

## 1 4. 富山県におけるイノシシの志賀毒素産生性大腸菌の

### 定着性の把握と遺伝子解析

- 木全 恵子 (富山県衛生研究所) 磯部 順子 (富山県衛生研究所)  
綿引 正則 (富山県衛生研究所) 前西 絵美 (富山県衛生研究所)  
佐賀由美子 (富山県衛生研究所)

#### 【研究目的および研究の必要性】

富山県ではイノシシの生息数増加に伴う農作物被害の増加によりイノシシの捕獲数が急激に増加している。捕獲したイノシシは近年、食肉（ジビエ：狩猟による野生獣肉）としての有効活用する取り組みが広く行われているが、これらのイノシシの病原細菌保有状況に関する知見は限られている。我々は 2014 年度～2016 年度に富山県内で捕獲されたイノシシの糞便 76 検体について、食品衛生上問題となる志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の調査を行った。その結果、県内の STEC の分布が特定の地域に偏る傾向があることが判明した。また、2015 年度に捕獲された特定地域内複数のイノシシの糞便検体から同一遺伝子型の STEC が検出され、この地域でのイノシシ間で STEC の保菌が確認された(1)。

しかしながら、その後の県内のイノシシの STEC 保有状況は把握されていない。県内のイノシシの STEC 保有状況を調査し、特に同一遺伝子型の STEC の地域内の定着または他地域への拡散傾向の有無を確認することは、イノシシの食材利用の観点から、食品衛生上重要であると考えられる。

一方、野生動物、家畜、人など異なる宿主から分離された STEC はその保有する病原性因子についても相違点が多いことが知られている(2、3)が、イノシシ由来の STEC については詳細な解析は少なく、ヒトに対するリスクについてはあまり議論されていない。このため、本研究では STEC の遺伝子解析を行い、人獣共通感染症の観点からイノシシ由来の STEC の病原性に関する基礎的情報の集積を行う。

#### 【研究計画】

##### 1. イノシシの STEC 分離と志賀毒素遺伝子 (*stx*) の検出

2017 年に採取されたイノシシの糞便 28 検体について、各検体 1g を PBS 2mL に懸濁した。この懸濁液 100  $\mu$ L を TSB 5mL に添加し、37°C で 30 分前培養した。この前培養液に 2 倍濃度の mEC 増菌培地 5mL を加え、36°C で一晩静置培養し、増菌培養液とした。増菌培養液の志賀毒素遺伝子 (*stx*) が PCR で陽性となった検体から STEC の分離を行った(1)。

分離した STEC の O 血清群は PCR による遺伝子型別法により決定した(4)。H 血清は市販の免疫血清（デンカ）による型別を行った。

## 2. パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

PFGE による STEC の分子疫学的解析は既報 5 の標準化プロトコールに従った。

## 3. 分離株のゲノム解析

既報 1 で報告したイノシシの糞便から分離された STEC 7 株 (1)、および本課題で分離された STEC 5 株について、Miseq (Illumina 社) による全塩基配列の網羅的解析を行い、Spades v3.11.1 によるアセンブリでドラフトゲノムを取得した。DFAST によるアノテーション処理後、得られた蛋白質コード配列 (CDS) について Virulence Factor Database (VFDB) 上の既知の病原因子遺伝子の塩基配列との blastn 検索を行った。

### 【実施内容・結果】

#### 1. 2017 年におけるイノシシの STEC 保有状況

2017 年に採取されたイノシシの糞便 28 検体について、増菌培養液の *stx* の PCR 検出および STEC の分離を行った結果は表 1 のとおりであった。28 検体中 11 検体の増菌液が *stx* 陽性であった。このうち 6 検体から STEC が分離された。その内訳は Og8 : H19 (*stx2*) が 3 検体、OgUT:H21 (*stx2*) が 3 検体であった。

#### 2. 2014 年から 2017 年におけるイノシシの STEC 保有状況

我々は 2014 年～2016 年に採取したイノシシの糞便における STEC の保有状況を調査し、C 地域および D 地域のイノシシが STEC を保有している割合が高いことを報告した (1)。そこで既報の 2014 年～2016 年および 2017 年における C 地域および D 地域のイノシシの糞便検体の *stx* 検出状況と STEC 分離状況を比較した (図 1)。C 地域では 2015 年、2017 年の検体の *stx* 陽性率はそれぞれ 31.8%、41.7% であり、D 地域の 2016 年、2017 年検体の *stx* 陽性率はそれぞれ 27.3%、30% であった。

