

第3章 調査研究

1 平成29年度 調査研究

- 1 牛及び豚敗血症由来の *Truparella pyogenes* の薬剤感受性と遺伝学的特徴
志布志食肉衛生検査所 藤元 英樹
- 2 黒毛和種における *Mycoplasma bovis* の浸潤状況
阿久根食肉衛生検査所 藤長 悠太
- 3 *Clostridium* 属菌の混合感染症における菌種同定PCR法の検討
鹿屋食肉衛生検査所 松ヶ野真弓
- 4 豚赤痢の分離培地及び検査法の検討
串木野食肉衛生検査所 岩元 美鈴
- 5 鶏大腸菌症由来 *Escherichia coli* の薬剤耐性および遺伝学的特徴
志布志食肉衛生検査所 神田 卓弥
- 6 生食用食鳥肉加工工程における細菌汚染実態調査
知覧食肉衛生検査所 小林 直樹
- 7 大規模食鳥処理場におけるカンピロバクター等の微生物汚染の調査とその対策
～厚生労働省「亜塩素酸水処理による微生物低減策の有効性実証事業」～
知覧食肉衛生検査所 佐々木恭子
- 8 牛の原発不明腺癌の1例
鹿屋食肉衛生検査所 祝迫 翔子
- 9 スタンプ標本を用いた免疫組織化学的染色による牛白血病の簡易診断法
末吉食肉衛生検査所 小池 仁美
- 10 尿毒症に係る検査方法の調査
末吉食肉衛生検査所 松ヶ野 翔
- 11 ヨーネ病対応マニュアルの作成
大口食肉衛生検査所 鏡園やよい
- 12 食鳥検査結果と農場生産成績の関連性
末吉食肉衛生検査所 平良 和代

牛及び豚敗血症由来 *Trueperella pyogenes* の薬剤感受性と遺伝学的特徴

藤元英樹 砂川達見 下地なつ希*) 中島千景 窪菌薫 吉満文隆
志布志食肉衛生検査所, *)現始良家畜保健衛生所

はじめに

Trueperella pyogenes (以下, 「Tp」) は, 家畜に化膿性関節炎や皮下膿瘍を形成する菌として古くから知られ, と畜検査でも検出頻度が高く, 特に牛の疣贅性心内膜炎では主な原因菌となっている。と畜検査での敗血症は, 豚では *Streptococcus suis* が, 牛では Tp が主に検出されるが, 両畜種から検出される菌種はあまり多くない。今回, 牛及び豚から検出された Tp について, 溶血性, 毒性因子遺伝子, 薬剤感受性及び薬剤耐性遺伝子保有について, 由来する家畜ごとの比較を中心に検討したので概要を報告する。

背景

と畜検査における敗血症は, 病理所見及び実質臓器などから同一菌の検出を確認することで診断しており, 図1は, 現行の7検査所体制になった昭和61年度から約30年間の全部廃棄率の推移を示している。敗血症は, 牛では3番目に多く廃棄率は約0.06%, 豚では2番目に多く, 廃棄率は約0.04%となっている。

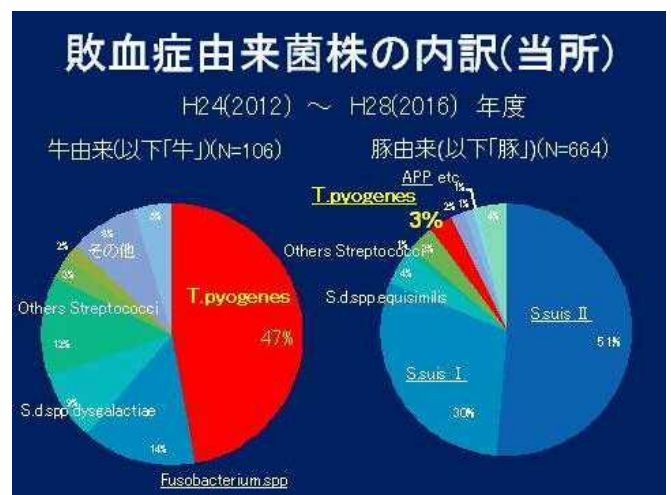
図1 全部廃棄率の推移



図2は, 過去5年間の当所における敗血症由来菌株の内訳を示しており, 示す牛では, *Trueperella pyogenes* (以下, 「Tp」) が最も多く, 約47%を占め, 豚では *Streptococcus suis* に代表される連鎖球菌が全体の約9割を占め, Tpは, 次いで約3%検出されている。

