

7 消費者に向けた家畜保健衛生所のアプローチ

県中央家畜保健衛生所

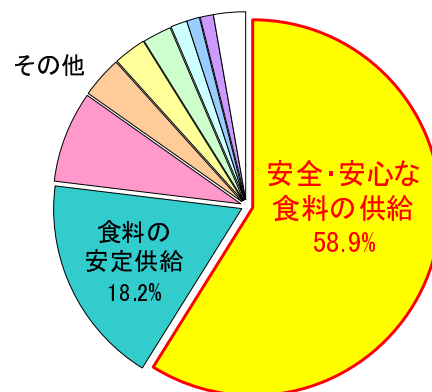
田村 みず穂 牧野 敬
久末 修司 前田 卓也

はじめに

家畜保健衛生所（以下、家保）の主要業務は、畜産農家を対象にした家畜伝染病の発生子防及びまん延防止や家畜の飼養衛生管理の指導であり、家畜衛生の向上を図り、畜産の振興に努めてきた。さらに平成8年度のO157による食中毒や平成13年度の牛海綿状脳症（以下、BSE）、平成15年度の高病原性鳥インフルエンザ（以下、HPAI）の国内発生などにより生産現場における食の安全・安心確保の取り組みとして、死亡牛のBSE検査や飼料の安全性確保対策の指導、農場HACCPの指導などを実施してきた。このような取り組みを実施する背景には、食に関する様々な問題が顕在化する中で、消費者の食の安全・安心への関心が高まっていることがあげられる。

神奈川県県民局が行っている県民ニーズ調査¹⁾

では、県民の約6割が、農業に「安全・安心な食料の供給」を期待している（図1）。平成13年度以降畜産分野では、BSEやHPAI、口蹄疫などの国内発生が続いており、この期待は畜産業へも向けられている。畜産物の安全・安心の確保は消費者と生産者が互いの状況を理解し協力して取り組むことが重要である。そのため畜産農家だけでなく消費者にも家畜衛生に対して、



平成22年度県民ニーズ調査より

図1 「農業にどのような役割を期待しますか」

理解を深めてもらう必要がある。特に、神奈川県は農場周囲で都市化が進んでいることや、農家が直売やイベント等を通して消費者と接する機会が多い環境にあり、消費者にとって農家は身近な存在で

ある。

そこで、家保が畜産農家でやっている衛生対策について家保から消費者へ情報提供し家畜衛生について理解してもらうことにより、畜産物の安全・安心へとつなげてもらおうと考え（図2）、県央家畜保健衛生所施設公開とかながわ食の安全・安心基礎講座を実施したので紹介する。

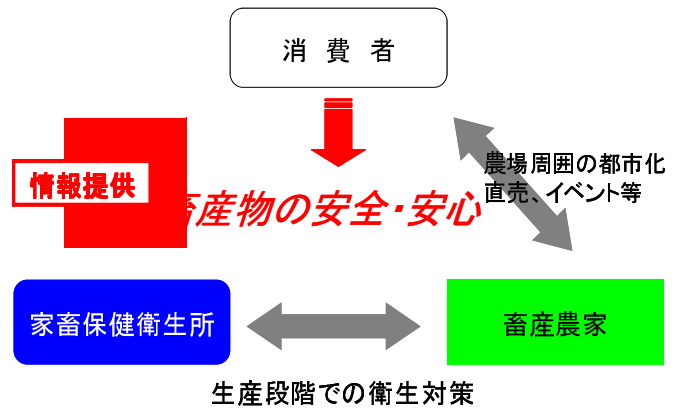


図2 消費者へのアプローチ

県央家畜保健衛生所施設公開



写真1 県央家畜保健衛生所施設公開

家保の施設公開は平成21年度の家保再編整備を契機に、県農業技術センター畜産技術所とともに「家畜に親しむつどい」の一部として消費者へ向けて年1回開催している（写真1）。施設公開の来所者は平成21年度319名、平成22年度513名、平成23年467名と天候の影響もあり年度間でばらつきはあるものの、3年間で約1,300名近くであった。

1 公開内容

施設公開の内容は家保業務を理解してもらうことを目的として、毎年内容を変更及び追加しているが、平成23年度は、所内の入り口に近いところに県の畜産や家畜伝染病予防法にかかわる検査などについて業務説明パネルを展示し、その前の机に実際に業務で使用する注射器や保定器、シャーレやピペットなどの器具・器材を並べ、自由に触れられるコーナーを設けた（写真2、左上）。また、「牛のおいたちを調べよう」と題し、パソコンや携帯電話を使用して実際に牛の個体識別情報を検索してもらい、トレーサビリティ制度について知ってもらった。「顕微鏡をのぞいてみよう」では、グラム染色した大腸菌とブドウ球菌を顕微鏡で観察してもらった。身近で一般的な細菌に興味をもった人が多く、特に大人に人気が高かった（写真2、右上）。その他、獣医師体験ができる催しでは「牛の直腸検査を体験してみよう」として牛の模型を用いた直腸検査の体験（写真2、左

下)、「鶏の心拍数を調べよう」として生きた鶏の聴診を実施したほか(写真2、右下)、防疫服や白衣、面布を着て写真撮影できる「フォトポイント」を設置し、子供も楽しみながら参加できるよう工夫した。また、展示物全体を題材とした、「家保探検クイズ」を作成し入り口で来所者に配布し、展示物にも興味をもって参加してもらえるようにした。



写真2 実施内容

2 アンケート調査の実施

今年度からの取り組みとして、来所者に施設公開の内容の理解度を把握するため、アンケート調査を実施した。アンケートは来所者の項目および催しものや家保業務について選択式の問いを設けた(図3)。アンケート用紙は、来所者のグループごとに150枚配布し、138枚を回収した。回収率は92%だった。なお来所者に関する項目以外はそれぞれのグループの代表者の意見を回答してもらった。

アンケート調査の結果、平成23年度の来所者の年齢別構成は、40代男女が87名と最も多く、10歳未満が76名、30代が70名となり、家族づれが多く訪れていた(図4)。

