

# 北海道十勝管内において牛から分離された *Campylobacter fetus* の分子疫学的調査

高橋弘康<sup>1)†</sup> 岩田剛敏<sup>2)</sup> 信本聖子<sup>1)</sup> 岡本絵梨佳<sup>1)</sup>  
秋庭正人<sup>2)</sup> 立花 智<sup>1)</sup>

1) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線 59-6)

2) (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2018年12月31日受付・2019年7月2日受理)

## 要 約

2014～2016年、北海道十勝管内で、牛カンピロバクター症による流産事例及び*Campylobacter fetus* 包皮腔内保菌牛を確認したため、疫学調査を行った。流産胎子または包皮腔内由来株と同一、あるいは類似するPFGEパターンを示す*C. fetus* 菌株が、流産牛及び包皮腔内保菌牛、並びに同居牛の糞便中から分離されたことから、糞便が本菌の伝播・維持に重要な役割を果たした可能性が示唆された。また、全31株が1%グリシン添加培地で発育し、亜種*fetus*と同定されたが、病性鑑定マニュアル第4版に記載される亜種特異的PCRでは、7株が亜種*venerealis*と判定された。そこで、近年報告された遺伝子診断法を試みた結果、全株が亜種*fetus*と判定された。

——キーワード：*Campylobacter fetus*, 糞便, 亜種同定。

-----日獣会誌 72, 750～756 (2019)

*Campylobacter fetus* は、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている牛カンピロバクター症の原因菌であり、牛に繁殖障害を起こすだけでなく、人で敗血症、髄膜炎等を引き起こすことが知られている [1]。牛から分離される*C. fetus* は、さらに2種類の亜種*venerealis*と亜種*fetus*に分類される。亜種*venerealis*は保菌雄牛の包皮腔内に終生定着し、交配時に雌牛に感染することで、伝染性低受胎、散発性流産を引き起こす [2]。一方、亜種*fetus*は、おもに牛の腸管内に保菌されているが、胎盤親和性が強く、散発性流産を引き起こすことが知られている [2]。両亜種は遺伝的に非常に近縁であるが、生物学的特徴や感染時の症状等が異なり、亜種同定が防疫上重要である。

家畜衛生及び公衆衛生の両面において、*C. fetus* は重要な病原体であるが、国内における疫学情報は非常に少ない。われわれは、平成26～28年に北海道十勝管内(管内)において、*C. fetus*による牛流産事例及び包皮腔内保菌牛を確認した。本研究では、本菌の浸潤状況及び伝播様式を明らかにすることを目的として分子疫学的調

査を行った。また、その過程で、病性鑑定マニュアル第4版([http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease\\_byousei-kantei2016/index.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_byousei-kantei2016/index.html), マニュアル)に記載される*C. fetus*の亜種特異的PCR [3]の結果と、亜種鑑別の鍵となる性状である1%グリシン添加培地における発育 [3]の結果が異なる事例を複数確認したので、近年報告されている遺伝子診断法を用いて亜種同定を試みた。

## 材料及び方法

**分離事例概要：**管内において、平成26～28年にかけて計6戸9頭の*C. fetus*分離事例を確認した。内訳は、包皮腔内保菌事例が8例、流産事例が1例であった(表1)。

包皮腔内保菌事例は、家畜改良増殖法に基づく検査による分離事例である。管内では、年間約500頭の包皮腔洗浄液を採材、その遠心沈渣をSSM培地 [4]に接種する方法で分離を行っている。平成26年は3戸(農場A, B, C)3頭、平成27年は2戸(農場A, D)3頭、

† 連絡責任者(現所属)：高橋弘康 (北海道網走家畜保健衛生所)