Tpは旧名を *Arcanobacterium pyogenes* といい, 古くから家畜の化膿性疾患の原因菌として知られている。

図2 敗血症由来菌株の内訳



材料と方法

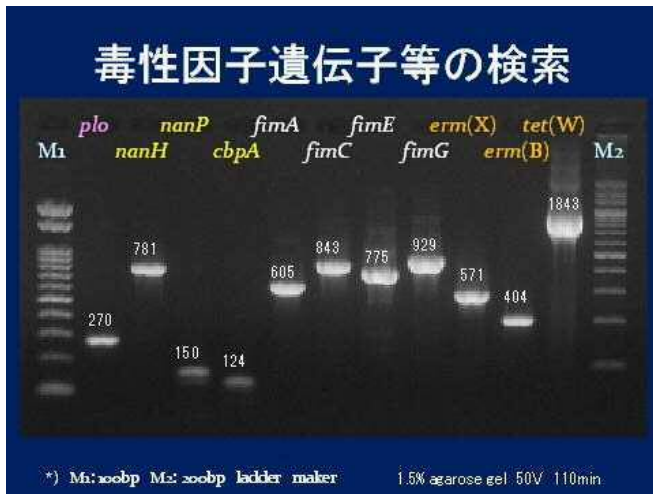
材料は, 平成18年から28年度にかけ, と畜検査で敗血症と診断された牛及び豚から分離され, Tpと同定した190株を用いた。

菌株は, 馬及び羊血液寒天培地上での溶血性の比較を行い, 保有する遺伝子検査として, 溶血毒素をコードする *plo* 遺伝子, 宿主との接着促進因子として, ノイラミニダーゼ (*nanH* 遺伝子及び *nanP* 遺伝子), コラーゲン結合タンパク (*cbpA* 遺伝子) 及び複数の線毛遺伝子 (*fimA*, *fimC*, *fimE* 及び *fimG* 遺伝子)

子)について実施した。

薬剤感受性試験は, Ampicillin(ABPC), Cefazolin(CEZ), Lincomycin(LCM), Streptomycin(SM), Gentamicin(GM), Kanamycin(KM), Erythromycin(EM), Tetracycline(TC), Oxytetracycline(OTC), Chloramphenicol(CP), Ofloxacin(OFLX), Norfloxacin(NFLX)の8系統12薬剤について, KB法による薬剤感受性試験を行い, あわせて, 薬剤耐性遺伝子としてマクロライド系の *erm*(X)及び(B), テトラサイクリン系の *tet*(W)について検索した(図3参照)。

図3 標的遺伝子の電気泳動像



成 績

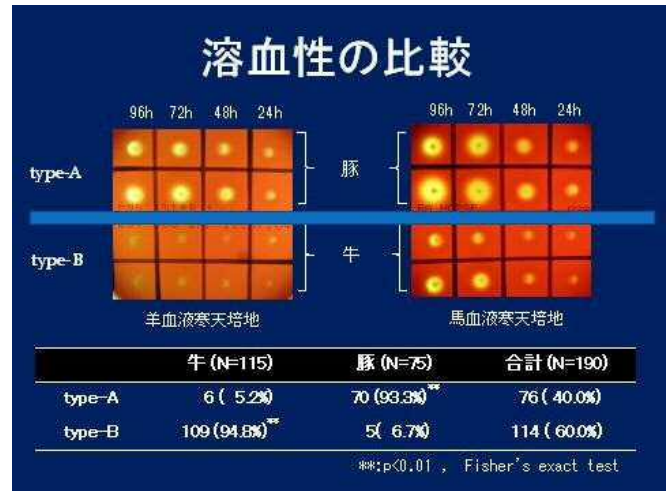
1 血液寒天培地上での溶血性

由来する家畜ごとに菌株の溶血性について比較した。図4上段の写真左が羊血液寒天培地(以下,「羊血寒」)上, 右が馬血液寒天培地(以下,「馬血寒」)上でのTpの経時的発育所見で, 青線より上が豚由来株, 下が牛由来株の発育状況を示している。

馬血寒上では, 溶血輪に若干の差があるが, 豚由来株及び牛由来株は同様に明確なβ溶血を示した。それに対し, 羊血寒上では, 豚由来株は溶血輪が明確なβ溶血を示すものが数多いのに対し, 牛由来株は溶血輪が狭いあるいは不明瞭なものが数多く見られた。

