

14. 富山県におけるイノシシの病原細菌および 薬剤耐性菌保有状況調査

- 木全 恵子 (富山県衛生研究所)
稲畑 良 (富山県食肉検査所)
里麻 美喜子 (旧所属：富山県食肉検査所 現所属：富山県高岡厚生センター)
磯部 順子 (富山県衛生研究所)
内田 薫 (富山県衛生研究所)

【研究目的・研究の必要性】

近年、富山県では県内のイノシシの生息数の増加やイノシシによる農作物被害が拡大したことから、イノシシの捕獲が急激に増加した。捕獲されたイノシシのほとんどは埋却処理される一方、食肉（ジビエ：狩猟による野生獣肉）として有効利用する取り組みが進んでいる。しかし、県内で捕獲されるイノシシについて、病原細菌保有状況に関する知見はほとんど得られていない。また、イノシシがヒト・家畜の生活圏に侵入する頻度が上昇したことから、本来保有しないヒト・家畜由来の病原細菌や薬剤耐性菌等がイノシシに伝播する危険性があるが、県内で捕獲されたイノシシについて具体的な検証は行われていない。

そこで、本研究では、富山県内で捕獲されるイノシシの糞便の病原細菌（サルモネラ、カンピロバクター、エルシニア、腸管出血性大腸菌（EHEC））および薬剤耐性菌（ β -ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌、キノロン耐性腸内細菌科細菌）について保有状況を調査し、食品衛生及び人獣共通感染症という観点から細菌学的な解析を行った。

【研究計画】

(1) 糞便検体と懸濁液の調製

2014年から2016年までに富山県で捕獲されたイノシシの腸内容物(糞便)76検体を用いた。これらの検体は検査まで -80°C で凍結保存した。検体を解凍したのち、その1.0gをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)2.0mlに懸濁し(懸濁液)、以降の検査に使用した。

(2) 検体からのDNA抽出

懸濁液200 μl からQIAamp[®] DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)でDNA抽出を行った後、DNA Clean & Concentrator[™]-5 (ZYMO RESEARCH)でDNAを濃縮した。

(3) サルモネラの検出

直接分離：懸濁液を SS 寒天培地(日水)に塗抹し、37°Cで一晩培養した。

増菌培養：懸濁液 100 μ l を BPW10ml (Difco)で前増菌後、食肉製品・殺菌液卵のサルモネラ試験法に準じ選択増菌培養した。選択分離培地は MLCB 寒天培地(日水)、クロモアガーサルモネラ培地(関東化学)、SS 寒天培地(日水)を用いた。前増菌液および選択増菌液から抽出した DNA[1]を用いて、*invA* 遺伝子を対象に PCR を実施した。

これらの直接分離および増菌培養後の選択分離培地上の定型的集落について、生化学的性状試験を実施し同定した。

(4) カンピロバクターの検出

分離培養：懸濁液 100 μ l を、プレストン(OXOID) 10 ml、ボルトン(OXOID) 10 ml に加え、42°Cで1~2日微好気培養した。各増菌液を CCDA(OXOID)、スキロー寒天培地(栄研化学)に塗抹し、42°Cで2~3日微好気培養した。定型的集落について、好気発育試験、マルチプレックス PCR[2]および 16S rRNA 遺伝子のシークエンスによりカンピロバクターを同定した。

遺伝子検査：懸濁液 DNA を用いて、マルチプレックス PCR を実施し、明瞭な増幅バンドが確認された検体を陽性と判定した。

(5) EHEC の検出

懸濁液 100 μ l を TSB 5ml(Difco)で前増菌後、mEC 培地(日水)で増菌培養した。mEC 増菌液から DNA を抽出し[1]、EHEC の志賀毒素遺伝子 *stx* の PCR [3]を行った。PCR で *stx* 陽性となった培養液を酸処理[4]後、mEC で希釈しマイクロプレートで一晩培養した。PCR で *stx* 陽性となった培養液を X-MG 培地(日水)に塗抹し、36°C一晩培養後、大腸菌様集落を釣菌し、*stx* の PCR 検出を行った。

(6) エルシニアの検出

直接分離：懸濁液を CIN 寒天培地、SS 寒天培地(日水)に塗抹した。また、懸濁液 100 μ l に同量の 0.5%KOH を加え 20~30 秒静置後、エルシニア選択分離培地(OXOID)に塗抹した(アルカリ処理法)。塗抹平板を 30°Cで 48 \pm 2 時間培養した。

増菌培養：懸濁液 100 μ l を滅菌 1/15 mol/L りん酸緩衝液 pH7.6(ナカライ)に接種し、約 10°Cで、3 週間培養した。増菌液またはアルカリ処理した増菌液をエルシニア選択分離培地に画線塗抹した。直接分離および増菌培養後の選択分離培地上の定型的集落について、生化学的性状試験を実施した。