〒090-0008 北見市大正 323-5

☎ 0157-36-0725 FAX 0157-36-5801

E-mail : takahashi.hiroyasu@pref.hokkaido.lg.jp

表1 C. fetus 疫学調査結果

農場	品別	性別	検査個体	材料	採材年月日	分離結果(菌株No.)	疫学情報		
A	乳用牛	雄	a	包皮腔洗浄液	H26.5.27	+(1)	包皮腔内保菌牛(H27.12.21に自主とう汰し、剖検時に各種臓器と腸管内容物等を採材)		
				包皮腔洗浄液	H27.5.22	+(2)			
				包皮腔洗浄液	H27.7.6	+(3)			
				糞便	H27.7.6	+(4)			
				糞便	H27.8.3	+(5)			
				糞便	H27.9.4	+(6)			
				空腸上部	H27.12.21	+(7)			
				空腸下部	H27.12.21	+(8)			
				回盲口から1m	H27.12.21	+(9)			
				回盲口から30cm	H27.12.21	+(10)			
				回盲口から10cm	H27.12.21	+(11)			
				回盲口	H27.12.21	+(12)			
				盲腸	H27.12.21	+(13)			
				結腸	H27.12.21	+(14)			
				直腸	H27.12.21	+(15)			
				心臓	H27.12.21	-			
				肺	H27.12.21	-			
				肝臓	H27.12.21	-			
			脾臓	H27.12.21	-				
			腎臓	H27.12.21	-				
			胆汁	H27.12.21	-				
雄性生殖器	H27.12.21	-							
A	乳用牛	雄	b	包皮腔洗浄液	H27.5.22	+(16)	包皮腔内保菌牛		
				糞便	H27.7.6	+(17)			
				糞便	H27.8.3	+(18)			
				c	糞便	H27.7.6		+(19)	同居牛41頭中の3頭
				d	糞便	H27.7.6		+(20)	
e	糞便	H27.7.29	+(21)						
B	肉用牛	雄	f	包皮腔洗浄液	H26.5.12	+(22)	gと交配歴有		
				包皮腔洗浄液	H28.5.16	+(23)			
				糞便	H28.6.16	-			
		雌	h	膿粘液	H28.6.16	-			
				糞便	H28.6.16	+(24)			
				i	膿粘液	H28.6.16		-	
糞便	H28.6.16	-							
C	肉用牛	雄	j	包皮腔洗浄液	H26.5.27	+(25)	包皮腔内保菌牛		
D	肉用牛	雄	k	包皮腔洗浄液	H27.4.21	+(26)	包皮腔内保菌牛		
E	肉用牛	雄	l	包皮腔洗浄液	H28.5.12	+(27)	包皮腔内保菌牛		
				糞便	H28.6.2	-			
F	肉用牛	雌	m	胎子胃内容	H28.5.16	+(28)	流産事例		
				胎子肺	H28.5.16	+(29)			
				膿粘液	H28.5.26	+(30)			
				n	糞便	H28.5.26		-	
				糞便	H28.6.21	+(31)			

+ : 陽性, - : 陰性

平成28年は2戸(農場B, E)2頭の種雄牛よりC. fetusを分離した。

流産事例は、肉用繁殖農場Fにおいて発生が認められた。平成28年5月14日、当該牛(平成26年5月11日生まれ、交雑種、最終受精卵移植日：平成27年10月2日)が流産した。マニュアルに従い分離培養を実施し、胎子の胃内容、肺及び肝臓よりC. fetusが分離されたため、牛カンピロバクター症と診断した。

浸潤状況調査：包皮腔内保菌事例3戸(農場A, B, E)及び流産事例1戸(農場F)において実施した(表1)。

材料：農場Aでは、平成27年の包皮腔内保菌牛2頭(個体a, b)について、包皮腔洗浄液及び糞便を採材した。個体aでは、糞便から継続してC. fetusが分離されたため、自主とう汰後、臓器等(五大臓器、胆汁、雄性生殖器)及び腸管内容物(空腸上部、空腸下部、回腸、回盲口、盲腸、結腸、直腸)を採材し、体内における本菌の分布を調査した。さらに、同居牛41頭の糞便を採材した。農場Bでは、包皮腔内保菌牛(個体g)の糞便及びgと交配した後、不受胎となった2頭(個体h, i)の糞便及び膿粘液を採材した。農場Eでは、包皮腔内保菌牛(個体l)の糞便を採材した。農場Fでは、流産牛(個体n)の膿粘液を採材するとともに、糞便を採材した。

