

病原関連遺伝子の保有パターンを指標とした 鶏病原性大腸菌同定法の確立

鹿児島大学共同獣医学部・准教授 藤本 佳万

■ 目 的

鶏大腸菌症は、近年の食鳥処理工程における廃棄羽数増加の主な原因となっており、家禽産業に重大な経済的損失をもたらしている。自然環境中に常在する大腸菌のうち、一部が本疾病を引き起こす Avian Pathogenic Escherichia coli (APEC: 鶏病原性大腸菌) に分類される。近年の研究報告において、複数種類の Virulence-associated gene (VAG: 病原関連遺伝子) を保有する大腸菌が APEC となる可能性が示唆されているが、病原性発現に特に重要となる VAGs やその組合せは明らかではない。本研究課題では、大腸菌のニワトリに対する病原性発現に関連する VAGs の同定を目的として、鶏大腸菌症と診断された病鶏由来菌株の VAGs 保有パターンおよびニワトリに対する病原性を評価するための簡易検査法である鶏胚病原性試験を実施した。

■ 方 法

鹿児島県内の食鳥処理場において鶏大腸菌症と診断され、廃棄されたブロイラーから DHL 寒天培地および XM-G 寒天培地を用いて大腸菌の分離を行った。Ewers ら (Avian Diseases, 2005) が報告した 8 種類の VAGs (*astA*, *iss*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat* および *cva/cvi*) について、分離菌株の保有パターンを調べるため、PCR 法による遺伝子タイピングを実施した。

分離株を寒天培地にて培養後、発育コロニーを生理食塩水にて約 200CFU/0.2ml となるよう希釈調整し、菌懸濁液を 12 日齢 SPF 発育鶏卵に 0.2ml ずつ漿尿膜腔内接種した。接種後 3 日間の観察を行い、鶏胚の致死率を求めた。VAGs の保有による大腸菌の鶏胚病原性への影響について解析するため、統計処理ソフト R (Ver.3.3.2) を用いたロジスティック回帰分析を実施した。

■ 結果および考察

本研究において分離された 67 株の分離株について PCR 法による VAGs の検出を行った結果、13 通りの組合せの VAGs 保有パターンが確認された。鶏胚病原性試験において、これら分離株には、全く致死性の無いものから全胚を死亡させる程高い病原性を示すものまで様々な病原性の大腸菌が含まれる事が示された。ロジスティック回帰分析を実施したところ、分離株の VAGs 保有数は鶏胚病原性に影響しない結果が得られたことから、VAGs 保有数や保有パターンを基に大腸菌の病原性を予測するのは困難であることが示唆された。

次に、各 VAGs の有無における鶏胚病原性への影響を解析した結果、8 種類の VAGs のうち *papC* および *irp2* を保有する分離株は、それら遺伝子を持たない株に対して有意に鶏胚病原性が高く、調整オッズ比はそれぞれ 3.59 (1.39-9.29) および 5.31 (2.10-13.4) であった。以上の結果から、本研究で用いた APEC においては、*papC* および *irp2* が主要な病原性発現因子であることが明らかとなった。今後 *papC* および *irp2* をもつ大腸菌株が成体のニワトリに対して大腸菌症を再現できるかについても感染実験等で検討し、さらに多くの APEC 分離株を用いて病原性因子を決定していく必要があると考えられる。

■ 結 語

本研究において、大腸菌のニワトリに対する病原性発現に重要となる VAGs を同定した。近年多数報告されている病原性関連因子の中から特に重要な遺伝子を同定していくことにより、各地に常在する大腸菌のうち APEC と成り得る菌株を予測し、有効なワクチン対策を実施できることが期待される。