羊血寒上で明確なβ溶血を示すものを typeA, それ以外を typeB として集計すると, 豚由来株では, typeA が 93.3%, 牛由来株では, typeB が 94.8%となり, 由来する家畜ごとに明確に差が認められた。

図4 馬及び羊血液寒天培地上での溶血性の比較



2 毒性因子遺伝子等の保有

毒性因子遺伝子等の保有状況については, *plo* 遺伝子は全ての菌株で保有が確認され, 次いで *fimA*, *fimE* 遺伝子が高い割合で保有されていることが確認された。由来する家畜ごとに見ると *nanH* 及び *fimG* は, 豚由来株で有意に保有率が高くなり, *nanP*, *cbpA*, *fimC* 及び *fimE* は牛由来株で有意に高くなった。

表1 毒性因子遺伝子等の保有状況

Target Gene	牛 (N=115)	豚 (N=75)	合計 (N=190)
<i>plo</i>	115(100.0%)	75(100.0%)	190(100.0%)
<i>nanH</i>	69(60.0%)	67(89.3)**	136(71.6%)
<i>nanP</i>	68(59.1)*	33(44.0%)	101(53.2%)
<i>cbpA</i>	12(10.4)*	1(1.3%)	13(6.8%)
<i>fimA</i>	111(96.5%)	71(94.7%)	182(95.8%)
<i>fimC</i>	94(81.7)**	18(24.0%)	112(58.9%)
<i>fimE</i>	107(93.0)*	61(81.3%)	168(88.4%)
<i>fimG</i>	13(11.3%)	31(41.3)**	44(23.2%)
<i>tet</i> (W)	39(33.9%)	50(66.7)**	89(46.8%)
<i>erm</i> (X)	7(6.1%)	8(10.7%)	15(7.9%)
<i>erm</i> (B)	1(0.9%)	8(10.7)**	9(4.7%)

**p<0.01, *p<0.05, Fisher's exact test

また、薬剤耐性に関与する遺伝子としては、*tet(W)* 及び *erm(B)* が、豚由来株で有意に保有率が高くなった。

菌株別の毒性因子遺伝子保有状況は、全部で 34 の保有パターンが認められた。主な保有パターンを表 2 に示すが、最も数多く認められたのは、*plo,nanH,nanP,fimA,fimC,fimE* の 6 遺伝子保有株が 29 株(15.3%)、次いで *plo,nanH,fimA,fimE,fimG* の 5 遺伝子保有株が 23 株(12.1%)となった。

表 2 遺伝子保有のパターン

Target Gene	牛 (N=115)	豚 (N=75)	合計 (N=190)
<i>plo, nanH, nanP, fimA, fimC, fimE</i>	29(20.0%)*	6(8.0%)	29(15.3%)
<i>plo, nanH, nanP, fimA, fimE</i>	7(6.1%)	7(9.3%)	14(7.4%)
<i>plo, nanH, nanP, fimA</i>	1(0.9%)	9(12.0%)**	10(5.3%)
<i>plo, nanH, nanP + a</i> (7パターン)	13(11.3%)	5(6.7%)	18(9.5%)
<i>plo, nanH, fimA, fimE, fimG</i>	0(0.0%)	23(30.7%)**	23(12.1%)
<i>plo, nanH, fimA, fimC, fimE</i>	16(14.0%)*	3(4.0%)	19(10.0%)
<i>plo, nanH, fimA, fimE</i>	2(1.7%)	9(12.0%)**	11(5.8%)
<i>plo, nanH + a</i> (7パターン)	7(6.1%)	5(6.7%)	12(6.3%)
<i>plo, nanP, fimA, fimC, fimE</i>	14(12.2%)	3(4.0%)	17(9.0%)
<i>plo, nanP + a</i> (5パターン)	10(8.7%)	3(4.0%)	13(6.8%)
<i>plo, fimA, fimC, fimE</i>	15(13.0%)**	0(0.0%)	15(7.9%)
<i>+ a</i> (7パターン)	7(6.1%)	2(2.7%)	9(4.7%)

***:p<0.01, **:p<0.05, *:Fisher's exact test

3 薬剤感受性試験

薬剤耐性の獲得状況について表 3 に示しており、ABPC、CEZ 及び CP に対しては、全ての菌株で感受性を示した。薬剤耐性の獲得は、SM、TC、LCM、OTC、NFLX、EM の順に高い割合で耐性を示した。