分離方法：浸潤状況調査におけるC. fetus分離は、マニュアルを一部変更して実施した。包皮腔洗浄液は、遠心(2,000rpm, 10分間, 4℃)上清を、さらに遠心(7,000rpm, 20分間, 4℃)し、その沈渣を孔径0.8µmのセルロースアセテートタイプメンブレンフィルター(DISMIC, アドバンテック東洋株, 東京)でろ過したものを検体とした。膿粘液は、滅菌綿棒で採取した粘液を検体とし、変法スキロー培地EX(日水製薬株, 東京)に塗布後、37℃で3~5日間、微好気培養した。糞便、臓器等はそれぞれ1gを、プレストンカンピロバクター選択増菌培地(関東化学株, 東京)及びボルトン選択増菌ブイヨン(関東化学株, 東京)9mlに接種し、37℃, 24~48時間好気条件下で増菌培養した後、増菌液を変法スキロー培地EX(日水製薬株, 東京)に塗布し、同様に培養した。

同定方法：分離事例概要で示した分離株及び浸潤状況調査で得られた株の菌種同定は、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性の湾曲したグラム陰性桿菌について、硫化水素産生性(TSI培地、栄研化学株, 東京)、蛍光抗体法(牛カンピロバクター病診断用蛍光標識抗体、(国研)農業・産業技術総合研究機構動物衛生研究部門、茨城)及び菌種特異的PCR[5]により実施した。亜種同定は、1%グリシン添加培地での発育、Humら[3]の報告に記載される亜種特異的PCRに加え、Abrilら[6]のPCRにより実施した。本PCRは、両亜種が保有する遺

表2 亜種同定及び分子疫学解析結果

供試菌株	亜種同定					分子疫学的解析					
	性状試験 グリシン 発育	亜種特異的 PCR				MLST	PCR				
		Hum らの方法 <i>cstA</i>	<i>parA</i>	Abril らの方法 <i>nahE</i>	<i>ISCfe1</i>		Kienesberger らの方法				
						<i>wcbK</i>	<i>glf</i>	<i>mat1</i>	<i>sapA</i>	<i>sapB</i>	
基準株 <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> ATCC19438 <sup>T</sup>	-	+	+	+	+	ST4	-	-	+	+	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> ATCC27374 <sup>T</sup>	+	+	-	+	-	ST3	+	-	+	-	+
参照株 <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 822/4	+	+	-	+	-	ST2	-	+	-	+	-
牛由来 <i>C. fetus</i> No. 27 (n=1)	+	+	-	+	-	ST2	-	+	-	+	-
No. 1, 20~23, 26 (n=6)	+	+	+	+	-	ST3	+	-	+	-	+
No. 2~19, 24, 25, 28~31 (n=24)	+	+	(-)*	+	-	ST6	-	+	-	+	-

+ : 陽性, - : 陰性 \* : 1株 (No. 25) を除き陰性

伝子として *nahE* を, 亜種 *venerealis* が特異的に保有する遺伝子として *ISCfe1* を標的としている. なお, 亜種 *venerealis* の基準株として *C. fetus* subsp. *venerealis* ATCC19438<sup>T</sup>, 亜種 *fetus* の参照株及び基準株として, *C. fetus* subsp. *fetus* 822/4 及び ATCC27374<sup>T</sup> をそれぞれ用いた.

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE), 多座遺伝子型別 (MLST) 及び PCR を用いた分子疫学的解析: 管内で分離された牛由来 *C. fetus* 31 株 (表1, 供試株) を用いた. PFGE のサイズマーカーには, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup H9812 株を用い, 秋庭ら [7] の報告を参考にして, プラグを作製した. 供試株は, コロンビア血液寒天培地 (OXOID, U.K.) を用いて 37℃, 18~20 時間微好気培養後, EET (100mM EDTA, 10mM EGTA, 10mM Tris-HCl (pH8.0)) 緩衝液に懸濁し, OD<sub>600</sub> が 1.0 となるように調整した. その後のプラグ作製は, マーカーと同様に行った. プラグの制限酵素処理法として, マーカーには *Xba* I (タカラバイオ株, 滋賀) を用いて 37℃ で, 供試株には *Sma* I (タカラバイオ株, 滋賀) を用いて 30℃ で, 各 6 時間反応させた. なお, 各制限酵素は 1 検体あたり 40U を用い, 総反応液量は 500 $\mu$ l とした. 電気泳動は, PFGE 装置 (CHEF DR-III, Bio-Rad, U.S.A.) を用いて, 電圧 6.0V/cm, パルスタイム 5~50sec の条件下で, 14℃, 22 時間泳動した. 電気泳動像に基づく系統樹解析には, 系統樹作成ソフトウェア (BioNumerics ver7.6, Applied Maths, Belgium) を用いた.