催し物の中で良かったものは、「家保探検クイズ」が25.8%と最も多く、続いて「顕微鏡を

のぞいてみよう」が23.7%、「鶏の心拍数を調べよう」が15.9%だった。楽しみながら参加できるものや、実際に体験できるものが人気を集めた（図5）。

家畜保健衛生所施設公開 アンケートのお願! 2011.10.23

本日は当所の施設公開に来ていただき誠にありがとうございます。今後の参考とさせていただきますため、アンケートにご協力をお願いいたします。

問1 性別と年代を教えてください。複数で来られた場合は、まとめて人数を記入してください。

	10歳未満	10代	20代	30代	40代	50代	60代	70代	80歳以上
男性									
女性									

問2 どちらから来られましたか?
 1. 海老名市 2. 県内その他 ()
 3. 他県 ()

問3 当所の施設公開を何でお知りになりましたか?
 1. ちらし 2. 県のホームページ 3. その他 ()

問4 過去にも来られたことはありますか?
 1. 初めて 2. 2回目 3. 3回目

問5 本日の催し物で良かったものは何ですか? (複数回答可)

- 家保探検クイズ
- 器具器材などの展示物
- 知ってみよう～「牛のおいたちを調べよう」～
- 顕微鏡をのぞいてみよう
- ぼくも！わたしも！獣医さん～フォトポイント～
- ぼくも！わたしも！獣医さん～鶏の心拍数を調べよう～
- 牛の直腸検査を体験してみよう (雨天中止)
- その他 ()

問6 家畜保健衛生所の存在を知っていましたか?
 1. 知っていた 2. 知らなかった

問7 問6で「1. 知っていた」と回答した方にお尋ねします。家畜保健衛生所の存在を何で知りましたか? (複数回答可)

- 口蹄疫の報道 2. 鳥インフルエンザの報道
- BSE (牛海綿状脳症)の報道 4. その他 ()

問8 問6で「2. 知らなかった」と回答した方にお尋ねします。当所に来所する前と比べると家畜保健衛生所の業務について理解は深まりましたか?
 1. とても深まった 2. ある程度深まった 3. あまり変わらなかった

問9 問8で「1. とても深まった」「2. ある程度深まった」と答えた方にお尋ねします。何について理解が深まりましたか? (複数回答可)

- 家畜の伝染病予防のための検査 2. 畜産環境の対策
- 獣医事・養子の指導 4. 神奈川の畜産
- その他 ()

問10 今後、家畜保健衛生所についてどのようなことを知りたいですか? (複数回答可)

- 家畜の伝染病予防のための検査 (牛) 2. 家畜の伝染病予防のための検査 (豚)
- 家畜の伝染病予防のための検査 (鶏) 4. 家畜の伝染病予防のための検査 (みづぼも)
- 口蹄疫対策 6. 鳥インフルエンザ対策
- BSE (牛海綿状脳症) 対策 8. 食の安全・安心
- 畜産環境の対策 10. 獣医事・養子の指導
- その他 ()

ご協力ありがとうございました
 神奈川県県央家畜保健衛生所

図3 アンケート調査用紙

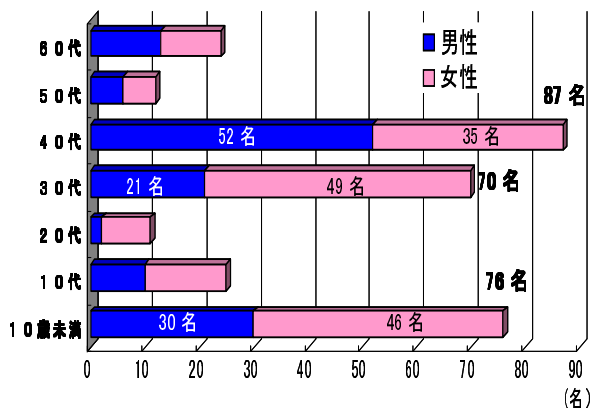


図4 来所者の年齢構成

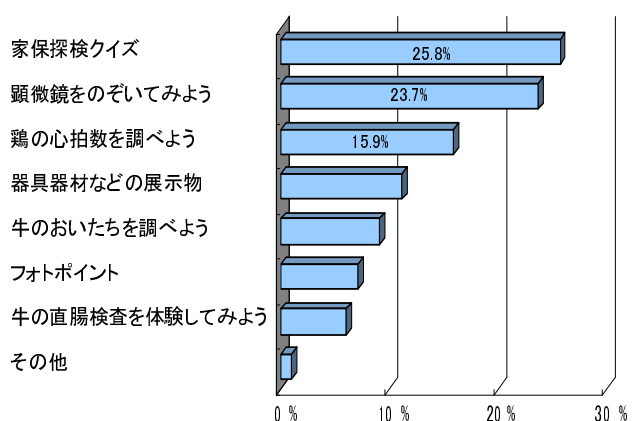


図5 人気のあった催し

家保については、来所者の45.7%が「家保の存在を知っていた」と答え、そのきっかけとして多くの人が口蹄疫や鳥インフルエンザ、BSEの報道をあげた。家保を知らなかった人に対して「来所する前と比べると家保の業務について理解は深まりましたか」と聞いたところ、97.9%が家保の業務について「理解が深まった」と答えた。その中でも、「家畜伝染病予防のための検査」が38.5%と最も理解が得られたことが分かった（図6）。

「今後、家保についてどのようなことを知りたいですか」という問いには、20.7%が「食の安全・安心」と答え、消費者の関心の高さが伺えた。ついで「鳥インフルエンザ対策」が15.7%で