LCM、SM、EM 及び NFLX については、豚由来株で耐性獲得率が有意に高く、OTC は牛由来株で耐性獲得率が高くなり、由来する家畜間で耐性獲得状況に有意に差が認められた。また、数は少ないがこれまであまり報告の無い GM 及び OFLX 耐性株も牛由来株で確認された。

表 3 薬剤感受性試験成績

	牛 (N=115)	豚 (N=75)	合計 (N=190)
ABPC	0	0	0
CEZ	0	0	0
LCM	8(7.0)	20(26.7)**	28(14.7)
SM	36(31.3)	47(62.7)**	83(43.7)
GM	1(0.9)	0	1(0.5)
KM	3(2.6)	0	3(1.6)
EM	4(3.5)	12(16.0)**	16(8.4)
TC	20(17.4)	21(28.0)	41(21.6)
OTC	18(15.7)*	4(5.3)	22(11.6)
OFLX	1(0.9)	0	1(0.5)
NFLX	6(5.2)	12(16.0)*	18(9.5)
CP	0	0	0

菌株ごとに薬剤耐性の獲得状況をみると、いずれかの薬剤に耐性を示したものが、牛由来株で 50 株(43.5%)、豚由来株で 52 株(69.3%)となり、豚由来株で有意に高くなった。多剤耐性の状況については、2 系統以上の薬剤に耐性を示した菌株は、牛由来株で 18 株(15.7%)、豚で 29 株(38.7%)となり、豚由来株が有意に高くなった。

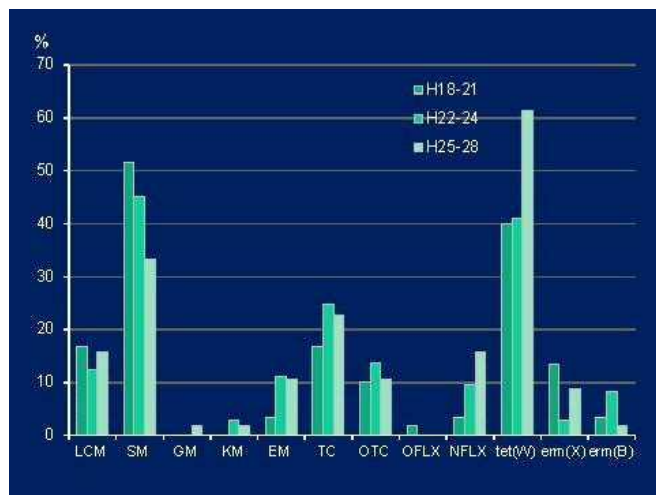
表 4 多剤耐性の獲得状況

薬剤耐性を示す系統数	牛由来株 (N=115)	豚由来株 (N=75)	合計 (N=190)
5 系統	0	2(2.7%)	2(1.1%)
4 系統	2(1.7%)	8(10.7%)	10(5.2%)
3 系統	8(7.0%)	9(12.0%)	17(8.9%)
2 系統	8(7.0%)	10(13.3%)	18(9.5%)
1 系統	32(27.8%)	23(30.7%)	55(28.9%)
合計	50(43.5%)	52(69.3%)	102(53.6%)

また、薬剤耐性獲得状況の推移を見るため、検出菌株を 3 つの時期に分けて比較した。

図 5 に薬剤ごとの耐性獲得状況を示すが、経時的に大幅な耐性率の上昇を示すものは認められなかった。しかし、NFLX に耐性を示す割合及び *tet(W)* 遺伝子を保有する割合が有意に上昇しており、拡大傾向が認められた。

図5 薬剤耐性獲得状況の推移



考 察

牛由来株と豚由来株で羊血液寒天培地上での溶血性に差が認められ、由来する家畜ごとに検出される菌株に異なる特性を持つことが示唆された。

毒性因子遺伝子保有状況については、溶血毒素をコードする *plo* 遺伝子は全ての株から検出され、線毛遺伝子のうち *fimA* は牛由来株及び豚由来株の両者から高い割合で検出された。ノイラミニダーゼ遺伝子保有については、*nanH* は豚由来株で *nanP* は牛由来株で有意に高く、*cbpA* 遺伝子は牛由来株で有意に高い保有率となった。線毛遺伝子も *fimC* 及び *fimE* は牛由来株で、*fimG* は豚由来株で有意に高い保有率となり、全般に牛由来株と豚由来株は異なる遺伝子特性を持つことが考えられた。

