

表6 ヒトへの感染報告がある家畜伝染病予防法規定外の感染症数

畜種	調査した 感染症数	ヒトの感染例 のあるもの	感染症の数(疾病名)
			畜産物が原因のもの
牛	46	9	3(リステリア症、コクシエラ症、クリプトスポリジウム症)
めん羊・山羊	15	3	1(仮性結核 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>)
馬	14	3	0
豚	43	17	4(エンテロトキセミア <i>Clostridium perfringens</i> C型、エルシニア症、ザルコシステイス症、旋毛虫症)
鶏・アヒル・七面鳥	32	3	2(パラチフス、カンピロバクター症)
計	150	35(23.3%)	10(6.7%)

平成 16 年度厚生労働省食品安全確保研究事業分担研究報告書

分担課題名：小反芻動物が保菌する志賀毒素産生性大腸菌の性状解析

分担研究者 氏名：中澤宗生

所属：独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
動物衛生研究所

研究要旨

動物における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の保菌調査はこれまで牛を主体に実施されてきており、小反芻動物の山羊や羊での保菌状況、分離株の性状などに関する知見は国内外ともに少ない状況にある。本研究では山羊および羊における志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の保菌実態を調査し、山羊・羊由来株の zoonotic risk を評価するために、分離株の性状を解析した。山羊の STEC 保菌率は、農場レベルで 25 農場中 13 農場 (52%)、個体レベルで 116 頭中 36 頭 (31%) であった。羊の STEC は調査した 3 農場すべてから分離され、個体レベルの保菌率は 74 頭中 38 頭 (51.4%) であった。分離 STEC の毒素型は山羊株では *stx1* と *stx2* の両毒素産生株および *stx1* 単独産生株が、羊株では *stx1* と *stx2* の両毒素産生株が優勢であった。また、分離株の O 群は多様であるが、山羊株では 20 種の O 群のうち 14 が、羊株では 10 種のうち 8 がヒトの STEC 株に共通するものであった。なかでも山羊株の O103 や O111 は、*eaeA* 遺伝子を保有し、所謂、腸管出血性大腸菌のカテゴリーに含まれる菌型であることから、ヒトへの病原性が強い株と考えられた。

A. 研究目的

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, STEC) または Vero 毒素産生性大腸菌は典型的な食品媒介性の人獣共通病原体であり、ヒトに下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群などを引き起こす危険な細菌である。本菌の主要な保有体は食用動物と考えられているが、家畜の STEC 保菌調査はこれまで牛を主体に実施されてきており、小反芻動物の山羊や羊の保菌に関する知見は国内外ともに少ない状況にある。わが国では地域的に山羊肉の需要が高く、そ

の消費形態は生食が好まれることから、安全で安心できる食肉の提供がとくに要求されている。

本研究では家畜の STEC 保菌実態調査の一環として、山羊・羊における保菌状況を調査し、分離 STEC 株の zoonotic risk を評価するために、各種の性状を解析した。

B. 研究方法

検査材料：山羊は A 県内 25 農場の健康な成獣 116 頭から、羊は B 県内 3 農場の健康な成獣 74 頭からそれぞれ新鮮糞便を採取し、シードスワブ 1 号

(栄研化学)に入れて実験室に輸送し、培養に供した。

分離および同定：供試糞便をマッコンキー寒天培地(日水)とDHL寒天培地(日水)に直接面線塗抹し、37℃、24時間培養後、各平板から大腸菌を疑うコロニーを5~20個釣菌し、TSI寒天(日水)、LIM培地(日水)および普通寒天培地(オキシダーゼ試験用)に接種して37℃、24時間培養後、その生化学的性状から大腸菌を推定した。その後、腸内細菌同定キットエンテオグラム(和光純薬)を用いて性状検査を行い、大腸菌と同定した。

志賀毒素遺伝子(*stx*)の検出と *stx* 型別：既報(1)に従いPCR法によってSTECを同定後、1頭あたり1~4株のSTECを無作為に選択し、*stx*型別をPCRで行った。

付着因子 *intimin* 遺伝子(*eaeA*)の検出：*stx*型別に供したSTEC株について既報(1)に従いPCR法で調べた。

血清型別：*stx*型別に供したSTEC株について、0群血清型はスペイン、サンチャゴ大学のDr. Blancoから入手した01~0175の型別用免疫血清を、H型別は病原大腸菌診断用血清(デンカ生研)を用いて凝集反応で調べた。

C. 研究結果

山羊および羊からのSTEC分離状況：表1に示すとおり、山羊のSTEC保菌率は、農場レベルで25農場中13農場(52%)、個体レベルで116頭中36頭(31%)であり、分離株の*stx*陽性率は1,361株中204株(14.9%)

であった。羊のSTECは調査した3農場すべてから分離され、個体レベルの保菌率は74頭中38頭(51.4%)であり、分離株の*stx*陽性率は370株中102株(27.6%)であった。

