

下痢を呈し死亡した肥育豚から分離されたサルモネラ血清型 4:i:-

県中央家畜保健衛生所

池田 知美	石原 凡子
中原 祐輔	英 俊征
井澤 清	吉田 昌司

緒言

サルモネラは、腸内細菌科の 2 菌種 6 亜種からなる属であり、Kauffmann-White の様式により、2,500 を超える血清型に分類される。うち特定の血清型での家畜のサルモネラ症は、家畜伝染病予防法における監視伝染病である。サルモネラの血清型は、菌体の細胞壁とその付近にあるリポ多糖体抗原である O 抗原と、鞭毛を構成する蛋白抗原である H 抗原の組み合わせで決定する (図 1)。H 抗原については、1 種類の抗原相しか持たない「単相菌」と、2 種類の抗原相を持つ「複相菌」がある。複相菌におけるそれぞれの抗原相を 1 相、2 相と呼び、1 相菌を培養すると、低い頻度で遺伝子のスイッチが切り替わり、2 相を発現する菌が混在するようになる⁴⁾ (図 2)。平成 27 年 10 月、県内の一貫経営豚場で、肥育豚の下痢症が発生し、病性鑑定の結果サルモネラ症と診断された。発症・死亡した豚からはサルモネラ血清型 4:i:- が分離され、疫学解析を実施したので、概要を報告する。

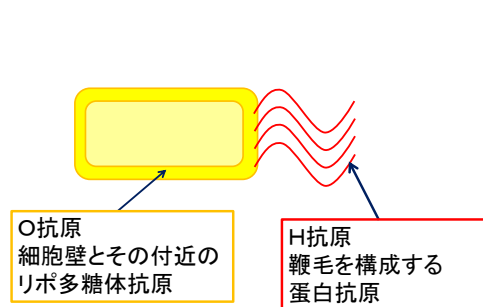


図 1 Salmonella の抗原構造

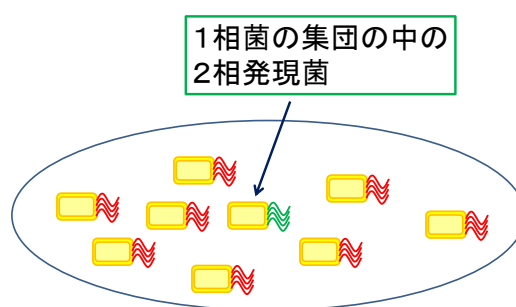


図 2 1 相菌と 2 相菌

発生概要

発生農場は、繁殖 149 頭、肥育 3,329 頭の一貫経営で、県内にある系列の繁殖農場からも肥育豚を導入している。検診時の直近の導入は、9 月 22 日の 140 頭であった。飼料は購入配合飼料を給与している。

10 月 2 日、肥育豚舎の 2 豚房で 1 頭ずつ、計 2 頭が水様性下痢をしているのを管理者が発見。管理者の判断で経過観察とし、5 日朝に状況を確認したところ、豚舎全体に症状が拡大していたため、PED を疑い、当所に検診依頼があった。検診時は、水張りの肥育豚舎のみで発症を認めるも、死亡豚はなく、他の豚舎では下痢を呈するものはいなかった。翌日、再度検診したところ、肥育豚 5 頭の死亡を確認した。

病性鑑定 材料と方法

1 供試材料

死亡豚 1 頭と発症豚の直腸スワブ 7 検体、同居豚の落下便 4 検体、水張り豚房貯留水 3 検体、豚房貯留水の原水 1 検体を供試した。

2 方法

(1) 細菌学的検査

死亡豚の主要臓器および腸内容物、発症豚の直腸スワブ、同居豚の落下便、水張り豚房貯留水およびその原水について、 β -NAD 加羊血液寒天培地 (37°C、24~48 時間、好気および微好気)、DHL 寒天培地 (37°C、24~48 時間、好気)、ES サルモネラ II 寒天培地 (37°C、24 時間、好気) での分離培養を実施した。分離されたサルモネラの血清型別は定法により実施し、確認として市販の *Salmonella* Typhimurium (S T) 迅速診断 PCR キットと、S T 特異遺伝子である IS200²⁾ および第 2 相 H 抗原遺伝子 *fljB*³⁾ を標的とした PCR による遺伝子検索を実施した。