菌株別の毒性因子遺伝子の保有パターンは 34 パターンが認められ多岐にわたったが、牛由来株と豚由来株で高率にみられるパターンが異なった。

薬剤耐性の獲得状況は、全般に豚由来株で高い傾向にあり、SM, LCM, EM 及び NFLX の 4 薬剤で有意に高くなり、豚飼養環境中での薬剤耐性の広がり示唆された。同時に、多剤耐性の傾向も豚由来で高くなった。しかし、過去 10 年間における薬剤耐性の経時的な推移については、明確な広がりを確認することはできなかった。

薬剤耐性に関与する遺伝子については、テトラサ

イクリン系の *tet(W)* 遺伝子が、牛及び豚由来菌株ともに高い割合で保有されていることが確認された。経時的には H25-28 検出株で高くなっており、耐性遺伝子獲得の広がりが推測された。また、*tet(W)* 遺伝子及びマクロライド系の *erm(B)* 遺伝子の保有が、豚由来株で有意に高くなっており、これについても飼養環境中での広がりが推測された。

今回、敗血症由来 Tp について、由来する家畜ごとに検出される菌株の間に溶血性、遺伝学的特性及び薬剤感受性に違いがあることが確認された。

また、多剤耐性の傾向や由来畜種ごとに検出菌株の耐性獲得状況の確認ができたことから、今後、Tp を原因とする化膿性疾患に係る治療薬選択の一助になると思われた。

参 考 文 献

- E. Zastempowska et al., Genotypic characterization and evaluation of an antibiotic resistance of *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) isolated from milk of dairy cows with clinical mastitis, *Vet. Microbiol.* 161 (2012)153-158.
- H. Yoshimura et al., Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs, *J. Vet. Med. B* 47 (2000)139-143.
- K. Zhao et al., Virulence determinants and biofilm production among *Trueperella pyogenes* recovered from abscesses of captive forest musk deer, *Arch. Microbiol.* 195 (2013) 203-209.
- Magdalena Rzewuska et al., Relationships between antimicrobial resistance, distribution of virulence factor genes and the origin of *Trueperella pyogenes* isolated from domestic animals and European bison (*Bison bonasus*) *Microb Path* 96(2016)35-41

黒毛和種における *Mycoplasma bovis* の浸潤状況

藤長悠太 神田卓弥¹⁾ 外園千代 田中敏久

阿久根食肉衛生検査所 1)志布志食肉衛生検査所

はじめに

BRDC（牛呼吸器病症候群）は飼育環境，健康状態，ストレス，種々の病原体の混合感染など複数の要因で引き起こされる呼吸器病の総称であり，経済的な損失が大きい疾病である。*Mycoplasma bovis*（以下 *M. bovis*）感染症はBRDCの要因の一つと考えられているが，黒毛和種肥育牛の肺における *M. bovis* 浸潤状況の報告はほとんどない。そこで本調査では，通常搬入された黒毛和種肥育牛における *M. bovis* の保有状況及び他の細菌性病原体との混合感染の有無を調査した。

材料と方法

平成27年11月から平成28年11月までに管内と畜場にて，通常搬入された黒毛和種肥育牛（26～40ヶ月齢）の中から無作為に選択した234頭の肺の右前葉を採取し，肉眼的に肺炎・胸膜炎が見られたもの75検体（以下，肺炎・胸膜炎群）と，見られなかったもの159検体（以下，非肺炎・胸膜炎群）に分類した。

M. bovis の菌分離として，各検体を約1cm角で採材し，PPLO液体培地 (Mycoplasma Base medium (BD), 15% 馬血清, 25g/L 酵母エキス, 0.1g/L D-グルコース, 10IU/L ペニシリンG) に接種後，37℃，24時間培養した。その後，上清を新たなPPLO液体培地にて上記の温度条件で1週間培養後，PPLO寒天培地(12g/L Bact Agar 添加PPLO液体培地)に画線塗抹し，微好気条件，37℃で1週間程度培養した。分離された菌については *M. bovis* の *uvrC*, *16s rDNA* 領域に特異的なプライマーを用いたPCRによる同定を行った。

また肺の一部を生理食塩水に懸濁し，その懸濁液から Instagene matrix(BIO-RAD)を用いてDNA抽出を行い，*16s rDNA* 領域においてPCRを行い，*M. bovis* 遺伝子の有無を調査した。

混合感染の有無を調査するために，*M. bovis* 遺伝子が検出された懸濁液を羊血液加寒天培地に塗布し，37℃，微好気条件下で1週間培養を行った。発育が見られた検体については，コロニー形態の観