分離株の血清型：STECと同定され選抜した山羊87株、羊38株について、血清型別を実施したところ、山羊株ではラフ型の9株を除く78株が型別された。その内訳は0群が20種に分かれ、血清型は27種に及んだ(表2)。検出頻度の高い0群は027, 091, 0128, 0146, 0158などであり、血清型では091:H-, 027:H-, 022:H19, 0158:H-, 075:H-などであった。羊株では38株中ラフ型の1株を除く37株が型別された。その0群は10種に分かれ、血清型は12種であった(表3)。検出頻度の高い0群は05, 0128, 091などであり、血清型は05:H-, 0128:H-, 091:H-であった。今回の山羊・羊由来STECの計125株に血清型0157:H7は認められなかった。

分離株の*stx*型と *eaeA* 遺伝子の有無：供試STECの毒素型は山羊株では*stx1*と*stx2*の両毒素産生株が41株(47.1%)、*stx1*産生株が40株(46.0%)、*stx2*産生株が6株(6.9%)、羊株では*stx1*と*stx2*の両毒素産生株が35株(92.1%)、*stx1*産生株が3株(7.9%)であり、両毒素産生株が多く分離された。*eaeA*遺伝子は山羊の0103:H2と0111:H-の5株すべてが保有しており(表2)、羊株からは検出されなかった(表3)。毒素型と血清型の関連をみると、山羊の両毒素産生

株は 091:H-, 027:H-, 022:H19, 0158:H-, 075:H-, 0128:H19, 027:H19, 0158:H19 などに、*stx1* 産生株は 027:H-, 078:H19, 0111:H-, 0128:H-, 0146:H19, 0146:H40, 0103:H2, 0128:H2 などに、*stx2* 産生株は 082:H19, 091:H-, 048:H-などに型別された。また、羊の両毒素産生株のそれは 05:H-, 0128::H-, 091:H-, 055:H-, 081:H8, 0160:H28, 0161:H-などに、*stx1* 産生株は 0165:H52, 0166:H19 などに型別された。

D. 考察

STEC (*stx* 遺伝子を保有する大腸菌の総称) は腸管感染症の主要起因菌の一つであり、わが国では年間 2,000~4,000 名の患者が報告されており、国内で発生する動物由来感染症の首位にランクされている。本菌は食用動物が健康保菌していることから、これまで、牛を主体に保菌調査が実施されてきており、2001 年のわが国の調査 (1) では、農場レベルの STEC 陽性率 69.2%、個体レベルの保菌率 20.7%と報告されている。状況は海外でも同様 (2) であり、本菌は牛の腸内細菌叢の一部 (commensal) と見なされている。

一方、今回調査対象とした山羊・羊の STEC 保菌に関しては、一部の国を除くと食肉としての需要が低いこともあり、その保菌調査が広範に実施されていない状況にある。しかし、山羊の未殺菌乳の喫食に起因する腸管出血性大腸菌 (STEC のなかで *eaeA* 遺伝子を保有する大腸菌の総称、EHEC と略

す。) 0157 感染 (3) や観光牧場での山羊・羊などとの接触による EHEC 0157 感染 (4) が報告されており、小反芻動物が健康保菌する EHEC を含む STEC の保菌実態と分離株の性状を明らかにし、本菌の zoonotic risk を把握しておく必要がある。

今回著者らは、山羊と羊の主要な飼育県で採材した糞便について STEC の保菌状況を調べたところ、山羊では 31%から、羊では 51%から本菌が分離され、これら小反芻獣が commensal として高率に本菌を保有していることが明らかとなった。海外での山羊と羊の保菌率については、スペイン (5) で 16.2%と 24.4%、ドイツ (6) で 75.3%と 32.1%とそれぞれ報告されており、地域を越えて本菌がこれら小反芻獣に広く分布していることを示している。

次に、今回分離された STEC の zoonotic risk を評価するために、血清型、*stx* 型および *eaeA* 遺伝子保有の有無を調べたところ、分離株の 0 群は多様であるが、山羊株では 20 種の 0 群のうち 14 が、羊株では 10 種のうち 8 がヒトの STEC 株に共通するものであった。また、検出率は低いものの、山羊株の 0103:H2 と 0111:H- の 5 株すべてが *eaeA* 遺伝子を保有する EHEC であることが明らかとなった。EHEC 0103:H2 による山羊からヒトへの感染例は明らかではないが、子牛からヒトへの本菌感染例が報告 (7) されている。また、EHEC 0111:H- はヒトから分離される EHEC の第 3 位にランクされており、重要な菌型であることは周知の事

実となっている。しかし、既報(1)の牛由来 STEC 株の *eaeA* 遺伝子保有率が 24%であるのに対し、今回の山羊・羊由来株のそれは 4%であることから、牛株に比べこれらの zoonotic risk は低いのもかもしれない。

一方、羊株では EHEC のカテゴリーに属する STEC は分離されなかったが、溶血性尿毒症症候群や出血性大腸炎の症例から分離される STEC O5:H-, O91:H-, O128:H- など(5)と同一の菌型が多数分離されており、羊が潜在的な保菌源の一つであることを示唆するものと考えられる。これはまた、*eaeA* 遺伝子を保有しない STEC であってもヒトへの病原性を保持する可能性を示しており、これら菌型が保有すると推定される未知の病原因子の解明が必要である。

今回の分離株のなかに EHEC O157:H7 は存在しなかったが、これは糞便の直接培養により大腸菌を分離したことに起因するものと考えられる。本菌型の検出には増菌培養と選択分離培地 CT-SMAC の併用あるいは免疫磁気ビーズ法の適用が必須であることから、これらを用いて国内の小反芻獣における EHEC O157 の保菌調査を今後実施する必要があるものと考えられる。