MLST は Bergen ら [8] の報告, PCR は Kienesberger ら [9] の報告に従い実施した. Kienesberger [9] ら

の方法は, 本菌の細胞表面糖鎖である LPS をコードする遺伝子 (*wcbK*, *glf*, *mat1*) 及び菌体表層を覆う S-layer 蛋白をコードする遺伝子 (*sapA*, *sapB*) を標的として PCR を行い, これらの遺伝子の保有状況により, 亜種 *venerealis* (*mat1* 及び *sapA* 遺伝子が陽性) と亜種 *fetus* (*wcbK*, *mat1* 及び *sapB* 遺伝子が陽性のタイプと, *glf* 及び *sapA* 遺伝子が陽性のタイプ) を区分した. 基準株及び参照株は同定方法の項で示した株を用いた.

## 成 績

同定結果: 供試株は, カタラーゼ陽性, オキシダーゼ陽性, TSI 培地による硫化水素産生性が陰性であり, 蛍光抗体法で特異蛍光を認め, 菌種特異的 PCR [5] で特異的なバンドを認めたことから, *C. fetus* と同定した. 分離菌の亜種同定結果を表2にまとめた. 全株が 1% グリシン存在下で発育し, 亜種 *fetus* と同定された. マニュアルに記載されている Hum ら [3] の PCR では, 31 株中 24 株が亜種 *fetus*, 7 株が亜種 *venerealis* と判定された. これに対し, Abril ら [6] の PCR では, 全株が *nahE* 陽性, *ISCfe1* 陰性となり, 亜種 *fetus* と判定された.

分子疫学的解析: 結果を表2及び図に示す. 供試株は, MLST により 3 つの Sequence type (ST) に型別され, ST2 が 1 株, ST3 が 6 株, ST6 が 24 株であった. また, Kienesberger ら [9] の方法では, ST3 の 6 株が *wcbK*, *mat1* 及び *sapB* 遺伝子陽性, ST2 及び ST6 の 24 株が *glf* 及び *sapA* 遺伝子陽性であった. PFGE では同一の ST であっても多様な泳動パターンが得られた.