あった（図7）。

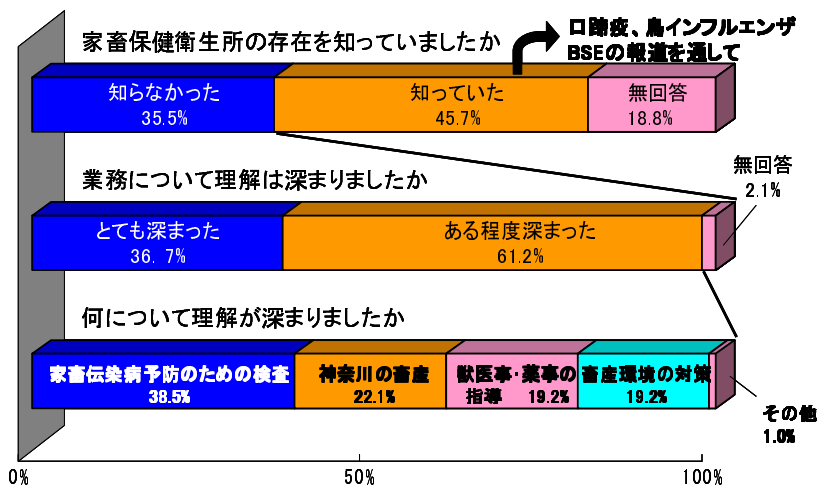


図6 家畜保健衛生所について

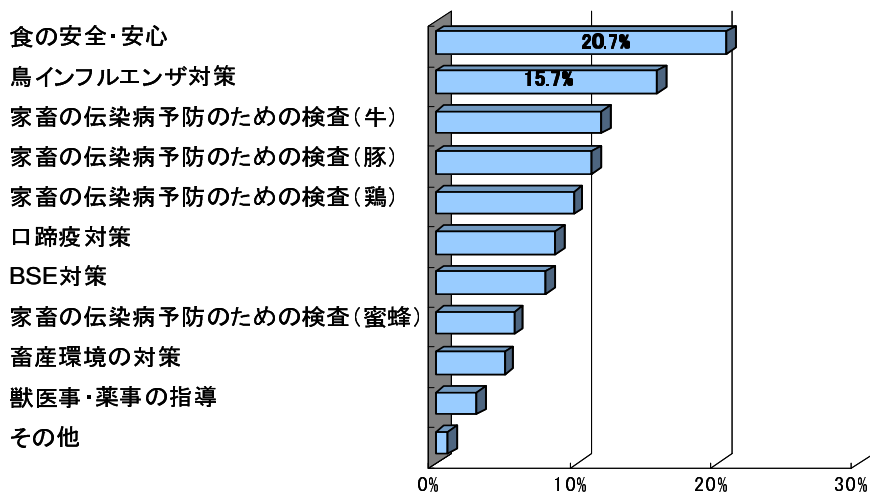


図7 今後知りたいこと

かながわ食の安全・安心基礎講座

平成22年度は、「かながわ食の安全・安心基礎講座」を開催した。これは神奈川県食の安全・安心推進会議と連携した全庁的な取り組みの一環で実施したもので、消費者へ向けて食の安全・安心に関する基礎的な情報を発信し、情報の共有化を図る講座である²⁾。家保職員が「健康な家畜の生産と家畜保健衛生所の仕事」と題し、家保業務および口蹄疫についての講義や家保の施設見学、質疑応答を行った（写真3）。終了後のアンケート調査結果から30代、40代、60代がそれぞれ25%ずつ参加して

いることが分かった。「家畜保健衛生所についてご存じでしたか」との問いに対しては、約40%が「知らなかった」と答えたが、全ての人がこの講座を受講し、健康な家畜の生産について「理解が深まった」と答えた。



写真3 かながわ食の安全・安心基礎講座

まとめ

家保は畜産物の安全性を確保するため、畜産農家とともに家畜衛生対策に取り組んできた。しかし、家畜衛生をとりまく情勢の変化から消費者へ視点を移した畜産物の安全・安心の確保も重要になっている。今回、家保が消費者に施設公開や講座を通して生産段階での衛生対策について情報提供した。その結果、消費者に畜産農家や家畜衛生の正しい知識を知ってもらうとともに家保業務について理解を深めてもらうことができ、畜産物の安全・安心の理解へとつなげることができた（図8）。

一方消費者が、今後消費者が知りたいこととして、「食の安全・安心」を最も多くあげられたことから引き続き、消費者との意見交換の場を設けるなど情報の共有化を図り、畜産農家が行っている飼養衛生管理基準の遵守や農場HACCPへの取り組みが食の安全・安心につながっていることを施設公開などを通じて理解してもらえよう努めていきたい。

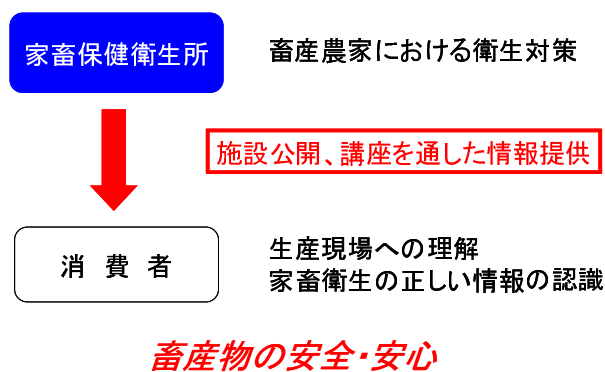


図8 まとめ

引用文献

- 1) 神奈川県環境農政局企画調整部：わたしたちの暮らしと神奈川の農林水産業（平成23年度版）
- 2) 神奈川県保健福祉局生活衛生部：かながわ食の安全・安心行動計画（平成22年度版）

8 管内一養豚場で確認された豚皮膚炎腎症症候群（PDNS）

湘南家畜保健衛生所

平野 幸子 荒木 悦子
和泉屋 公一 稲垣 靖子

はじめに

豚皮膚炎腎症症候群（以下PDNS）は主に育成豚及び肥育豚に発生し、発症率は1%以下、死亡率は90日齢以上で100%近いが、45～90日齢では30%程度である。重症例では発症後数日以内に死亡する。特徴的症狀は皮膚における不定形な赤紫色斑または丘疹の形成で、解剖所見では腎臓の腫大、褪色及び点状出血や全身リンパ節の腫脹が認められる。病理組織学的には全身性の壊死性血管炎と線維素性糸球体腎炎を特徴とし、これらの組織所見をもってPDNSと診断される。本病は臨床及び解剖所見が豚コレラのそれと類似することから防疫上重要な疾病とされている。PDNSは免疫複合体が関与したⅢ型アレルギーによる疾病と考えられており、原因抗原として豚サーコウイルス2型（以下PCV2）、豚繁殖・呼吸障害症候群（以下PRRS）等の関与が疑われているが、未だに明らかにされていない。¹⁾³⁾