いずれにしても、山羊や羊の保菌する STEC の zoonotic risk を考慮した生産・供給体制の確立と食品取扱者・消費者の衛生教育が必要であると考えられる。

E. 結論

小反芻獣である山羊および羊の保菌する STEC の zoonotic risk を評価するために、保菌実態を調べるとともに、分離株の諸性状を解析した。

山羊の STEC 保菌率は、農場レベルで 25 農場中 13 農場 (52%)、個体レベルで 116 頭中 36 頭 (31%) であった。羊の STEC は調査した 3 農場すべてから分離され、個体レベルの保菌率は 74 頭中 38 頭 (51.4%) であった。調査地域は異なるが、山羊、羊からの STEC 分離率はともに高く、羊は半数以上の個体が保菌していた。分離株の O 群血清型は多様であるが、とくに山羊株の O103 や O111 は、*eaeA* 遺伝子を保有し、所謂、腸管出血性大腸菌 (EHEC) のカテゴリーに含まれる菌型であることから、ヒトへの感染性を有するもの考えられた。羊からも O5、O91、O128 などヒトの症例株と共通の性状を有する菌株が分離された。よって、山羊や羊は本菌の潜在的保菌源である可能性が高いことから、zoonotic risk を考慮した山羊・羊肉の生産体制の確立とともに、動物のふれあい施設等における感染防止対策に留意することも重要である。

F. 引用文献

1. Kobayashi, H. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 484-489 (2001).

2. Blanco, M. et al. Distribution and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. *Vet. Microbiol.* 54, 309-319 (1997).
 3. Allerberger, F. et al. *Escherichia coli* infections and unpasteurised milk. *Eurosurveillance*, 6, 147-151 (2001).
 4. Chapman, P.A. et al. Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. *Epidemiol. Infect.* 125, 531-536 (2000).
 5. Orden, J.A. et al. Prevalence and characterization of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic and healthy sheep and goats. *Epidemiol. Infect.* 130, 313-321 (2003).
 6. Zschock, M. et al. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 203-208 (2000).
 7. 八柳 潤ほか. 子牛が感染源と考えられた腸管出血性大腸菌 O103:H2 家族内感染事例について -秋田県. 病原微生物検出状況月報 18, 132-133 (1997).
- G. 健康危機情報
なし。
- H. 研究発表
1. 論文発表
中澤宗生、秋庭正人：動物における腸管出血性大腸菌の疫学。化学療法の領域 20:1320-1327, 2004.

表1 山羊と羊からのSTECの分離状況

	調査対象		STEC陽性	
	農場数	頭数	農場数	頭数
山羊	25	116	13(52%)	36(31%)
羊	3	74	3(100%)	38(51.4%)

表2 山羊由来STECの性状

血清型	菌株型	Stx1	Stx2	Stx1+2	eaeA
O1:HUT	1	1			
O6:H19	1	1			
O22:H19	6			6	
O27:H-	10	3		7	
O27:H19	3		1	2	
O48:H-	1		1		
O75:H-	4			4	
O76:H19	1	1			
O77:H-	1	1			
O78:H19	3	3			
O82:H19	2		2		
O91:H-	13	1	2	10	
O103:H2	2	2			2
O111:H-	3	3			3
O123:H-	1	1			
O125:H-	2	2			
O127:H-	1	1			
O128:H-	3	3			
O128:H2	1	1			
O128:H19	3			3	
O146:H19	3	3			
O146:H21	1	1			
O146:H40	3	3			
O146:HUT	1	1			
O158:H-	5	1		4	
O158:H19	2			2	
O162:H4	1	1			
Rough	9	6		3	
計(%)	87	40 (46.0)	6 (6.9)	41 (47.1)	5 (5.7)

OUT: O群型別不能 HUT: H抗原型別不能

表3 羊由来STECの性状

血清型	菌株型	<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>Stx1+2</i>	<i>eaeA</i>
O5:H-	15			15	
O5:HUT	2			2	
O55:H-	1			1	
O81:H8	1			1	
O91:H-	5			5	
O128:H-	6			6	
O160:H28	1			1	
O161:H-	1			1	
O165:H52	1	1			
O166:H19	1	1			
OUT:HUT	2			2	
OUT:H 12	1	1			
Rough:H-	1			1	
計(%)	38	3 (7.9)	0 (0)	35 (92.1)	0 (0)

OUT: O群型別不能 HUT: H抗原型別不能

厚生労働省食品安全確保研究事業分担研究報告書

分担課題名：食品を介する家畜・家禽疾病の人へのリスク評価およびリスク管理に関する研究 —豚の非結核性抗酸菌症の分子疫学的解析法の研究—

分担研究者 氏名：中澤 宗生

協力研究者 氏名：西森 敬、田中 聖、内田 郁夫

所属：独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所

研究要旨 豚の非結核性抗酸菌の主要な原因菌である *Mycobacterium avium* の識別・解像度に優れた簡便な疫学解析法を開発するために、Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別法を実験室保存株に適用し、識別能力の評価とデータ解析方法の検討を実施した。その結果、VNTR 型別法は血清型別より優れた解像力を持つことが示唆され、アリルプロファイルの数値をマンハッタン距離法で計算し、Fitch-Margorish 法あるいは近隣結合法で系統樹解析することが推奨された。VNTR 型別法により豚の非結核性抗酸菌症事例の家畜とその環境から分離される菌株および人の非結核性抗酸菌の患者とその疫学的関連検体から分離される菌株を詳細に解析することにより、豚の非結核性抗酸菌症の人へのリスク評価に関するより正確な知見が得られることが期待された。