農場 A では, 包皮腔内保菌牛 2 頭 (個体 a, b) 及び同居牛 41 頭中 3 頭 (個体 c, d, e) の糞便から本菌が

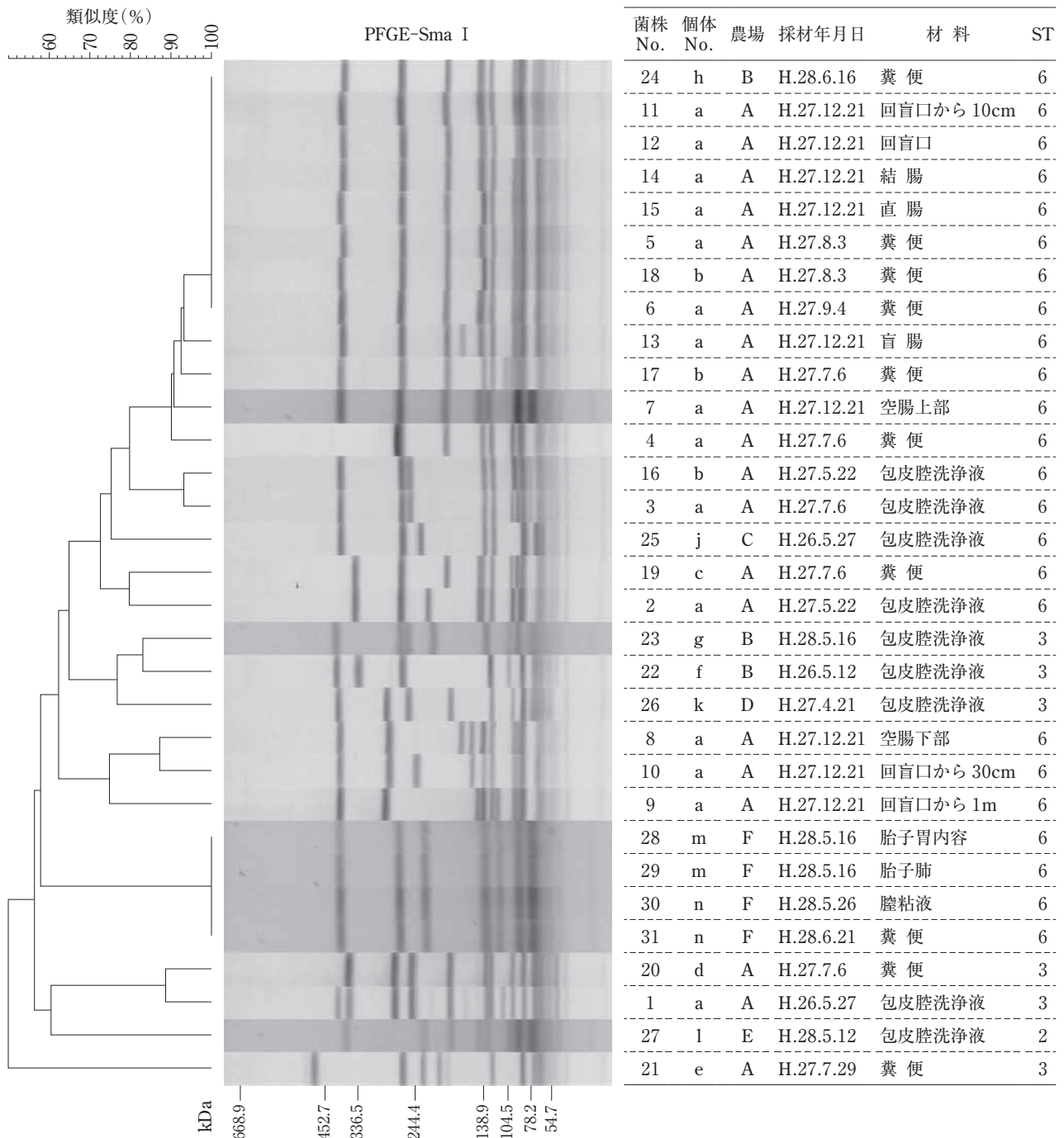


図 牛由来 *C. fetus* 31 株の PFGE パターン

分離された。MLSTの結果、ST3とST6の2タイプが認められ、PFGEでは多様な泳動パターンが認められた。特に個体aでは、同一個体からの分離株にも関わらず複数のパターンが認められ、腸管内容物からの分離株が大きく2つのパターン(No. 7, 11~15またはNo. 8~10)に分かれた。また、異なる個体間の比較では、個体aの糞便由来株(No. 5, 6)と個体bの糞便由来株(No. 18)は同一の泳動パターンを示し、個体aの包皮腔洗浄液由来株(No. 3)と個体bの包皮腔洗浄液由来株(No. 16)は、泳動パターンは異なっていたが、類似

度は94%であった。包皮腔洗浄液由来株と糞便由来株との比較では、個体a, bの包皮腔洗浄液由来株(No. 3, 16)と個体a, bの糞便由来株(No. 4~6, 17, 18)、個体aの包皮腔洗浄液由来株(No. 2)と個体cの糞便由来株(No. 19)、個体aの包皮腔洗浄液由来株(No. 1)と個体dの糞便由来株(No. 20)が、泳動パターンは異なっていたが、それぞれの類似度は80%以上であった。

農場Bにおいて、包皮腔内保菌牛1頭(個体g)の糞便から本菌は分離されなかったが、個体gと交配歴の



あった1頭（個体h）の糞便から本菌が分離された。当該農場で分離された包皮腔洗浄液由来株（No. 22, 23）はST3で、糞便由来株（No. 24）はST6であり、PFGEでも異なる泳動パターンを示した。農場Eにおいて、包皮腔内保菌牛1頭（個体l）の糞便から本菌は分離されなかった。農場Fでは、流産牛（個体n）の糞便及び臍粘液から本菌が分離された。