察，グラム染色，オキシダーゼ，カタラーゼ活性の確認を行い，同定検査キットによる同定を行った。

(図1)

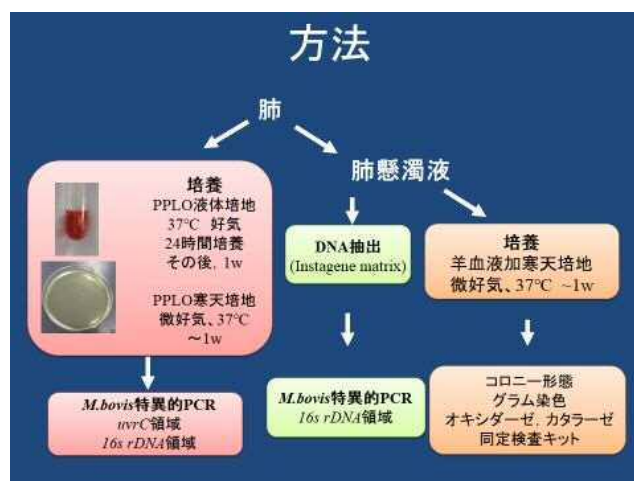


図1 方法

結果

1. 分離培養

234検体中，3検体（1.3%）においてPPLO寒天培地上にコロニーが確認された。それぞれ，PCRを行った結果，*uvrC*, *16s rDNA* 領域において *M. bovis* 特異的な遺伝子を検出したことから，3検体すべて *M. bovis* と同定した。（図2）

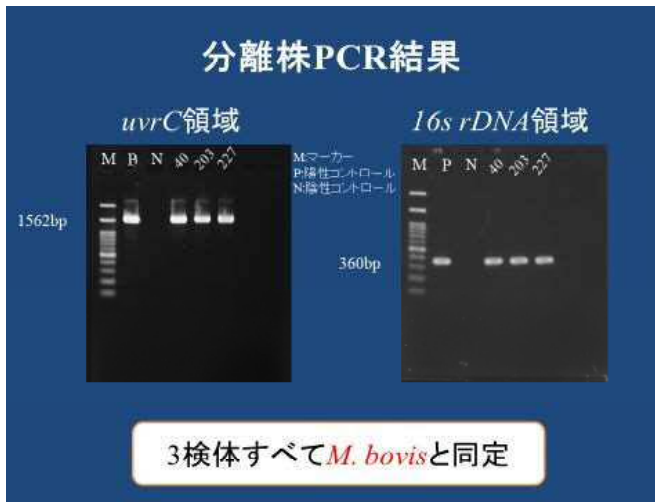


図2 分離株 PCR 結果

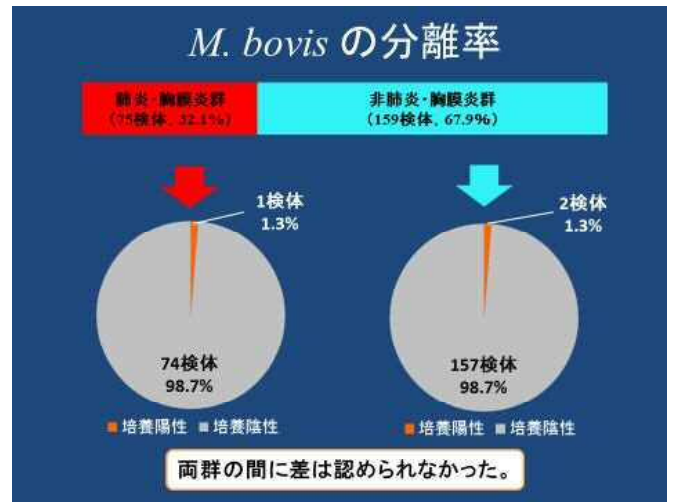


図4 *M. bovis* の分離率

2. 肺懸濁液の PCR

肺懸濁液からの PCR では 234 検体中、39 検体 (16.7%) において *M. bovis* に特異的な *16s rDNA* 遺伝子を検出した。(図3)