A. 研究目的

Mycobacterium avium は分子遺伝学的研究の進展により、分類学的には従来の届出伝染病の鶏結核病の原因菌ばかりでなく、豚の非結核性抗酸菌症、法定伝染病のヨーネ病および人の非結核性抗酸菌症の原因菌を含んでおり、豚の非結核性抗酸菌症と人の非結核性抗酸菌症の感染ルートとして昆虫や水系が疑われているが、詳細は不明で、単に *M. avium* であることによる風評被害の危険性を孕んでいる。

近年の分子生物学的手法の発展により、細菌ゲノムを対象にした疫学的解析方法が多数開発され、結核菌群においてもヒト結核菌を中心に多数の手法が開発され、現在応用範囲の広い、より簡便な技術の開発と普及が求められている。われわれは *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) の分子疫学的手法としてヒト結核菌の情報を利用してゲノムシーケンス情報から *in silico* 解析によって Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別法を開発し、その有用性について検討している (1)。本法の開発においては *M. avium* のゲノム

データベース情報を用いた事からも亜種レベルを超えた種レベルでの応用の可能性が推測された。そこで、ヨーネ菌型別用 VNTR 型別法を豚由来 *M. avium* の実験室保存株に応用し、系統発生的解析法の検討および有用性を検討した。

B. 研究方法

【VNTR 型別】 *Mycobacterium intracellulare* の血清型参照株を含む *M. avium* complex の血清型参照株等 32 株 (2) および我が国で豚から分離された実験室保存 *M. avium* 野外分離株 62 株を使用した。BioRad 社の InstaGene™ Matrix にて調整し、使用まで -20 度に保存したものをテンプレート DNA とした。VNTR 型別は既報に従い (1)、ヨーネ菌特異的な遺伝子挿入配列 IS900 の一部が縦列に重複した部分を解析する MATR-0 の多型縦列反復領域を除く 16 の多型縦列反復領域を検討した。16 種類のプライマーセットでの PCR 産物のサイズからそれぞれの領域における縦列反復の数を推測し、アリルプロファイルを作成した。詳細なサイズの測定にはコスモアイ SV1210

(カインス) を用いた。

【アリの多様性と識別能力】 Simpson の多様性指数を応用した Hunter-Gaston 識別指数 (HGDI) を識別能力の指標として用いた(3)。

$$HGDI = 1 - \sum n_i (n_i - 1) / \{ N (N - 1) \}$$

n_i : I 番目のアリの株数、

N : サンプルの総株数。

多型縦列反復領域を単一同士の比較あるいは組合せることにより、アリの多様性が増加すれば、I 番目のアリの数は減少し、当該組合せの識別能力が高くなると共に、領域あるいは組合せとしての HGDI は 1 に近づく。全てのアリプロファイルが異なれば、 $n_i = 1$ となり、HGDI = 1 となる。

【系統樹解析】アリプロファイル情報から遺伝的距離を求め、系統樹を推測した。遺伝的距離としては質的距離、マンハッタン距離、ユークリッド距離を検討し(図1)、系統樹推定法としては PHYLIP 3.573c (Phylogeny Inference Package Version 3.57 ; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) により UPGMA, Fitch and Margoliash 法および近隣結合法等を検討した(図2)。

C. 研究結果

【血清型参照株等からのアリプロファイルの解析】血清型参照株等 21 株から表 1 に示すアリプロファイルが得られた。*M. intracellulare* に属する血清型株からは産物が得られないか、得られても変化がないか予想外のサイズであった。近接する 2 本のバンドが増幅される MATR-10 の多型縦列反復領域は株により極端に増幅効率が低下することが観察されたために検討対象から削除した。さらに MATR-16 の領域において反復数 2 と 3 の PCR 増幅産物の中間のサイズのバンドが検出され、これを 2.5 とした(表1)。ゲノムプロジェクトのゲノム情報を検索した TIGR-104 を含めて、22 種類のアリプロファイルが得られた。単一の多型縦列反復領域のみを用いて 22 種

類を区別できなかった。MATR-3, 7, 14 の領域は比較的 HGDI が高く、特に MATR-7 は挿入配列 IS900 保有株、IS901 保有株およびその他の株においてそれぞれ異なるアリルを示した。

【VNTR 型別の識別能力】東北、関東、北陸、甲信越地域の家畜保健衛生所あるいは食肉検査センターにおいて主に 1995 年以前に分離された 62 株について VNTR 型別を実施した。これらの株は血清型 1, 2, 4, 8, 9, 21 型の単一の血清型に型別されるばかりでなく、複数の血清型抗原を保有し、8 株については型別出来なかった。最大比率を示す血清型は多くの研究者によって報告されたと同様に 8 型であり(2)、37% を占めた。血清型による HGDI は 0.82 であった(表2)。他方、VNTR 型別において 62 株は 31 種類のアリプロファイルに別れ、最大数の株が属するプロファイル 2 種類あり、6 株が属し、全体に占める比率はそれぞれ 10% となり、15 種類の多型縦列反復領域を使った VNTR 型別の HGDI は 0.96 であった(表3)。