表 1 2017 年に捕獲されたイノシシの STEC 保有状況

捕獲地域	検体		stx 遺伝子陽性検体数	STEC 分離陽性検体
	性別	検体数		
A	オス	2	0	0
	メス			
	全	2	0	0
B	オス	3	3	0
	メス	1	0	
	全	4	3	0
C	オス	7	3	2
	メス	5	2	2
	全	12	5	4 <sup>*1</sup>
D	オス	10	3	2
	メス			
	全	10	3	2 <sup>*2</sup>
合計	オス	22	9	4
	メス	6	2	2
	全	28	11	6

\*1 Og8 : H19 (*stx2*) 3 検体、OgUT:H21 (*stx2*) 1 検体

\*2 OgUT:H21 (*stx2*) 2 検体

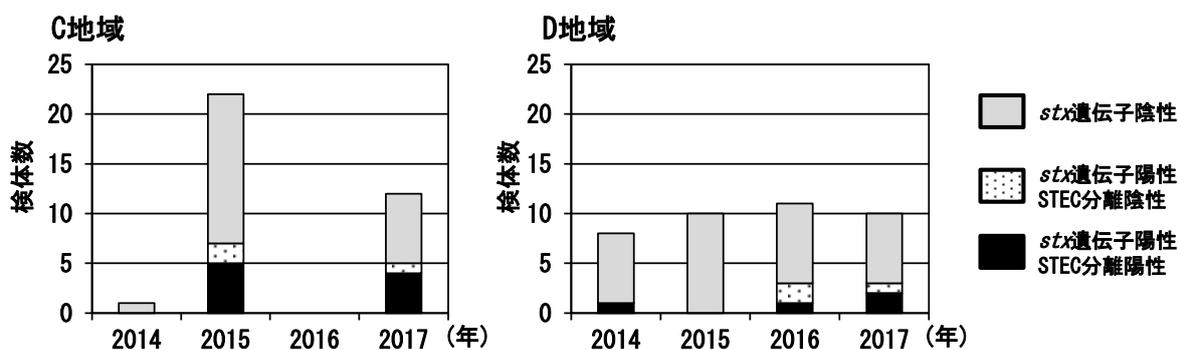


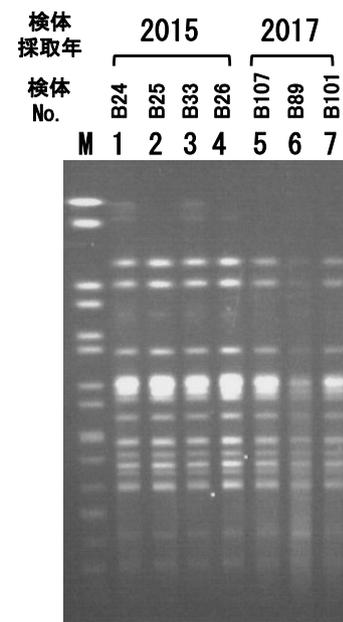
図 1 2014 年から 2017 年における C 地域および D 地域のイノシシの STEC 保有状況の推移 (2014 年～2016 年の *stx* 検出状況、STEC 分離状況は既報 1 参照)

C地域での2015年、2017年に採取した検体におけるSTEC分離陽性率はそれぞれ22.7%、33.3%であった。2015年・2017年にC地域で採取した検体から分離されたSTEC 9株のうち、7株はOg8:H19(*stx2*)であった。D地域で2014年、2016年および2017年に採取された検体のSTEC分離陽性率はそれぞれ12.5%および33.3%であった。D地域ではC地域と異なり、複数年にわたり同一血清型のSTECは分離されなかった。