(2) ウイルス学的検査

死亡豚の主要臓器からのウイルス分離を実施。発症豚の直腸スワブについては、PED および TGE の特異遺伝子検索のための PCR と、A 群ロタウイルス抗原検索のための市販キットによる簡易検査を実施した。

(3) 病理学的検査

死亡豚の主要臓器を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察した。

病性鑑定 結果

1 細菌学的検査

死亡豚の腸間膜リンパ節および腸内容物、直腸スワブ、同居豚の落下便、豚房貯留水からサルモネラを分離した。分離菌について血清型別を実施したところ、すべての株が 04 群、H 抗原の 1 相目は i と判定された。2 相目判定のため i の免疫血清を添加した半流動培地にて二日間培養したが、逆相菌が発育しなかったため、今回分離菌を血清型 4:i:-の単相菌と同定した。確認のために実施した遺伝子検索では、すべての株でサルモネラ特異遺伝子 *invA* と S T 特異遺伝子 TMP1~3 及び *IS200* が検出され(図 3、4)、S T と判定された。しかし第 2 相 H 抗原遺伝子 *fljB* は検出されず、遺伝子の欠損が確認された(図 5)。これにより今回の分離株は、S T 由来の単相変異株といわれる血清型 4:i:-であることが確認された。

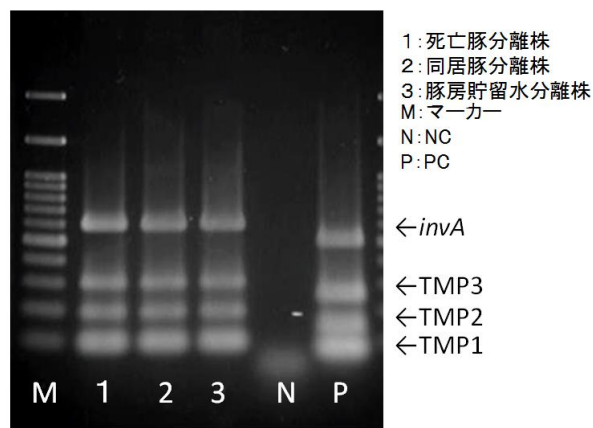


図 3 市販キットによる S T 特異遺伝子検索

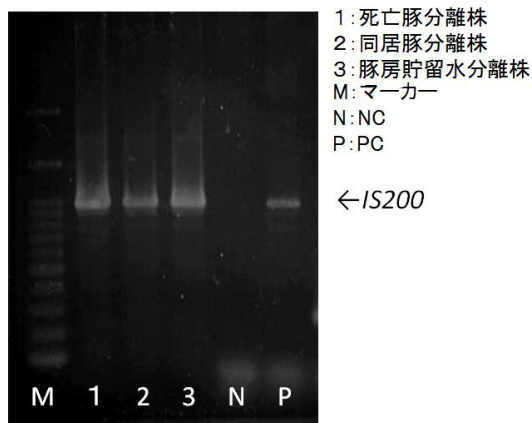


図 4 S T 特異遺伝子 (*IS200*) 検索

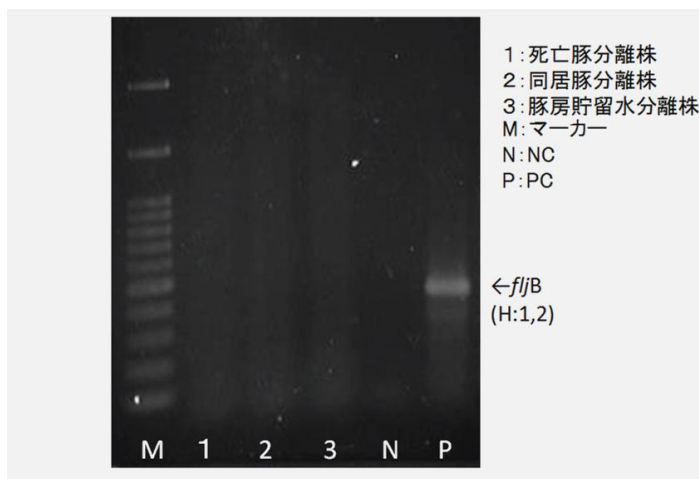


図 5 第 2 相 H 抗原遺伝子 (*fljB*) 検索

2 ウイルス学的検査

ウイルス分離、PEDおよびTGEのPCR、A群ロタウイルスの簡易検査はすべて陰性であった。

3 病理学的検査

剖検では、肺の暗赤色化、肝臓の退色、各種リンパ節の腫脹を認め、組織所見では腸管粘膜表層の変性・壊死、化膿性肺炎、胃粘膜びらんなどが見られた。

分離菌の疫学解析

今回の分離株について、過去に本県で分離されたSTとの関連性を調べるため、平成24年にサルモネラ症の牛と豚から分離された、STの県内過去分離株(以下、過去分離株)とともに、薬剤感受性試験、PFGEおよびMLVAによる分子疫学解析を実施した。

1 薬剤感受性試験

今回分離株はすべてアンピリシリン、テトラサイクリンに耐性で、同様の薬剤感受性を示したが、過去分離株とは異なる感受性を示した(表1)。このことから、過去分離株とは由来が異なると考えられた。