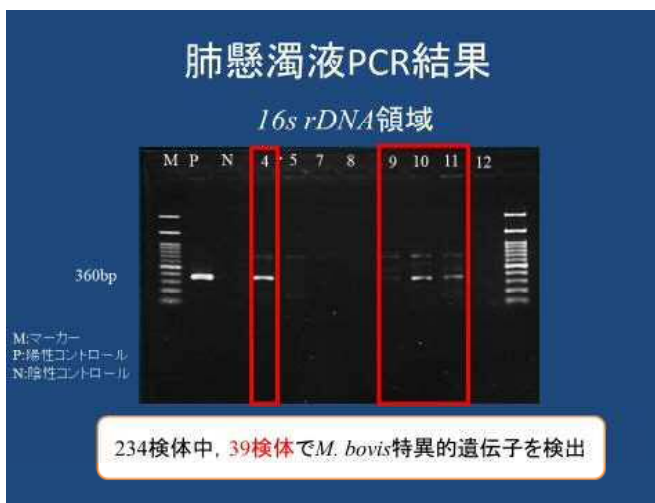


図3 肺懸濁液 PCR 結果

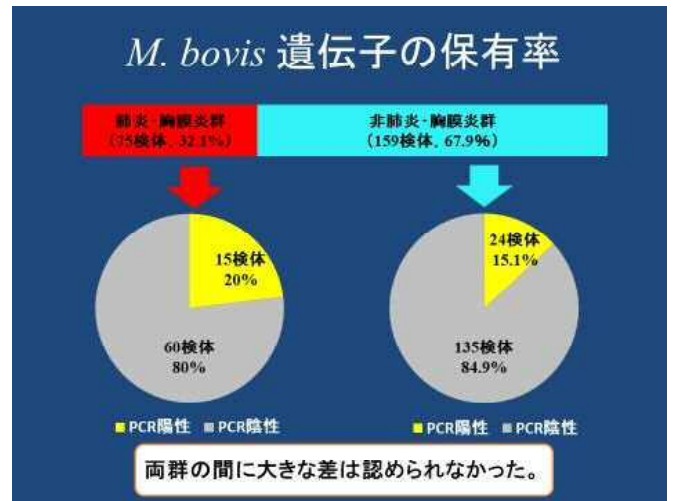


図5 *M. bovis* 遺伝子の保有率

3. 肺炎・胸膜炎群及び非肺炎・胸膜炎群間における *M. bovis* の分離率並びに *M. bovis* 遺伝子の保有率

肺炎・胸膜炎群 75 検体、非肺炎・胸膜炎群 159 検体において、*M. bovis* の分離率及び *M. bovis* 遺伝子の保有状況については、両群の間に大きな差は認められなかった。(図4, 図5)

4. *M. bovis* の保有状況及び他の細菌性病原体の混合感染の有無

PCR 陽性であった 39 検体の肺懸濁液の培養の結果、菌が分離されたのは非肺炎・胸膜炎群の 2 検体であり、分離菌はそれぞれ *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus epidermidis* であった。(図6)

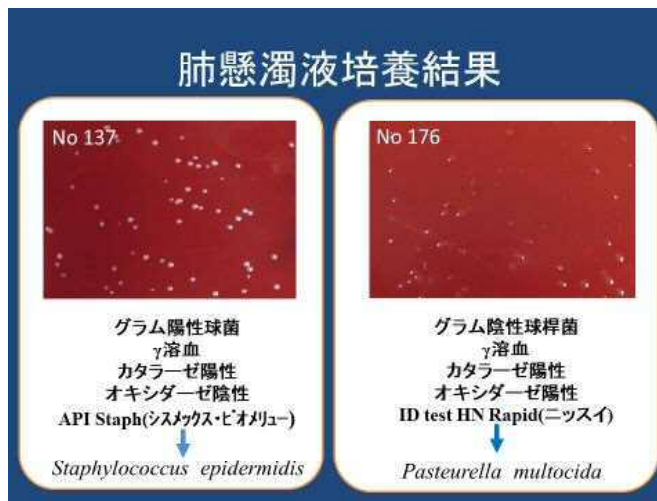


図6 肺懸濁液培養結果

考察

通常搬入された黒毛和種肥育牛(26～40ヶ月齢)の肺の16.7%(39/234頭)から*M. bovis* 遺伝子が検出された。これは、平成27年に食肉処理場に搬入された経産牛(52～233ヶ月齢)の肺と気管支リンパ節の17.1%(14/82頭)から*M. bovis* 遺伝子が検出された結果(三城, H27年度九州地区獣医師会)と同様の割合だったことから、月齢にかかわらず持続的に*M. bovis* を保菌している可能性が有るのではないかと考えられた。