### 3. PFGEによるSTECの分子疫学的解析

複数検体から分離された同一血清型のSTECについてPFGEによる遺伝子パターンの解析を行った。C地域で2015年・2017年に採取された7検体から分離されたSTEC Og8:H19(*stx2*)はすべて同一PFGEパターンを示した(図2A)。2017年に採取されたC地域・D地域の各1検体から分離されたSTEC OgUT:H21(*stx2*)は同一PFGEパターンを示した(図2B レーン1およびレーン2)。また、D地域で分離されたOgUT:H21(*stx2*) 1株(図2B レーン3)は上記検体(図2B レーン1およびレーン2)と5バンド以上PFGEパターンが異なっていた。

A. STEC Og8:H19



B. STEC OgUT:H21

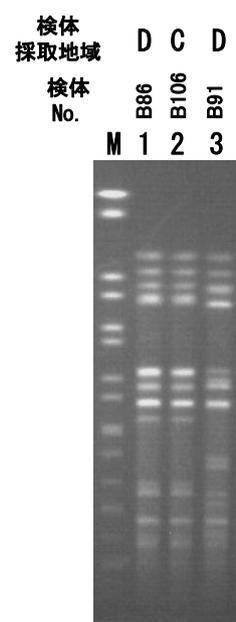


図2 PFGEによる遺伝子パターンの解析

### 4. ゲノム解析による病原因子の検索

イノシシから分離されたSTEC12株のドラフトゲノム配列は平均4,985.9kbp(最大5,497.4kbp、最小4,848.6kbp)、平均カバレッジは81.2(最大125.2、最小37.6)であった。ドラフトゲノム上の蛋白質コード配列(CDS)のうちVFDBの病原因子遺伝子塩基配列と90%以上の相同性が検出されたCDSを各病原因子のカテゴリーごとに表2に示した。分離株No.10はインチミンおよびTypeIII分泌系をコードするLEE領域遺伝子群を保有していた。分離株No.8、9、11および12は毒素原性大腸菌(ETEC)の毒素STをコードする遺伝子*estIa*を保有していた。分離株No.8、9および10のこれらの病原因子の保有は既報1と一致していた。分離株No.8および9は牛・人由来ETECおよび敗血症起因大腸菌が保有する莢膜様抗原CS31A(*Escherichia coli* surface antigen)と関連するK88線毛遺伝子の塩基配列を保有しており、これらの分離株がETECの接着因子を保有することが示唆された。分離株No.8および9を除くSTEC10株はCFAI線毛、Curli、Stg線毛、F9線毛の遺伝子群の塩基配列を保有していた。

### 【考察と今後の課題】

本研究において、2017年の富山県のイノシシのSTEC保有状況を調査した結果、C地域では2017年の検体のSTEC分離陽性率（*stx*陽性率）は33.3%（41.7%）であった。C地域の2015年の検体のSTEC分離陽性率（*stx*陽性率）はそれぞれ22.7%（31.8%）であり、2017はSTECの保有率が2015年と比較して微増傾向にあることが判明した。特にC地域内では同一由来のSTEC O<sub>g</sub>8:H19(*stx*2)が複数のイノシシから検出され、この地域のイノシシの生息圏にSTEC O<sub>g</sub>8:H19(*stx*2)が定着していると推定された。

また、2017年にはC地域およびD地域のイノシシから同一PFGEパターンのSTEC O<sub>g</sub>UT:H21(*stx*2)が検出された。C地域とD地域は近接していないため、これらの分離株を保菌していたイノシシは地域間を移動している可能性がある。このO<sub>g</sub>UT:H21(*stx*2)がイノシシの移動により他の地域へ拡散し、STEC O<sub>g</sub>8:H19(*stx*2)のように県内のイノシシの生活圏に定着するかどうかは今後監視する必要があると考える。

今回のゲノム解析から、イノシシの糞便より分離されたSTECはヒトの腸管に定着・感染するO157等のSTECとは異なる病原因子遺伝子を保有していた。分離株No. 8、9が保有する接着因子CS31Aは、牛・人由来ETECや人由来分散付着性大腸菌DAECから検出されており（6）、これらの菌株のヒトへの感染性・腸管内定着性が推測された。他のSTEC 10株は腸管外病原性大腸菌(ExPEC)や鳥類の病原性大腸菌(APEC)のFAI線毛、Curli、Stg線毛、F9線毛の遺伝子群の塩基配列相同領域が検出された。今後これらの塩基配列相同領域が線毛機能を有する遺伝子群であるか解析する必要がある。Curliや、F9線毛はSTECにも保有され、それぞれ野菜・非生物素材の表面、腸管内のSTECの付着を増強する。Stg線毛はサルモネラ属菌に多く人腸内での付着を増強する。これらの因子が検出されていることから、イノシシから分離されたSTECはヒトの腸内に感染・付着する可能性があり、ヒトに対する