(7) β -ラクタマーゼ産生腸内細菌科細菌、キノロン耐性腸内細菌科細菌の検出

β -ラクタマーゼ産生菌は CTX で、キノロン耐性菌は LVFX でスクリーニングした。すなわち懸濁液 250 μ l を TSB で前増菌し、その増菌液を抗生物質添加 TSB (CTX 最終濃度 0.5 μ g/ml または LVFX 最終濃度 0.25 μ g/ml)で、35°Cで一晩選択培養した。培養液を抗生物質添加マッコンキー寒天培地(CTX 最終濃度 0.25 μ g/ml または LVFX 最終濃度 0.125 μ g/ml)に塗抹し一晩培養した。生育した菌のうちオキシダーゼ試験陽性菌について、CTX または LVFX のディスク感受性試験を行った。感受性試験の結果、耐性となったものについて薬剤耐性遺伝子の保有状況を調べた。薬剤耐性遺伝子解析の対象遺伝子および塩基

配列領域は、 β -ラクタマーゼ産生菌についてはカルバペネマーゼ、ESBL、AmpC β -ラクタマーゼの各遺伝子、キノロン耐性菌については *gyrA* と *parC* の QRDR (キノロン耐性決定領域) 塩基配列とした。

【実施内容・結果】

富山県内で捕獲されたイノシシの糞便からの病原細菌(サルモネラ、カンピロバクター、エルシニア、EHEC) および薬剤耐性菌の検出状況は表 1 のとおりであった。

サルモネラは、1 検体から *S. Thompson* が分離された。また、増菌液における PCR はサルモネラが分離された 1 検体の二次増菌液のみ陽性であった。

カンピロバクターは 2 検体から分離された。その内訳は *Campylobacter jejuni*、*C. lanienae* であった。懸濁液 DNA の遺伝子検査では、17 検体からカンピロバクター属特異的 DNA が検出された。そのうち 3 検体から、*C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* 特異的 DNA も検出された。カンピロバクターが分離された 2 検体は、いずれも PCR 陽性であった。

エルシニアは 8 検体 (11%) から分離された。その内訳は、*Y. enterocolitica*、*Y. fredetixenii*、*Y. kristensenii*、*Y. mollaretii* でそれぞれ 7、2、1、1 検体から分離された。選択分離培地別では CIN で分離されたのは 7 検体、SS で分離されたのは 4 検体で、内 4 検体は両方の培地から分離された。

EHEC は 12 検体の増菌培養液が PCR で *stx* 陽性となった。このうち、7 検体の培養液から EHEC が分離された。その内訳は 0148:H10(*stx2+*) 1 検体、08:H19(*stx2+*) 4 検体、OUT:H7(*stx2+*) 1 検体、OUT:H27(*stx2+*) 1 検体であった。08:H19(*stx2+*) 4 検体はいずれも同一地域で捕獲されたイノシシであった。

β -ラクタマーゼ産生菌は 4 検体から 5 菌種が分離された。内訳は、*Citrobacter braakii* (CMY 型 AmpC)、*C. freundii* (CMY 型 AmpC)、*C. youngae* (CIT 型 AmpC)、*Enterobacter horrmaechei* (MIR 型 AmpC) 及び *Hafnia paralvei* (ACC 型 AmpC) であった。カルバペネマーゼ、ESBL 遺伝子は検出されなかった。

キノロン耐性菌は 4 検体から 4 株が分離された。4 株の菌種の内訳は、*C. freundii* 1 株および *E. coli* 3 株であった。塩基配列の解析から、*C. freundii* では、*gyrA* が耐性型、*parC* が野生型の QRDR であり、3 株の大腸菌からは、*gyrA*、*parC* 共に、耐性型の QRDR のアミノ酸置換が検出された。

【考察と今後の課題】

近年、ヒトの生活圏に関わる野生動物と感染症の関連が危惧されている。食肉としてのイノシシの活用という観点からもイノシシの感染症や食中毒の起因細菌の保有状況は重要な情報である。本研究は、県内のイノシシの糞便の病原細菌や食中毒起因菌、薬剤耐性菌を調査した初めての結果である。

イノシシの便から今回分離されたサルモネラ菌 *S. Thompson* は、県内の臨床株において多く分離されている血清型のひとつであった。カンピロバクターにおいても食中毒の主要な病原菌である *C. jejuni* とブタが多く保有する *C. lariena* が分離された。また、菌分離はできなかったがヒトに対する病原性がある *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* の遺伝子が検出された。EHEC に関しては、遺伝子 *stx* は 15.8%、菌株は 9.2% が保有していた。以上の病原細菌分離状況から、イノシシは腸内にヒトに感染性をもつサルモネラ、カンピロバクター、エルシニアおよび EHEC を保有しており、狩猟後の解体に関しては衛生的処理が非常に重要であることが判明した。

カンピロバクター、EHEC においては、遺伝子検査陽性かつ菌株不分離であった検体があったが、これらは検体の長期間の凍結により菌が損傷し、分離できなかった可能性が考えられた。また、今回分離された EHEC はヒトから分離される血清群とは異なっており、病原性の検討は今後の課題である。

