年度日本獣医師会学会年次大会 2017 年 2 月 24-26 日、ホテル金沢(石川県・金沢市)

黒田恵美、壁谷英則、佐藤真伍、丸山総一 わが国の野生鳥獣食肉処理施設で処理された鹿肉の衛生評価 第 159 回日本獣医学学会学術集会 2016 年 9 月 6-8 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

村上昂、黒田恵美、壁谷英則、佐藤真伍、横山栄二、平井晋一郎、山崎朗子、鎌田洋一、丸山総一 わが国の野生鹿における志賀毒素産生大腸菌保菌状況と 0157 分離株の系統解析 第 159 回日本獣医学学会学術集会 2016 年 9 月 6-8 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

高橋龍樹、壁谷英則、佐藤真伍、山崎朗子、鎌田洋一、平健介、小西良子、本田三緒子、丸山総一 わが国の鹿および猪における病原性 *Yersinia* の保菌状況 第 159 回日本獣医学学会学術集会 2016 年 9 月 6-8 日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

壁谷 英則 (KABEYA, Hidenori)  
日本大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号：10318389

(2) 研究分担者

丸山 総一 (MARUYAMA, Soichi)  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：30181829

横山 栄二 (YOKOYAMA, Eiji)  
千葉県衛生研究所・細菌研究室・室長  
研究者番号：40370895