表2 イノシシの糞便より分離されたSTECの病原因子遺伝子塩基配列検出状況

菌株No. 血清型 検体採取年	1 O <sub>g</sub> 8:H19 2015	2 O <sub>g</sub> 8:H19 2015	3 O <sub>g</sub> 8:H19 2015	4 O <sub>g</sub> 8:H19 2015	5 O <sub>g</sub> 8:H19 2017	6 O <sub>g</sub> 8:H19 2017	7 O <sub>g</sub> 8:H19 2017	8 O <sub>g</sub> 148:H10 2015	9 O <sub>g</sub> 4:H27 2016	10 O <sub>g</sub> 105:H7 2014	11 O <sub>g</sub> UT:H21 2017	12 O <sub>g</sub> UT:H21 2017
病原因子等												
接着因子												
CFA/1 fimbriae遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●
Curli fibers遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E. coli common pilus (ECP)遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>eaeH</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Stg fimbriae遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●			●	●	●
<i>paa</i>										●		
<i>eae</i>										●		
K88 fimbriae、CS31A capsule-like antigen遺伝子群								●	●			
F9 fimbriae 遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
侵入系												
<i>tia</i>								●				
<i>traJ</i>	●	●	●	●	●	●	●					
鉄輸送系												
Heme獲得遺伝子群								●	●			
<i>hma</i>									●			
Yersiniabactin siderophore									●			
分泌系												
ACE T6SS遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
LEE-領域遺伝子群										●		
ETT2遺伝子群								●	●			
T2SS遺伝子群	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
毒素												
<i>stx1*</i>												
<i>stx2*</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Alpha-hemolysin遺伝子群								●	●			
<i>estA*</i>								●	●		●	●
<i>astA</i>								●	●			
<i>hlyE/clyA</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

● VFDB上の病原因子遺伝子塩基配列と90%以上の相同性が検出されたCDS

\*一部の菌株についてはリードマッピングおよびPCRにより確認した

病原性を否定できないと考えられた。捕獲されたイノシシがジビエとしてヒトに提供される機会が今後増加することから、このような動物由来 STEC の病原性がどのように変化するのか、今後注視する必要があると考える。

#### 【参考文献】

1. 木全 恵子, 稲畑 良, 佐賀 由美子ら: イノシシからの志賀毒素産生性大腸菌の分離と分離株の特徴. 日本食品微生物学会誌, 37, 61-68 (2020)
2. Baranzoni GM, Fratamico PM, Gangiredla J, et al: Characterization of shiga toxin subtypes and virulence genes in porcine shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Front. Microbiol., 7, Article574 (2016)
3. Kabeya H, Sato S, Oda S, et al: 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 humanpathogenicity. J. Vet. Med. Sci., 79, 834-841 (2017)
4. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, et al: *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serotyping. J. Clin. Microbiol., 53, 2427-2432 (2015)
5. 寺嶋 淳, 泉谷 秀昌, 伊豫田 淳ら: 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に資する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 平成 15 年度総括・分担研究報告書, 10-21 (2004)
6. Jallat C, Darfeuille-Nichaud A, Girardeau JP, et al: Self-transmissible R plasmids encoding CS31A among human *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal stools. Infect. Immun., 62, 2865-2873 (1994)

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
次世代シーケンス用試薬 (QIAseq FX DNA Library CDI Kit)	113,850 円
遺伝子検出試薬 (アガロース S、GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix、Fast DNA Stool Mini Kit)	111,177 円
分離検討用増菌培地 (ハイコンピテンスブロー)	17,160 円
消耗器材 (スクリーキャップチューブ)	35,200 円
その他 (文房具、印紙代)	2,613 円
合 計	280,000 円
大同生命厚生事業団助成金	280,000 円