平成23年11月に、皮膚病変と発育不良を呈した豚に遭遇し、病性鑑定の結果、PDNSと診断した症例について、その概要を報告する。

発生の概要

管内の繁殖雌豚360頭規模一貫経営農場で、平成22年4月から皮膚に赤紫色斑が認められる発育不良の個体が90～180日齢の肥育豚に年間6頭程度確認されていた。稟告によると、この皮膚病変は痂皮化し、徐々に消失して、発育は遅れるものの死亡せず経過するとのことであった。

平成23年11月、皮膚病変が認められる個体が3頭確認され、うち2頭は痂皮化進んでおり、うち1頭は赤紫色斑が顕著に認められたため、PDNSを疑い病性鑑定を実施した。なお、肥育豚へのワクチンはマイコプラズマ（7、21日齢）、PCV2（50日齢）、豚丹毒（60、90日齢）、豚胸膜肺炎（60、90、120日齢）を接種していた。

材料と方法

1 材料

雑種、去勢、180日齢の肥育豚1頭を放血殺後、病性鑑定に供した。

2 方法

(1) ウイルス学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、肺、扁桃、肺門リンパ節、肝門リンパ節、脳を材料にC P K細胞を用いて、ウイルス分離を実施した。肺、扁桃、肺門リンパ節、鼠径リンパ節、浅頸リンパ節を材料にPCRにより、PRRSウイルス遺伝子検索、PCV2遺伝子検索及びPCV2遺伝子型判別を実施した。また、扁桃を用いて豚コレラFA法を実施した。

(2) 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、肺、腹水、浅頸リンパ節、腸間膜リンパ節、脳について β -NAD加めん羊血液寒天培地、馬血液寒天培地、DHL寒天培地を用いた好気及び微培養を、37°Cにて48時間実施した。

(3) 血液・生化学的検査

自動血球計数装置により赤血球、白血球、Ht値を測定した。また、生化学自動分析測定装置によりBUN、CREを測定した。

(4) 病理組織学的検査

大脳、小脳、脊髄、肺、心臓、膵臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、消化管、皮膚、扁桃、リンパ節を10%中性緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋後薄切し、常法に従いHE染色、PTAH染色、を実施した。また、免疫組織化学的染色をPCV2について実施した。

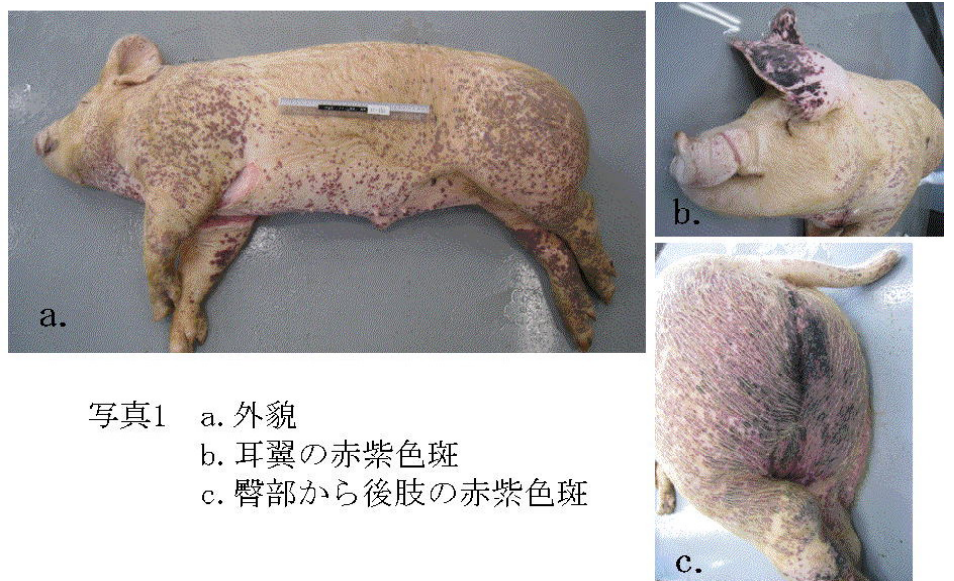


写真1 a. 外貌
b. 耳翼の赤紫色斑
c. 臀部から後肢の赤紫色斑

成 績

1 外貌・剖検所見

発育不良で、全身の皮膚に主に1cm以下の不定形の赤紫色斑や丘疹が多数みられ、一部痂皮を認めた。また、耳翼及び臀部から後肢では融合した赤紫色斑がみられ、一部黒褐色を呈していた(写真1)。主要リンパ節は腫大し(写真2)、腎臓は腫大し点状出血も認められた(写真3)。また、胃においては粘膜が容易に剥離し、噴門部で出血が認められ、盲腸では粘膜に点状出血がみられた(写真4)。



写真2 主要リンパ節・扁桃・副腎



写真3 腎臓：腫大・点状出血

2 ウイルス学的検査

PCR検査で、鼠頸、浅頸及び肺門リンパ節、肺、扁桃からPCV2特異遺伝子が検出され、遺伝子型はGenotype2B-2E型と確認された。また、PRRSウイルス特異遺伝子については陰性、豚コレラはFA(蛍光抗体法)法で陰性であった。

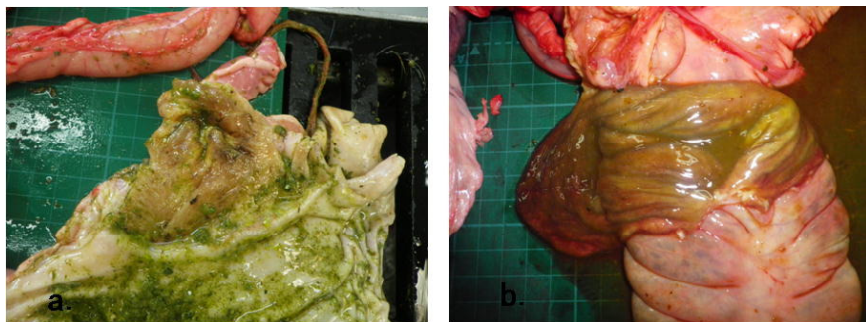


写真4 a. 胃：粘膜の剥離、噴門部の出血
b. 盲腸：粘膜の点状出血

3 細菌学的検査

脳、肝臓、脾臓、腎臓、肺、腹水、浅頸リンパ節、腸間膜リンパ節から有意な菌は分離されなかった。

4 血液・生化学的検査

血液検査では、赤血球 480 万/ μ l、白血球 20,100/ μ l、Ht 値 30.0 %であった。生化学的検査では、BUN > 140.0 mg/dl、CRE 18.8 mg/dl と高値であった。