これらの株は流産胎子（個体m）由来株と同じくST6で、PFGEでも同一の泳動パターンを示した。農場間の比較では、農場Aの個体a, bから分離された腸内容物及び糞便由来株（No. 5, 6, 11, 12, 14, 15, 18）と、農場Bの個体hから分離された糞便由来株（No. 24）のPFGEパターンが一致した。

## 考 察

管内において、平成26～28年にかけて計6戸9頭の*C. fetus*分離事例を確認し、4戸で疫学調査を実施した。分離事例及び疫学的調査により分離された計31株は、全株が亜種*fetus*と同定された。

亜種*fetus*、亜種*venerealis*いずれも交尾感染するが、亜種*fetus*の牛におけるおもな伝播様式は、経口感染と考えられている[10]。経口感染した亜種*fetus*は、一時的に菌血症を引き起こした後、肝臓、肝リンパ節、胆嚢及び小腸等に分布し、妊娠動物では胎盤炎を引き起こす[10]。

農場Aでは類似したPFGEパターンを示す亜種*fetus*が、複数個体の包皮腔洗浄液及び糞便から分離されたことから、糞便に汚染された餌あるいは水を介して感染が拡大し、個体によっては生殖器に移行したものと推察された。さらに、複数農場（農場A及びB）から同一のPFGEパターンを示す亜種*fetus*が分離された。Marcelらの報告では、非常に類似したPFGEパターンを示す亜種*fetus*が異なる農場間で分離された事例において、精液や飼料など特定の感染源から複数農場への伝播や、牛の移動や物品の供用などの農場間伝播の可能性について考察している[11]。

今回の事例では、いずれの要因も見当たらず、感染源・感染経路の詳細は不明であった。経口感染以外の伝播経路として、農場Bでは自然交配を行っており、包皮腔内保菌牛（個体g）と交配した後、不受胎となった2頭のうち1頭（個体h）から亜種*fetus*が分離されたことから、交配による伝播を疑ったが、両分離株（No. 23, 24）は異なるSTを示した。また、農場Fの流産事例では、当該胎子がET産子であったことから、人工授精時に器具等を介して感染した可能性も考えられたが、詳細な感染源・感染経路は不明であった。

一方で、亜種*fetus*は、本調査において多くの糞便材料から分離されたこと、実験的には土壌や糞便中で20

日間、生残するとの報告[12]もあることから、糞便が本菌の伝播・維持に重要な役割を果たしていた可能性が高い。保菌牛の移動自粛や隔離、飼料や水の糞便汚染の防止、清掃や消毒の徹底が、感染の拡大防止、さらには汚染農場の清浄化につながると考えられた。

農場Aでは、平成26年5月から、平成27年12月までの間に、多くの*C. fetus*が分離された。初めに分離された株（No. 1）はST3であり、その後の分離株（No. 2～15）はST6であった。個体aから分離されたST6は多様なPFGEパターンを示し、腸管内容物からの分離株も大きく2つのパターンに分かれていた（図）。

*Campylobacter jejuni*では、単一農場からの分離株が類似しているものの、多様なPFGEパターンを示すことが報告されている[13]。*C. fetus*において、PFGEパターンの異なる菌株の遺伝的距離がどの程度であるのかについては、全ゲノムシーケンス解析等との詳細な比較検討が必要と考えられる。

糞便からの*C. fetus*分離においては、直接培養よりも増菌培養の方がその分離率が高い[14]ことから、本調査では、ボルトン及びプレストン培地を用いて増菌培養を実施し、得られた株を分子疫学的解析に供した。*C. fetus*の疫学調査を実施する場合、その分離率から増菌培養は必須と考えるが、必ずしも糞便中における優性系統とは限らない増殖性の高い株を分子疫学的解析に用いることは、その実態を正確に反映していない可能性もある。