表1 薬剤感受性試験

菌株	ABPC	GEZ	CTF	CTX	GM	KM	TC	NA	CPFX	ERFX	CL	CP	TMP	FFC
1	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
2	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
3	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
牛由来ST	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R
豚由来ST	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R

供試菌株
1:死亡豚分離株 2:同居豚分離株 3:豚房貯留水分離株 牛・豚由来ST:H24年分離株

2 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

既報を参考に、制限酵素 Xba I によるPFGEを実施し、系統樹を作成した⁶⁾(図6)。今回分離株3株は同一のパターンを示し、過去分離株2株も同一のパターンを示したが、今回分離株と過去分離株の相同性は67.8%で、異なる型に分類された。

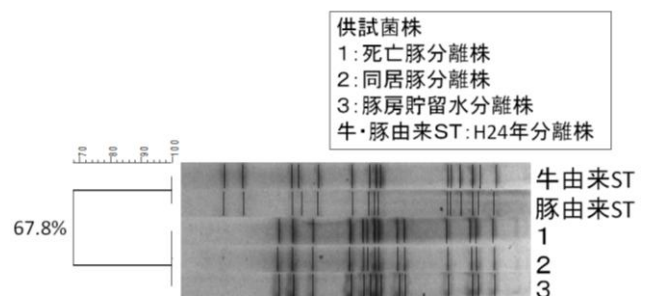


図6 PFGEプロファイル

3 multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA)

MLVAとは、ゲノム内の反復縦列配列を含む数種類の遺伝子座位をPCRで増幅し、繰り返し回数を解析する手法である。PFGEより識別能力が高く、短時間に解析が可能でデータベース化も容易であり、PFGEに変わる新たな遺伝子解析の手法になりうると考えられている。

今回、既報を参考に、遺伝子座位STTR3, STTR5, STTR6, STTR9, STTR10を標的としたMLVA解析を実施した^{5), 7)}。今回分離株はすべて同じプロファイルを示したが、過去分離株とは4箇所の遺伝子座位でプロファイルが異なっており、これらの株とは関連しないと考えられた。また、過去分離株のうち牛由来と豚由来の株についても、3箇所の遺伝子座位でプロファイルが異なっていた。(表2)。

PFGEとMLVAは組み合わせることで、より有用な解析が可能といわれている。そこで、1977年以降に北海道で分離された牛由来のSTおよび4:i:- (574株・動物衛生研究所で分子疫学解析を実施)に、今回分離株と過去分離株(計5株)を加えたMLVAプロファイルに基づく系統樹を作成し、PFGE