【系統発生学的解析法の検討】3 つの距離計算法と 4 つの系統樹推定法を組み合わせ、12 個の系統樹を推測した(図2)。ユークリッド距離による一部の系統樹を除いて、IS900 を持ったヨーネ菌亜種の Map-1 から Map-5 の 5 株と IS901 を持つ S-1, S-2, S-3, Ac-3, P-18, P-10, Teps の 7 株はそれぞれクラスターを形成した。これら IS を持たない Ac-1, S-4, S-5, S-6, S-8, S-9, S-10, S-11, Ac-21 の 9 株はさらに 2 つのクラスターに別れる分枝が推測された。

D. 考察

血清型参照株等 22 株は全て異なるアリプロファイルを示し、VNTR 型別が血清型別と遜色のない識別能力を持つことが示された。15 ヶ所の多型縦列反復領域のそれぞれの HGDI は最大 0.80 であり、複数の領域の組み合わせが必要であるが、最も好ま

しい組み合わせを特定するためにはさらなるデータの蓄積が必要であった。従って、以後の検討は 15 ヶ所全てについて検討した (表 1)。

1980 年代から研究室で保存されてきた豚の非結核性抗酸菌由来の 62 株は血清型別では 8 型が優位を占め、HGDI は 0.82 であったが、VNTR 型別では 31 種類のアレルプロファイルに別れ、HGDI は 0.96 となり、VNTR 型別の識別能力の高さが示唆された (表 2, 3)。

VNTR 型別のアレルプロファイル情報を用いて株間の異同を詳細に検討するために VNTR 型別に最適な系統発生的手法の検討を実施した (図 1)。12 種類の Radial 型系統樹において各アレルプロファイルの分布に注目して系統樹推定の組み合わせを評価した (図 2)。

分子時計を仮定した推定による系統樹はよく分散して配置され、視認が容易であるが、タンデムリピートの変異の一定性が証明されておらず、しかも 1 回の変異で増減の 2 方向の可能性のある事から参考データの域を超えないものと考えられた。

まず、分子時計を設定しない近隣結合法と Fitch and Margoliash 法 (分子時計なし) の 6 つの系統樹において距離計算法を評価した。IS901 と IS900 を保有する株は 98% 以上のホモロジーを有しているが、両 IS は、DNA シークエンスレベルで 60% のホモロジーしかなく、排他的に分布している (4)。従って、IS901 保有株から IS900 が発生しているユークリッドによる系統樹は系統発生的に矛盾があることが示唆された。

同一領域での変異の回数を無視している質的距離は以前 *M. intracellulare* に分類されていた血清型 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 21 が IS 保有株の枝で分断されており、これらの株がまとまっているマンハッタン距離を用いた系統樹がより支持された。

野外株を解析する系統樹推定法として Fitch and Margoliash 法は枝の入れ替え

やクラスター化の順番を入れ替えた補正が実行されるため、処理するアレルプロファイルの数が増えるほど、処理時間は指数的に増加する欠点を有し、実用面を考慮した場合、迅速な近隣結合法との優劣を判断するためにはさらなる野外株を用いた解析が必要である。

図 2 の大部分の組み合わせにおいても血清型 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 21 がさらに 2 つ以上のクラスターに別れることが推測された。Mijs らは鳥類から分離される特定の IS1245-RFLP プロファイルを持った *M. avium* を *M. avium* subsp. *avium* とし、人及び豚から分離される *M. avium* は *M. avium* subsp. *hominissuis* との提案をしている (5)。しかし、本法によって詳細に解析することにより後者はさらに亜種レベルでわけられる可能性が示唆された (図 3)。

E. 結論

豚の非結核性抗酸菌の主要な原因菌のリスク評価には *Mycobacterium avium* に共通して用いることの出来る識別能力の高い簡易な技術が求められている。本研究で検討したヨーネ菌用の VNTR 型別法準用は従来の IS901, IS900, IS1245 あるいは IS1311 などをプローブとした RFLP に比べ簡便であり、しかも血清型別が不可能なラフ型等の株のみならず、血清型別の可能な株においても、血清型別より優れた識別能力を持つことが示唆された。本法を用いて最近の豚、鳥、人、野生動物および環境材料から分離される *M. avium* をコロニーレベルまで詳細に解析することにより、豚の非結核性抗酸菌症のより確かなリスク評価が可能となる。

F. 参考文献等

1. 西森 敬 他 動物衛生研究所研究報告 2002 109:25-32.
2. Nishimori, K. et al. J Clin Microbiol. 1995 33:2102-6.