一方、同一の糞便から得られた直接培養由来株と増菌培養由来株についてPFGEを実施した結果、同一の泳動パターンを示した事例（未掲載データ）もあることから、疫学調査の正確性をより高めるため、今後、複数の事例において、直接培養由来株と増菌培養由来株の比較・検討が必要である。また、*C. fetus*では、*C. jejuni*と比較しても疫学調査に用いる分子疫学解析手法が限られている。今後、疫学調査に有用な手法の検討・開発が望まれる。

本調査で分離された株は、1%グリシン存在下での発育試験により全株が亜種*fetus*と同定されたが、Humら[3]のPCRでは7株が亜種*venerealis*と判定された。Humら[3]のPCRでは、両亜種が保有する*cstA*及び、亜種*venerealis*が特異的に保有するとされる*parA*が標的遺伝子であるが、OIE Terrestrial Manual 2018 ([https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.04.04\\_BGC.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.04_BGC.pdf), OIEマニュアル)によると、*parA*を標的としたPCRでは偽陽性、偽陰性例が確認されており、*C. fetus*以外の*Campylobacter*属菌における*parA*の保有も報告されている。

そこで、2007年にAbrilら[6]により報告されたPCRを用いて検討を行った結果、供試株は、いずれも

亜種 *fetus* であるとの結果を得た (表2)。本PCRは、亜種 *venerealis* に特異的な *ISCfe1* を標的としており、Yamazakiら [15] の報告でも同部位を標的としたPCRの有用性が報告されている。また、分子疫学的手法であるMLST [8] や Kienesbergerら [9] の方法でも、本研究で分離された株は亜種 *fetus* であるとの結論を得た。

MLST [8] は、亜種 *venerealis* は主としてST4、まれにST7とST12に型別され、*C. fetus* の亜種同定に有用であると報告されている。しかし、どの手法においても少数ではあるが偽陽性あるいは偽陰性例が報告されており [9] (OIE マニュアル)、今後、さらなるデータの蓄積が必要と考える。

本調査で分離された亜種 *fetus* のST3は、全株がHumら [3] のPCRで亜種 *venerealis* と誤同定された。また、それらの株は異なるPFGEパターンを示し、一部は類似度が60%以下となっていたことから、遺伝的な均一性は高くないと考えられる (図)。

上述したように、Humら [3] のPCRにおける誤同定例はすでに海外で報告されているが、特定の遺伝的系統との関連性については報告がない。わが国における *C. fetus* の保菌状況は、品川ら [16] が、肉牛及び乳牛のそれぞれ6.6%、1.6%が腸管内に保菌、Enokimotoら [17] が、肉牛の29.6%が胆汁中に保菌していたと報告している。国内に分布する *C. fetus* の遺伝的系統を調査した報告は見当たらず、本調査で確認された特徴を有するST3が、本調査地域に限局しているのか、全国的に拡散しているのかについては不明である。今後は、全国的な疫学調査が望まれるとともに、その知見に基づいた予防・治療方法の検討・確立が必須である。