5 病理組織学的検査

表皮から真皮にかけて出血、壊死、炎症性細胞の浸潤がみられた (写真5)。

腎臓ではボーマン嚢への線維素の析出が瀰漫性に観察され、出血がみられた (写真6)。

脾臓では、中心動脈に壊死がみられ、周囲にマクロファージや好酸球の軽度の浸潤がみられた (写真7)。

肺門リンパ節ではリンパ球が中程度減数し、多核巨細胞がみられ、マクロファージや好酸球の浸潤がみられた (写真8)。

またPCV2の免疫組織学的染色を実施したところ、PCV2陽性抗原が検出された (写真9)。

この他腸間膜リンパ節、鼠頸リンパ節でリンパ球が軽度減数し、多核巨細胞が散見された。PCV2抗原は他に腸間膜リンパ節でもみられた。

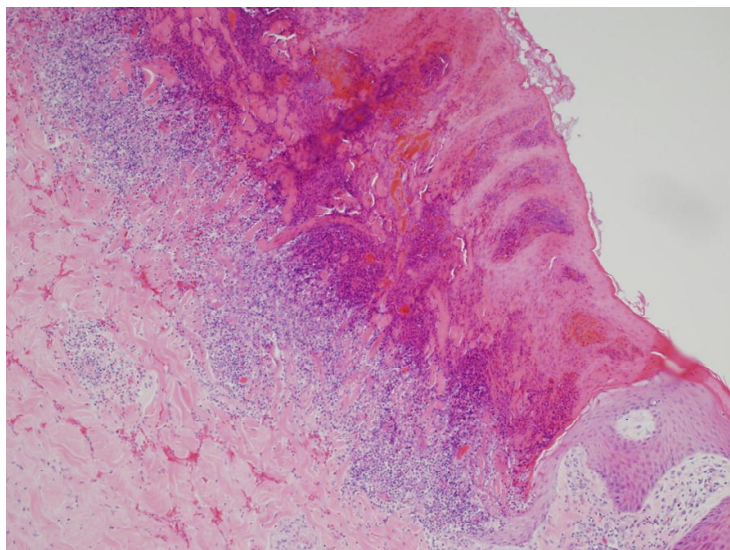


写真5 腹部皮膚：出血性壊死性皮膚炎 (HE 染色)

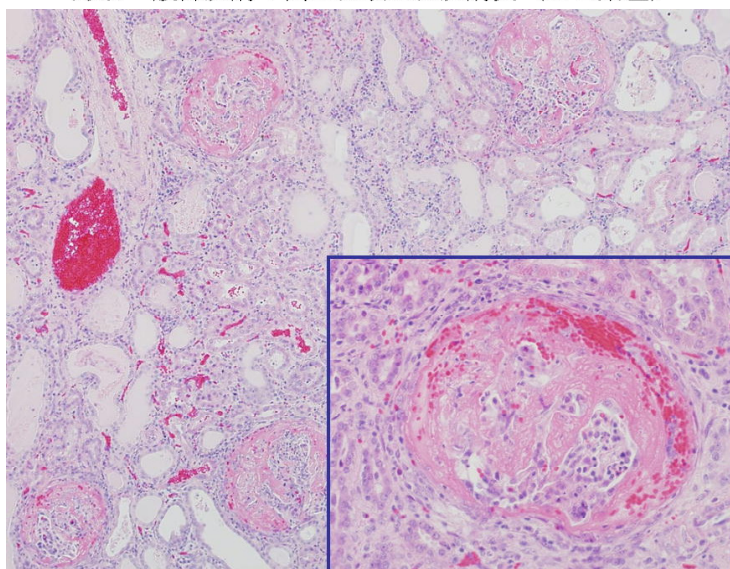


写真6 腎臓：線維素性糸球体腎炎 (HE 染色)

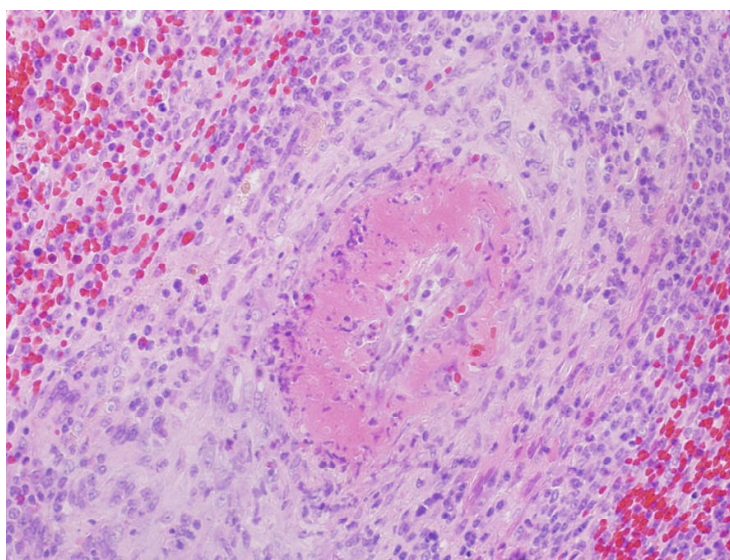


写真7 脾臓：壊死性血管炎 (HE 染色)