エルシニアおよび EHEC の分離状況については、地域ごとに異なる傾向がみられた。エルシニアが分離された検体は A 地域と D 地域で、A 地域で高かった (5/18 検体)。A 地域は過去に *Y. enterocolitica* の水系感染による集団感染事例 (患者 4 名) が発生しており、水源が *Y. enterocolitica* により汚染された可能性が示唆されたが [5]、本菌を保有する野生動物が A 地域で多いという結果は非常に興味深い。EHEC は C 地域 21.7% (5/23 検体)、D 地域 6.9% (2/29 検体) で分離されており、C、D 地域のみ菌が検出される傾向が見られた。本菌の分離状況が菌特異的であるのか検証するために、懸濁液 DNA の遺伝子検査によるウェルシュ菌、毒素原性大腸菌の分離状況と比較した。その結果、ウェルシュ菌毒素遺伝子は非検出であったが、毒素原性大腸菌毒素遺伝子は EHEC と同様の検出傾向を示した (データ未掲載)。従って、EHEC を含む病原性大腸菌の分離状況についても、今後地域ごとに検討する必要があると考えられた。

イノシシの便の耐性菌検査は、院内感染の原因菌として知られている薬剤耐性菌が野生動物から検出されるかどうか注目した。β-ラクタマーゼ産生菌の検索では、世界的に社会問題化している獲得型のカルバペネマーゼと ESBL 遺伝子を保有する菌は検出されなかった。検出された β-ラクタマーゼ産生菌はすべて AmpC 型 β-ラクタマーゼであった。検出された 3 菌種はもともと染色体上に AmpC 型 β-ラクタマーゼを保有する菌であると推定され、薬剤耐性遺伝子の伝播による耐性獲得ではないと考えられた。キノロン耐性菌の検索では、キノロン耐性型 *gyrA*、*parC* を保有する耐性菌が検出された。今回検出したキノロン耐性は QRDR のアミノ酸変異による突然変異型であり、野生のイノシシからこのような耐性菌が検出された理由は不明であり、今後の課題である。また、今回の薬剤耐性菌の検出状況はヒトの生活圏からイノシシへの伝播はないと考えられた。

本研究結果よりイノシシにおける人獣共通感染症のリスクが明らかとなった。本県におけるイノシシ生息数の増減と合わせて、保有細菌の動向に注意することが必要と思われる。

【参考文献】

1. Walsh, PS, *et al* (1991). *Biotechniques*, 10, 506-513
2. Yamazaki-Matsune W, *et al* (2007). *J. Med. Microbiol.*, 56, 1467-1473.
3. Scheutz, F, *et al* (2012). *J. Clin. Microbiol.*, 50, 2951-2963.
4. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検査・診断マニュアル. 病原体検出マニュアル, 地方衛生研究所全国協議会 国立感染症研究所 編.
5. 磯部 順子, 他 (2014). *感染症学雑誌*, 88, 827-832.

表1. イノシシ糞便検体における病原細菌および薬剤耐性菌分離状況

検体採取地域	検体		サルモネラ		カンピロバクター		EHEC		エルシニア	耐性菌	
	検体性別	検体数	遺伝子 検査陽性 検体数	菌分離 陽性 検体数	遺伝子 検査陽性 検体数	菌分離 陽性 検体数	遺伝子 検査陽性 検体数	菌分離 陽性 検体数	菌分離 陽性 検体数	β-ラクタ マーゼ耐性 菌分離陽性 検体数	キノロン 耐性菌分離 陽性検体数
A	オス	6	1	1	0	0	0	0	2	0	1
	メス	12	0	0	5	0	1	0	3	1	0
	全	18	1	1*1	5	0	1	0	5	1	1
B	オス	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	メス	5	0	0	3	1	0	0	0	0	0
	全	6	0	0	4	1*2	0	0	0	0	0
C	オス	11	0	0	1	0	3	1	0	0	0
	メス	12	0	0	1	0	4	4	0	2	0
	全	23	0	0	2	0	7	5*4	0	2	0
D	オス	19	0	0	5	0	3	1	1	1	1
	メス	10	0	0	1	1	1	1	2	0	2
	全	29	0	0	6	1*3	4	2*5	3	1	3
合計	オス	37	1	1	7	0	6	2	3	1	2
	メス	39	0	0	10	2	6	5	5	3	2
	全	76	1	1	17	2	12	7	8	4	4

*1: *S. Thompson*

*4: O148:H10(*stx2+*) 1検体、O8:H19(*stx2+*) 4検体

*2: *Campylobacter jejuni*

*5: OUT:H7(*stx2+*) 1検体、OUT:H27(*stx2+*) 1検体

*3: *Campylobacter lanienae*

【経費使途明細】

使 途	金 額
遺伝子検出試薬(アガロース S 3 個, QIAamp DNA Stool Mini Kit(50), GoTaqG2 Hot Start Green Master Mix, Zymo Research DNA Clean & Concentrator-5 D4013, タカラ Primer Set (CPE-1/2、ESP-1/2)	198,806 円
細菌分離用培地:CIN 培地 200 枚, クロモアガー-STE2 2 個(分離検討用)	71,388 円
消耗器材 (ループスクリーキャップチューブ 1.5ml コニカル型)	16,848 円
その他 (文房具、印紙)	2,958 円
合 計	290,000 円
大同生命厚生事業団助成金	290,000 円