3. Skuce, R. A. et al. Microbiology. 2002 148:519-28.
 4. McFadden, J. J. et al. Res Microbiol. 1992 143:423-30

5. Mijs, W. et al. Int J Syst Evol Microbiol. 2002 52:1505-18.

表 1. *Mycobacterium avium* の血清型参照株等の VNTR 型別

株名	血清型	挿入配列	各多型縦列反復領域における反復数(MATR:-														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16
Map-1		IS900	1	3	2	0	2	2	2	2	2	2	1	0	2	1	3
Map-2		IS900	1	3	2	0	2	2	2	2	1	2	1	0	2	1	3
Map-3		IS900	1	3	2	0	2	1	2	2	2	2	1	0	2	1	3
Map-4		IS900	1	3	2	0	2	1	2	2	1	2	1	0	2	1	3
Map-5		IS900	1	3	2	0	2	2	2	1	2	2	1	0	2	1	3
P-18		IS901	1	2	1	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	3
Teps		IS901	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	3
P-10		IS901	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1
S-2	2	IS901	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2
S-3	3	IS901	1	2	5	2	3	1	1	2	2	2	1	1	3	2	1
AC-3	3	IS901	1	2	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	3	3	1
S-1	1	IS901	1	2	3	2	3	1	1	2	2	3	1	1	3	2	1
AC-1	1	—	1	2	5	3	2	1	4	2	2	2	3	2	2	2	3
S-10	1 0	—	2	1	5	1	2	1	4	1	2	2	3	2	2	2	2.5
S-5	5	—	2	0	5	2	2	1	4	2	2	2	3	2	2	2	3
S-9	9	—	2	0	5	3	2	1	4	2	2	4	3	2	2	2	3
S-11	1 1	—	1	2	4	3	2	3	4	2	2	2	3	2	2	3	2
S-6	6	—	2	2	5	2	3	3	3	1	2	3	1	1	4	4	2
S-8	8	—	2	2	7	3	3	3	3	4	2	2	3	2	4	5	2.5
AC-21	2 1	—	2	2	4	2	3	3	3	4	2	5	3	2	4	2	2.5
S-4	4	—	1	2	2	2	3	1	3	4	2	4	3	2	4	4	2
TGR-104	1	—	2	2	5	2	3	3	3	4	2	5	3	2	4	4	3
HGDI=			0.45	0.49	0.80	0.65	0.52	0.55	0.78	0.51	0.17	0.47	0.51	0.68	0.72	0.70	0.70

表2. 豚由来 *Mycobacterium avium* における血清型

血清型	株数	全体に占める比率
1	2	3%
2	6	10%
4	7	11%
8	23	37%
9	4	6%
21	5	8%
2,8	1	3%
2,9	1	3%
4,8	2	3%
4,9	1	3%
6,8	1	3%
8,9	1	3%
UT	8	13%
合計	62	

HFDI= 0.82

UT : 型別出来ず。

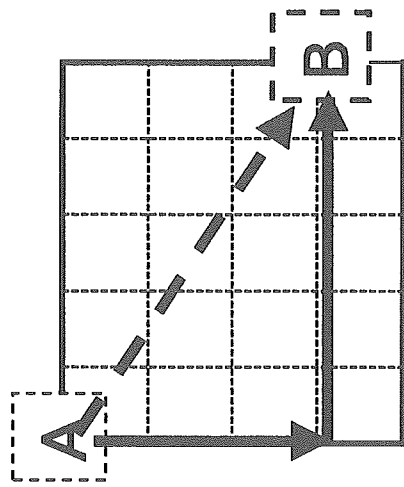
表3. 豚由来 *Mycobacterium avium* の VNTR 型

アリルプロ ファイル名	株数	全体に占 める比率
G14-N6-21	6	10%
G9-N6-8	6	10%
G6-N5-9	5	8%
G12-N4-29	4	6%
G9-N10-8	4	6%
G17-N4-4	4	6%
G4-N3-8	3	5%
G15-N5-1	3	5%
G11-N3-UT	3	5%
G13-N4-8	2	3%
G18-N2-8	2	3%
小計	42	
他20プロ ファイル	1	各2%
合計	62	
HFDI=	0.96	

距離

計算方法

1. 質的： 同じ (0) or 異なる (1)
2. ユークリッド： 形質状態値の差の2乗の和の平方根
-->
3. マンハッタン： 形質状態値の差の絶対値の和
(city-block distance)
->



比較するアレルプロファイルの組合せ

(計算例)