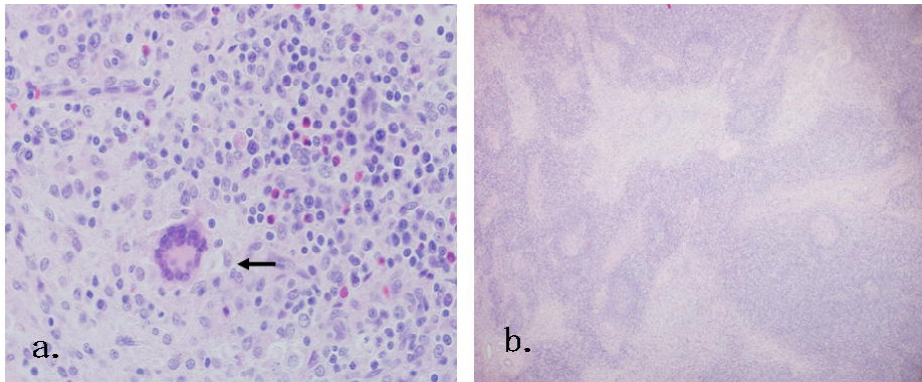


写真8 a. 肺門リンパ節：多核巨細胞（H E 染色）
b. 肺門リンパ節：リンパ球の減数（IIE 染色）

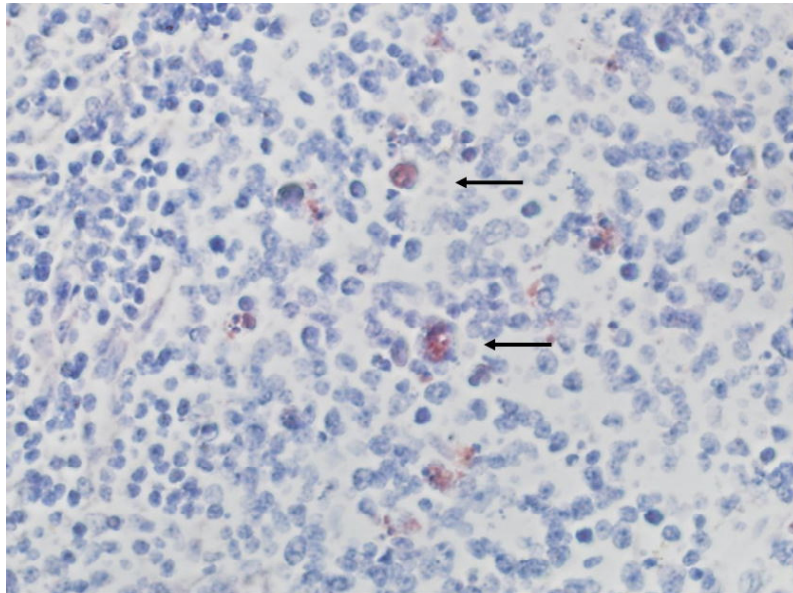


写真9 肺門リンパ節のPCV2抗原
(免疫組織学的染色)

病性鑑定結果

本症例は、全身の皮膚に不定形の赤紫色斑や丘疹、腎臓に点状出血がみられ、組織学的に出血性壊死性皮膚炎、線維素性糸球体腎炎、脾臓において壊死性血管炎がみられたことから、PDNSと診断した。

本農場の日齢別検査

本農場のPCV2及びPRRSの状況を把握するため、病性鑑定を実施した2週間前に採血した保存血を用いて、30日齢、60日齢、90日齢、120日齢、150日齢の各5頭についてPCR検査、抗体検査を実施した。PCV2は50、90日齢で5頭中1頭PCR陽性を確認し、PRRSは120日齢でPCR陽性、150日齢で5頭とも抗体陽性を確認した（表1）。

表1 肥育日齢別検査成績

日齢	検査頭数	PCV2	PRRSV	
		PCR検査	抗体検査	PCR検査 (プール血清)
30	5	0/5	2/5	-
50	5	1/5	0/5	-
90	5	1/5	0/5	-
120	5	0/5	0/5	+
150	5	0/5	5/5	-

まとめ

管内の繁殖雌豚360頭規模一貫経営農場で、平成22年4月から皮膚に赤紫色斑が認められる発育不良の個体が散発的に発生、稟告によると、この皮膚病変は痂皮化し、徐々に消失して、発育は遅れるものの死亡せず経過するとのことであった。平成23年11月、皮膚病変が認められる個体が3頭確認され、PDNSを疑い病性鑑定を実施したところ、全身の皮膚に不定形の赤紫色斑や丘疹、腎臓に点状出血がみられ、組織学的に出血性壊死性皮膚炎、線維索性糸球体腎炎、脾臓において壊死性血管炎がみられたことからPDNSと診断した。農場のPCV2及びPRRSの状況を調べたところ、PCV2は50、90日齢の一部の豚にPCR陽性を確認、PRRSは120日齢でPCR陽性、150日齢で抗体陽性を確認した。

考 察

PDNSは一般的にPCV2の関与が疑われており、今回PDNSと診断した病性鑑定豚においても、リンパ組織にPCV2に特徴的な病変²⁾、特異遺伝子及び抗原が確認されたことから、PCV2の関与が考えられた。また、本農場では、PCV2ワクチンを約50日齢で接種しているが、日齢別の検

査で50日齢と90日齢の一部の豚にPCV2 PCR陽性が確認されていること、今回PDNSと診断された豚と同様の皮膚病変が散発的に発生していることから、PCV2ワクチンの適切な接種時期、1頭1頭への確実な接種が必要であると考えます。なお、PDNSは一般的に、90日齢以上での死亡率が高いといわれているが、稟告によると、本農場のPDNS疑う皮膚病変発症豚は、徐々に皮膚病変が消失し、発育は遅れるも死亡せずに経過するとのことであった。また、過去に本農場の死亡豚で実施した病性鑑定ではPDNSを疑う皮膚病変や腎症は認められなかった。このことから、本農場における皮膚病変とPDNSの関連について今後検証していきたい。

引用文献

- 1) 播谷亮ら : 豚病会報, No.38, 18-20 (2001)
- 2) 川島健司ら : 豚病会報, No.52, 17-21 (2008)
- 3) 曾我万里子ら : 平成20年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, 演題17番 (2008)