## 引用文献

- [1] 今田由美子：カンピロバクター病，人獣共通感染症，清水実嗣監，178-183，養賢堂，東京（2007）
- [2] 菊池直哉：牛カンピロバクター症，動物の感染症，明石博臣編，第3版，121-122，近代出版，東京（2011）
- [3] Hum S, Quinn K, Brunner J, On SLW : Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies, Aust Vet J, 75, 827-831 (1997)
- [4] 小野一晃，大塚佳代子，斎藤章暢，青木敦子，正木宏幸，徳丸雅一：改良半流動培地を用いたカンピロバクターの分離，日獣会誌，49, 405-407 (1996)
- [5] Oyarzabal OA, Wesley IV, Harmon KM, Schroeder-Tucker L, Barbaree JM, Lauerman LH, Backert S, Conner DE : Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA, Vet Microbiol, 58, 61-71 (1997)
- [6] Abril C, Vilei EM, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R : Discovery of insertion element *ISCfe1*: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation, Clin Microbiol Infect, 13, 993-1000 (2007)
- [7] 秋庭正人：パルスフィールドゲル電気泳動による腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析法，獣医畜産新報，53, 14-21 (2000)
- [8] van Bergen MAP, Dingle KE, Maiden MCJ, Newell DG, van der Graaf-van Bloois L, van Putten JPM, Wagenaar JA : Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing, J Clin Microbiol, 43, 5888-5898 (2005)
- [9] Kienesberger S, Sprenger H, Wolfgruber S, Halwachs B, Thallinger GG, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Zechner EL, Gorkiewicz G : Comparative genome analysis of *Campylobacter fetus* subspecies revealed horizontally acquired genetic elements important for virulence and niche specificity, Plos One, 9, e85491 (2014), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887049/>), (accessed 2018-04-18)
- [10] Blaser MJ, Newell DG, Thomson SA, Zechner EL : Pathogenesis of *Campylobacter fetus*, *Campylobacter*, Nachamkin I, et al eds 3rd ed, 401-428, ASM Press, Washington DC (2008)
- [11] van Bergen MAP, van der Graaf-van Bloois L, Visser IJR, van Putten JPM, Wagenaar JA : Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis, Vet Microbiol, 112, 65-71 (2006)
- [12] Blaser MJ, Hardesty HL, Powers B, Wang WLL : Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus, J Clin Microbiol, 11, 309-313 (1980)
- [13] Wassenaar TM, Geilhausen B, Newell DG : Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry, Appl Environ Microb, 64, 1816-1821 (1998)
- [14] Atabay HI, Corry JEL : The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods, J Appl Microbiol, 84, 733-740 (1998)
- [15] Yamazaki W, Taguchi M, Misawa N : Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, Microbiol Immunol, 54, 398-404 (2010)
- [16] 品川邦汎：カンピロバクターをめぐる最近の話題，牛の内臓肉（肝臓）の汚染とその防止，獣医畜産新報，60, 895-899 (2007)
- [17] Enokimoto M, Kubo M, Bozono Y, Mieno Y, Misawa N : Enumeration and identification of *Campylobacter* species in the liver and bile of slaughtered cattle, Int J food Microbiol, 118, 259-263 (2007)

Molecular Epidemiology of *Campylobacter fetus* Isolates from Cattle  
in the Tokachi Area of Hokkaido, Japan

Hiroyasu TAKAHASHI<sup>1)†</sup>, Taketoshi IWATA<sup>2)</sup>, Kiyoko NOBUMOTO<sup>1)</sup>,  
Erika OKAMOTO<sup>1)</sup>, Masato AKIBA<sup>2)</sup> and Satoshi TACHIBANA<sup>1)</sup>

1) *Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen Kawanishi, Obihiro, 089-1182, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

*Campylobacter fetus* is recognized as a causative agent of ruminant abortion, and sepsis and meningitis in humans. This study investigated *C. fetus* infection status and the mode of pathogen transmission in farms in the Tokachi area of Hokkaido. An epidemiological survey was conducted to determine the prevalence of *C. fetus* in cattle farms. *C. fetus*-associated abortion in cattle and carriage of *C. fetus* in preputial cavities were observed in this area from 2014 to 2016. The bacteria were isolated from the feces of a cow that underwent an abortion, bulls, and a cow and bulls from the same stable. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of the isolates were similar to those of isolates from aborted fetus and preputial samples, suggesting that feces played an important role in the transmission and persistence of *C. fetus* in the investigated farms. All 31 *C. fetus* isolates were identified as *C. fetus* subsp. *fetus* based on 1% glycine tolerance, a key feature of this subspecies, and several recently published molecular methods for *C. fetus* subspecies identification. However, 7 of the isolates were identified as *C. fetus* subsp. *venerealis* using an alternative PCR assay targeting the subspecies-specific gene *parA*. These results indicate that the PCR assay targeting for *parA* was not suitable for *C. fetus* subspecies differentiation in this setting. — Key words : *Campylobacter fetus*, feces, subspecies identification.

† Correspondence to (Present address) : Hiroyasu TAKAHASHI (Hokkaido Abashiri Livestock Hygiene Service Center)  
323-5 Taisho, Kitami, 090-0008, Japan  
TEL 0157-36-0725 FAX 0157-36-5801  
E-mail : takahashi.hiroyasu@pref.hokkaido.lg.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 750 ~ 756 (2019)