E型を反映させた^{5), 7)}(図7)。この系統樹により、今回分離株は同一由来であるが、過去分離株とは関連がなく、牛および豚由来の過去分離株は同一クローンではないことがより具体的に示唆された。

表2 MLVAプロファイル

分離株名	繰り返し回数				
	STTR3	STTR5	STTR6	STTR9	STTR10
1	11	11	9	4	0
2	11	11	9	4	0
3	11	11	9	4	0
牛由来	12	12	14	4	20
豚由来	12	16	0	4	25

供試菌株
 1: 死亡豚分離株 2: 同居豚分離株 3: 豚房貯留水分離株
 牛・豚由来ST:H24年分離株

PFGE型

- ST I
- ST II
- ST III
- ST IV
- ST V
- ST VI
- ST VII
- ST VIII
- ST IX
- O4:i:-
- 病性鑑定株

- ・円の大きさは菌株数を反映
- ・円の色はPFGE型を示す
- ・プロファイルの違いが1カ所以内のものを1つのグループとし、グレーで囲った

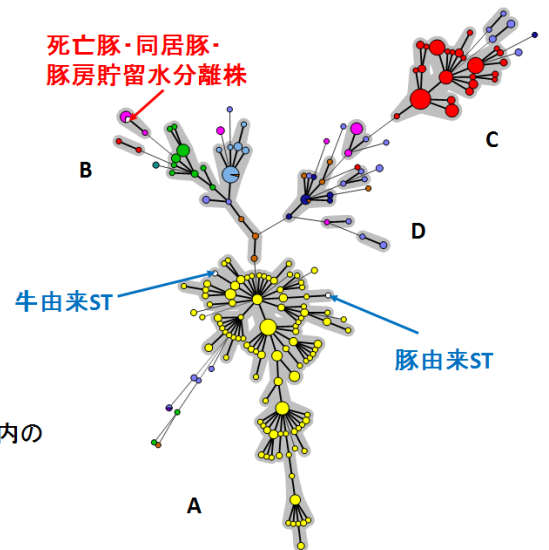


図7 MLVAプロファイルに基づく系統樹

考 察

血清型 4:i:-は近年、家畜衛生分野のみならず、食中毒症例での分離報告も増えている¹⁾。病性鑑定由来株を収集する J V A R M の野外流行株調査でも、直近二年はサルモネラの中で S T に次ぐ株数を占めるようになったが、届出対象ではないため、血清型 4:i:-による家畜のサルモネラ症の正確な発生数は把握できていない。

この血清型は、S T 由来の H 抗原単相変異株といわれており、S T と同等の病原性を示すと考えられる。そのため、防疫対応の重要性は大きく、発生時は迅速で効果的な対応が必要となる。

また、単相化の原因は現在未解明で、これを解明するためには、分離株を収集し、データを蓄積する必要がある。

今回実施した P F G E と M L V A による疫学解析は、本症例が過去分離株とは由来の異なる株に起因することが示唆されるなど、有用な解析手法である。血清型 4:i:-を届出対象として全国での発生状況の正確な把握ができれば、さらなる疫学解析が進むと考えられることから、今後、本血清型を届出対象とするか否かについて、検討する必要があると考えられる。

謝辞：P F G E および M L V A による分子疫学解析を実施していただいた、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 寒地酪農衛生研究領域 玉村雪乃研究員に深謝いたします。

引 用 文 献

1) 国立感染症研究所 病原微生物検出状況

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/1524-iasrgb.html>

2) M. A. Echeita et al. : J Clin Microbiol、39(8)、2981-2983(2001)

3) M. A. Echeita et al. : Res Microbiol、149、757-761 (1998)

4) 坂崎利一、田村和満：腸内細菌 上巻（第三版）、35-37 (2002)

5) 玉村雪乃、内田郁夫：北獣会誌、56、157-162 (2012)

6) Yukino Tamamura et al. : Appl Environ Microbiol、77(5)、1739-1750(2011)

7) Atsushi Kurosawa et al. : Veterinary Microbiology、160、264-268(2012)