A : 2 2 2 2 2 2 C : 5 3 1 1 1 1 A : 2 2 2 2 2 2
B : 1 1 1 1 1 1 B : 1 1 1 1 1 1 C : 5 3 1 1 1 1

質的距離

6 2 6

ユークリッド距離

2. 4 4. 5 3. 7

マンハッタン距離

6 6 8

図1. 多型縦列反復領域における反復数比較による距離 (非類似度) 算出

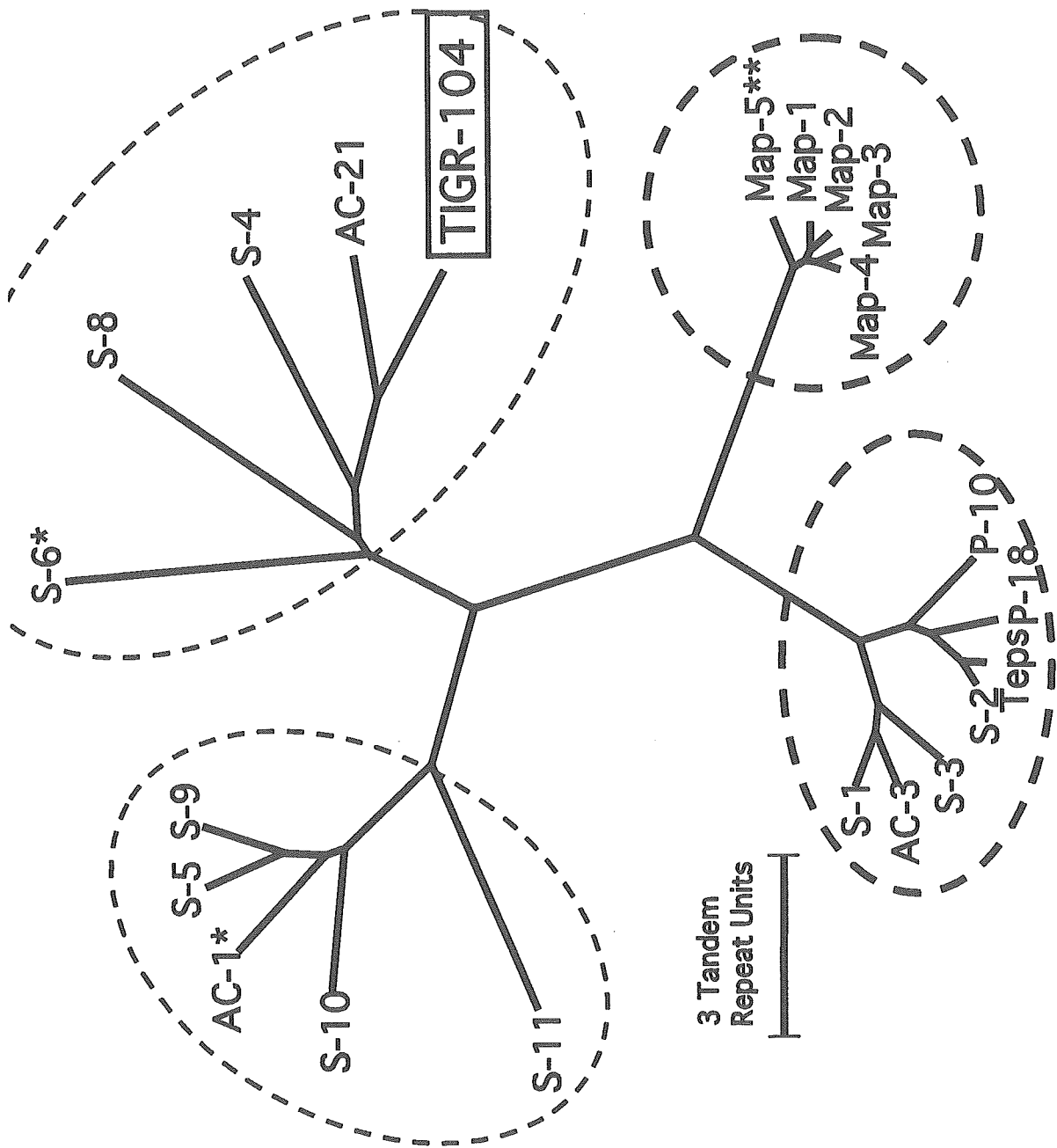


図3. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 及び *M. avium* 血清型参照株等のアレルプロファイルの系統樹解析 (Kitsch) * : *M. avium* の血清型 (S- : Schaefer の Collection, AC- : Tsang らの Authenticated Collection) **: ヨーネーネ菌に検出された VNTR 型 (アレルプロファイル名)