9 遺伝子の塩基配列の解析により分離菌の同定・確認を行った病性鑑定例

県中央家畜保健衛生所

小菅 千恵子 山本 和明
前田 卓也

はじめに

病性鑑定における細菌検査の基本は、迅速な原因菌の分離と有効な薬剤を選定することである。しかし、伝染性疾病の対策には、疫学調査として過去の分離菌や他施設での分離菌との比較を行うことにより、分離菌の特性を把握し予防対策に生かすことが重要となってきた。そのためには、分離菌の正確な菌種同定が不可欠である。当所における細菌学的検査（菌種同定）は、「病性鑑定指針」を参照に、分離培養、形態観察、生化学的性状検査により行い、一部の検査に、遺伝子検査であるPCR検査を併用している。最近では、細菌分野で菌種同定や、疫学調査などに活用されている検査法に、16SrRNA遺伝子の塩基配列解析（以下、16SrRNA遺伝子解析）があり、今回、菌種同定及び菌種確認に16SrRNA遺伝子解析を行ったので、報告する。

材料及び方法

1 検査材料

2010～2011年に実施した病性鑑定症例において疾病の主原因が細菌と診断した症例のうち、分離菌の菌種同定ができなかった症例と、同定したが更なる確認が必要と考えられる症例の計5症例各1株について、次のグループ分けにより、16SrRNA遺伝子解析を実施し、菌種同定及び確認を試みた。

- (1) 生化学的性状検査だけでは菌種を同定できなかった症例（症例1-(1～3)）
- (2) 生化学的性状検査で菌種を同定したが菌株の遺伝子解析が必要な症例（症例2）
- (3) 市販キットによる生化学的性状検査では誤同定の可能性があり再確認が必要な症例（症例3）

2 検査方法

(1) 分離培養、形態観察、生化学的性状検査

β -NAD加めん羊血液寒天培地、馬血液寒天培地、DHL寒天培地、さらに症例1ではGAM寒天培地、症例3ではチョコレート寒天培地を用い、好気、微好気、嫌気にて、37°C48時間培養し、分離培養を行った。グラム染色、オキシダーゼテスト、カタラーゼテスト及び分離菌の生化学的性状検査には、市販キットを用い、症例1はシスメックス社製API 20A、症例2はAPI Strep、症例3はAPI Staph、症例4・5は日水製薬IDテストHN-20ラピッドを用いた。さらに、症例1はFusobacterium属菌を区別する生化学的性状検査^{2) 5)}、症例3はActinobacillus属を区別する生化学的性状検査^{1) 4)}を追加し実施した。

(2) 16SrRNA遺伝子解析

分離菌をバイオラッド社製インスタジーンマトリックスを用いてDNAを抽出し、検査キット (MicroSEQR[®] 500 16SrDNA PCR /Sequencing Kits, Applied Biosystems) を用いて、分離菌の16SrRNA遺伝子領域約500bpについて増幅およびシーケンス反応を行った。反応産物の塩基配列約500bpを遺伝子解析装置 (Genetic Analyzer3130,



Applied Biosystems) を用いて解析し、

図1 16srRNA遺伝子解析による菌種同定

16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定した。この塩基配列を解析ソフト (MicroSEQR[®] ID ソフトウェア / 16SrDNA500 Library) により相同性解析し、NCBI (National Center for Biotechnology Information) から入手したGenBank データベースとBLAST 検索を実施し、他の検査結果も踏まえ分離菌の同定を行った。(図1)

成 績

1 生化学的性状検査だけでは菌種を同定できなかった症例

症例1-(1)：壊死性化膿性肺炎を呈した肺から分離されたFusobacterium sp. の菌種同定

4ヶ月の間に食欲不振と発熱を繰り返し、数回の治療を実施後、死亡した乳用牛 (32ヶ月齢) で、剖検所見で後大静脈に隣接して被包化した膿瘍、肺全葉で粟粒大の乳白色結節散在、組織所

見で肺に壊死性化膿性肺炎、肺・膿瘍・心臓等の複数臓器でのフィラメント状桿菌を認め、肺膿瘍・肺・肝臓から *Fusobacterium* sp. が分離された。分離菌は、API 20A で、*Fusobacterium necrophorum/nucleatum* (68.0% ID) と判定され、追加検査等により、インドール (+)、エスクリン加水分解 (-)、牛乳の凝固消化 (-)、マンノース (-)、ラクトース (-)、グルコース (+)、リパーゼ (+)、鶏血球凝集性 (+)、溶血性 (+) を示したが菌種同定には至らなかった。16SrRNA 遺伝子解析を実施した結果 (図2)、データベース登録株 *Fusobacterium necrophorum* との相同性が99%以上であり、分離菌

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
F530475.1	Uncultured bacterium clone C-40403-2787-FFUS 16S ribosomal RNA	809	809	100%	0.0	99%	
HM28893.1	Uncultured bacterium clone ncd902e04c1 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	
AB32413.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> gene for 16S riboso	809	809	100%	0.0	99%	
F184521.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> strain 2008-10-264 16S ribosomal RNA	809	809	100%	0.0	100%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_10C 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_6E 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_3B 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_7F 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_9C 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_7B 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA03_4E 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06WA03_5C 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06OR05_10B 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	
FJ29033.1	Uncultured bacterium clone 06OR02_3A 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
AB09356.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> partial 16S rDNA seq	809	809	100%	0.0	99%	
F724813.1	Uncultured <i>Fusobacteria</i> bacterium clone MS13641_805 16S ribosom	809	809	100%	0.0	99%	
NR_042365	<i>Fusobacterium necrophorum</i> strain ATCC 25286 16S ribosomal RNA, i	809	809	100%	0.0	99%	
AF044646.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> 16S ribosomal RNA gene, complete seq.	809	809	100%	0.0	99%	
HM307193.1	Uncultured bacterium clone ncd87705c1 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	

野外分離株との相同性99%以上

基準株との相同性99%

は *Fusobacterium necrophorum* と同定した。

図2 B L A S T解析の結果

症例1-(2) : 化膿性髄膜脳脊髄炎を呈した脳から分離されたグラム陽性菌の菌種同定

突然死した肥育豚 (約5ヶ月齢) で、剖検所見で脳の血管充盈、肺の一部肝変化、組織所見で化膿性髄膜脳脊髄炎を認め、脳・主要臓器からグラム陽性菌が分離された。分離菌は、市販キットによる生化学的性状検査で同定に至らなかった。16SrRNA 遺伝子解析を実施した結果、データベース登録株 *Streptococcus suis* との相同性が99%であり、分離菌は *Streptococcus suis* と同定した。