分子時計なし

分子時計仮定

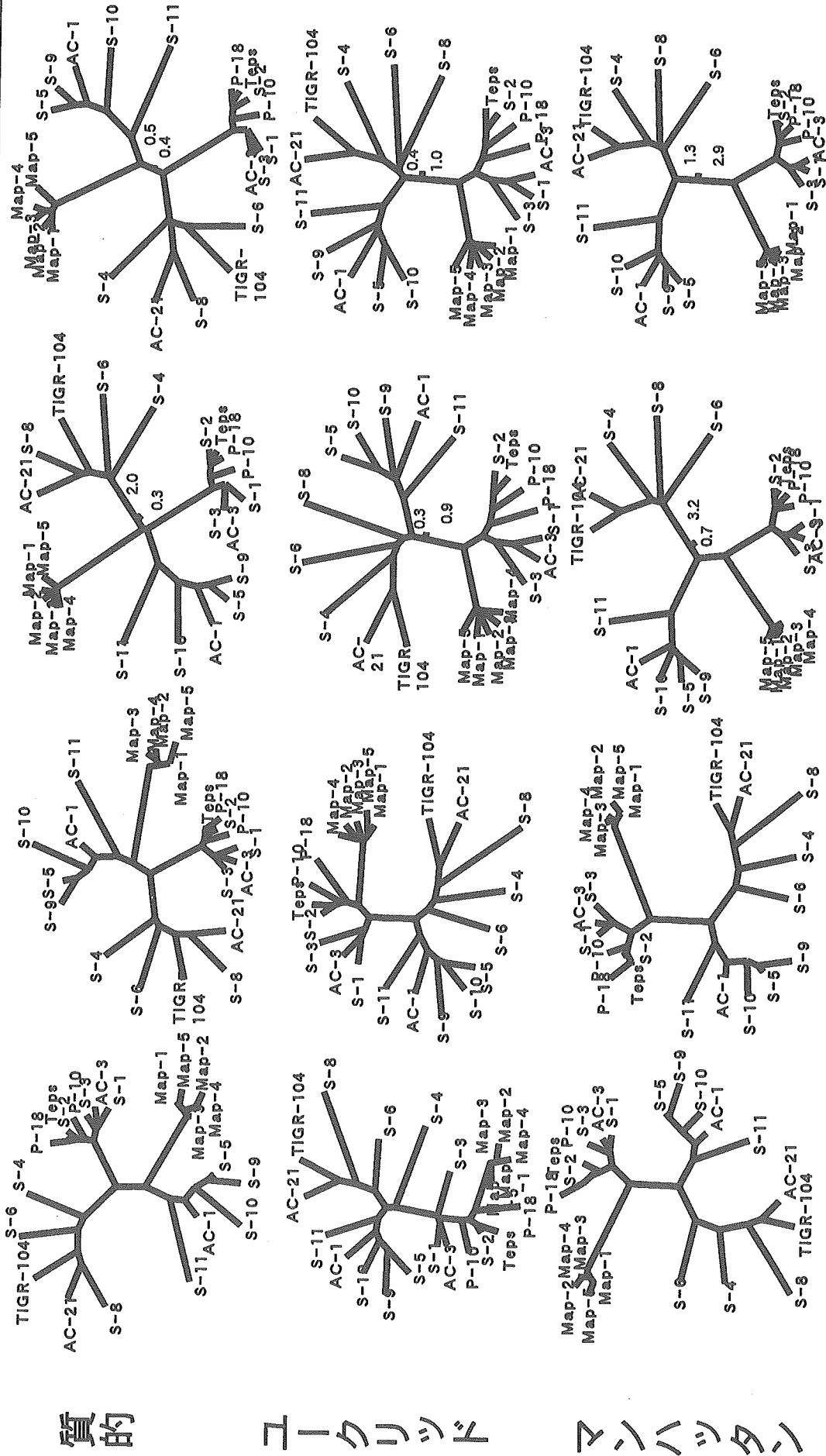


図2. 系統樹推定法の評価

分担研究報告書

食品を介する家畜・家禽疾病のヒトへのリスク評価及びリスク管理に関する研究

骨格筋における Q 熱リケッチア感染細胞の同定とその病態発症機序解明のための
筋細胞培養系の確立

研究協力者 山内啓太郎 東京大学大学院農学生命科学研究科助教授
分担研究者 春日文子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第三室長

研究要旨： Q 熱リケッチアはその感染部位の一つとして筋肉（骨格筋）に感染する。筋肉に感染した Q 熱リケッチアが筋肉内でどのような局在を示すのか、また、感染した Q 熱リケッチアが周囲の細胞に対してどのような影響を及ぼした結果、その病態が発症するのか、という点について検討する上で重要な実験系と考えられる筋細胞の培養系を確立した。

A. 研究目的

Q 熱リケッチアはその感染部位の一つとして筋肉（骨格筋）に感染する。骨格筋は主として多核の筋線維から構成されるが、それに加えて骨格筋内には成長時の筋線維肥大や筋線維の再生に重要な役割を果たす筋衛星細胞が存在する。近年、Q 熱リケッチアと同様に筋肉内に寄生・感染する旋毛虫が、自らが産生する液性因子により筋衛星細胞の性質を変化させ、筋肉内における自己の生存を維持するために都合の良い細胞を作り出す、という極めて興味深い知見が得られている。そこで、本研究では筋肉に感染した Q 熱リケッチアが筋肉内でどのような局在を示すのか、また、感染した Q 熱リケッチアが周囲の細胞に対してどのような影響を及ぼした結果、その病態が発症するのか、という点について検討する上で

重要な実験系と考えられる筋細胞の培養系を確立した。

B. 研究方法

ラット骨格筋（主として背部と後肢から採取）を酵素処理し、単核の筋衛星細胞を得た。これを 10% 牛胎仔血清を含む培地にて培養した。

C. D. 研究結果と考察

培養開始とともに筋衛星細胞は増殖し、筋細胞（筋芽細胞）のマーカである MyoD を発現した。このことから、今回用いた方法により筋細胞へと分化する性質を持った筋衛星細胞が効率よく単離できることが確認された。また、培養時間の経過と共に、増殖した筋芽細胞は互いに融合を開始し、多核の筋管細胞を形成した（図 1）。今回確

立した筋細胞培養系は、筋肉における Q 熱リケッチア感染細胞の同定や、それによる病態発症機序解明の上で有用な系となると考えられる。

E. 結論

感染した Q 熱リケッチアの病態解明に役立てるため、筋細胞の培養系を確立した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

これに関連しては特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

図 1.

ラット骨格筋から単離した筋衛星細胞

(A) 10%ウシ胎子血清を含む培地で培養後4日目の細胞を抗 MyoD 抗体で染色した。ほとんど全ての細胞は単核（筋芽細胞）で MyoD 陽性を示した。(B) 10%ウシ胎子血清を含む培地で3日間培養し、さらに2%ウマ血清を含む培地にて3日間培養したのち、抗ミオシン重鎖抗体で染色した。融合して形成された筋管細胞はミオシン重鎖陽性を示した。

(A)



(B)