症例1-(3) : カタル性化膿性気管支肺炎を呈した肺から分離された *Actinobacillus* sp. の菌種同定

突然死した肥育豚 (約5ヶ月齢) で、剖検所見で肺の肝変化、組織所見でカタル性化膿性気管支肺炎を認め、肺から *Actinobacillus* sp. が分離された。分離菌は、IDテストHN-20ラピッドで、相対確率の高い順に、*A. equiili*、*A. pleuropneumoniae*、*A. lignieresii*、*A. suis* と判定された。追加検査でV因子要求 (+)、アラビノース (-)、ソルビトール (-)、セロビオース (-)、エスクリン加水分解 (-) を示したが、菌種同定に至らなかった。16SrRNA 遺伝子解析を実施した結果、データベース登録株 *A. pleuropneumoniae* と *A. lignieresii* の2菌種ともに相同性が99%であった。併せて実施した *A. pleuropneumoniae* 血清型別検査により II型に特異的なバンドを認めた事も併せて、分離菌は *A. pleuropneumoniae* と同定した。

2 生化学的性状検査で菌種を同定したが菌株の遺伝子解析が必要な症例

症例2：化膿性髄膜炎を呈した脳から分離された*Staphylococcus hyicus* の菌種確認

2週間前からの皮膚症状及び神経症状を示し死亡した離乳豚（22日齢）で、剖検所見で肺の一部肝変化、耳下腺リンパ節の腫脹、組織所見で脳・脊髄の化膿性髄膜炎、細菌性皮膚炎を認め、脳・肺・耳翼部及び背部皮膚内側から*Staphylococcus hyicus* が分離された。*Staphylococcus hyicus* によって、神経症状を引き起こす症例は珍しいと考えられるため、菌種確認に16SrRNA 遺伝子解析を実施した。結果、データベース登録株*Staphylococcus hyicus* との相同性が99%であり、分離菌は*Staphylococcus hyicus* と確認した。

3 市販キットによる生化学的性状検査では誤同定の可能性があり再確認が必要な症例

症例3：化膿性気管支肺炎を呈した肺から分離された *Mannheimia haemolytica* complex の菌種同定

呼吸速拍と起立困難を呈し死亡した乳用牛（17ヶ月齢）で、剖検所見で胸水貯留、肺の肝変化、胸壁との癒着、組織所見で化膿性気管支肺炎を認め、肺から*Mannheimia haemolytica* complexが分離された。市販キットで、*Mannheimia haemolytica* complexとされた菌株については、16SrRNA 遺伝子解析を実施すると、再同定される可能性

- 生化学的性状により*M. haemolytica* complexとしたなかには少なくとも5菌種が含まれている
 - M. haemolytica*
 - M. glucosida*
 - M. granulomatis*
 - M. ruminalis*
 - M. varigena*
- *M. haemolytica* 以外については病原性、発生状況など詳細が明らかとなっていない。
- *M. haemolytica* とした菌株133株について16SrRNA遺伝子解析を実施すると、

<i>M. haemolytica</i>	102株 (76.7%)
<i>M. varigena</i>	18株 (13.5%)
<i>M. glucosida</i>	2株 (1.5%)
<i>M. spp.</i>	11株 (8.3%)

のあることが報告されている³⁾ (図3)。 図3 *Mannheimia haemolytica* complex について菌種確認に、16SrRNA *lytica* complexについて遺伝子解析を実施した結果、データベース登録株*Mannheimia haemolytica*との相同性100%であり、分離菌は*Mannheimia haemolytica* と同定した。

まとめ及び今後の展望

2010～2011年に病性鑑定を実施し疾病の主原因が細菌と診断した症例のうち、原因菌の菌種同定に、従来より実施している生化学的性状検査では同定できない、もしくはさらなる確認が必要と考えられた症例の菌種同定及び確認のため、16SrRNA 遺伝子解析を用いた。結果、すべての症例の菌種同定

及び確認をすることが出来、16SrR NA 遺伝子解析が有効な検査法であることが認識できた。16SrR NA 遺伝子解析を実施するには、機器の整備が必要であること、また外部委託にはコストがかかること、菌種によっては今回実施したActinobacillus属のように、その塩基配列の相同性に違いがみられず分類が出来ないものがあること等の問題点が挙げられる。しかし、16SrR NA 遺伝子解析の利点である①生化学的性状検査（菌の代謝能力に依存する検査）で同定できない細菌を遺伝子検査で同定できること、②機器の操作に馴れば手法が簡便、またDNAの抽出からBLAST解析までが約5時間程度と短時間で判定出来ること、さらに③系統樹解析など疫学調査に有効であることなどの特徴を生かし、今後は、豚の常在菌でありながらレンサ球菌症を引き起こし、養豚農家へ経済的被害を与え、又、人にも感染する人獣共通感染症として、家畜衛生及び公衆衛生上重要である*Streptococcus suis* 感染症の疫学調査に、今回同定した菌や過去の病性鑑定症例から分離された菌を用い、遺伝子解析を活用していきたい。

謝 辞

16SrR NA 遺伝子解析の実施にあたり、快く、機材の使用・提供及び御助言を頂いた農林水産省動物検疫所 精密検査部に深謝します。

引用文献

- 1) G.L.Barrowら：医学細菌同定の手引き〈第三版〉、130-135、近代出版（1933）
- 2) Holdeman L.V and Moore W.E.C.：Anaerobe Lab Manual（4th edition）、23-28（1977）
- 3) 勝田 賢ら：動衛研研究報告 第115号、15-18（2009）
- 4) 佐々木幸治ら：日獣会誌、58号、186～189（2005）
- 5) 上野一恵：細菌学技術菌叢〈嫌気性菌の分離と同定法〉、菜根出版（1982）



神奈川県

環境農政局農政部畜産課安全管理グループ

〒231-8588 横浜市中区日本大通1 電話(045)210-4518 (ダイヤルイン)