PCR陽性であった肺懸濁液の培養の結果、*M. bovis* との混合感染が示唆されたのは2検体のみと少数であったことから、混合感染により顕著な症状が見られた場合、緊急出荷や治療等の対処が行われている可能性が考えられた。

培養陽性となった3頭の内2頭において肉眼的に肺炎・胸膜炎が見られなかったこと、肺懸濁液のPCR結果において肺炎・胸膜炎の有無による明らかな差が見られなかったことから、正常な牛の肺においても不顕性感染として*M. bovis* が常在している可能性が示唆された。しかし、今回の調査においては、培養陽性となった検体数が少なかったこと、肺懸濁液における遺伝子の有無の調査のみであったことから、病理学的調査等によって更なる検討が必要だと考える。

参考文献

- 1) 上村涼子ら：日本国内における牛の呼吸器感染性 *Mycoplasma* の浸潤状況調査, 日獣会誌 2012 ; 65 : 871-875
- 2) Chavez Gonzalez YR et al (1995). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. Vet Microbiol, 47, 183-190.
- 3) Subramaniam S et al (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. Mol Cell Probes, 12, 161-169.

Clostridium 属菌の混合感染症における 菌種同定 PCR 法の検討

松ヶ野真弓 矢野貴久 鳥居哲太郎¹⁾ 川畑仁志 福里吉文
鹿屋食肉衛生検査所 1) 始良保健所

はじめに

本県の食肉衛生検査所では、*Clostridium* 感染症、主に悪性水腫による牛の全部廃棄事例が散発している。悪性水腫は病変部中に *C. septicum*, *C. perfringens* 等が単一または混在して存在するという報告がある[1]。*C. septicum* は培地上で遊走性を示すため、*Clostridium* 属菌の混合感染により培地上に複数種のコロニーが観察された場合、それぞれの菌種の単離及び同定は容易ではない。現在、本県の検査実施作業手順書(SOP)における *Clostridium* 属菌の PCR の対象は *C. septicum* 及び *C. chauvoei* のみである。一方で、それ以外の菌種においては純培養を行い簡易キット等による同定を行うことになっており、同定に至るまでに時間を要する。そこで、本研究では、SOP のプライマーに、*C. perfringens* を検出可能なプライマーを加えた Multiplex PCR による菌種同定 PCR 法を検討した。また、Multiplex PCR 専用試薬を用いてその効果を検討した。

材料と方法

菌株として、*C. septicum* 4 株、*C. perfringens* 3 株、*C. chauvoei* 1 株を供試した。そのうち、*C. septicum* 1 株及び *C. perfringens* 1 株は同一牛由来であった。各菌株を血液寒天培地で 24 ~ 48 時間嫌気培養後、SOP に準じ熱抽出法により DNA を抽出した。プライマーは SOP に準じた *C. septicum* 及び *C. chauvoei* を検出するプライマー 1 対、Kikuchi[2]らによる *C. perfringens* を検出するプライマー 1 対の計 2 対を混合して用いた(表 1)。

表 1 プライマー

プライマー	
<i>C. septicum</i>/<i>C. perfringens</i>/<i>C. chauvoei</i>をターゲットにしたPCR	
・プライマーペア①	
<i>C. septicum</i> 及び <i>C. chauvoei</i> の検出:SOP	
IGSCS:	5'-GAAAATTG CACATGAAT TAAA-3': 21mer
23UPCH:	5'-GGATCAGAACTCAAACCTTTCT-3': 23mer
・プライマーペア②	
<i>C. perfringens</i> の検出:Kikuchi[2], 2002	
CIPER-F:	5'-AGATGGCATCAT TCAAC-3': 20mer
CIPER-R:	5'-GCAAGGGATGTCAAGTG-3': 18mer
*Primer stock(100 pmol/ μ l)よりPrimer mixtureを調整	
Primer mixture:IGSCS 10 μ l+23UPCH 10 μ l + CIPER-F 5 μ l+ CIPER-R 5 μ l+DW 70 μ l	

PCR mixture は SOP に準じて調整したもの(SOP カクテル)及び Multiplex PCR 専用試薬(専用試薬)である Multiplex PCR Assay Kit Ver.2(TAKARA)を使用した。PCR プログラムはそれぞれ SOP 及びメーカーの説明書に準じた。また、両者における目的 DNA の検出率を比較した。なお、PCR mixture に添加する DNA 抽出液は、SOP では 1 μ l となっているが、本研究では 5 μ l に変更した。

試験(A)では、単独の菌種 6 株における Multiplex PCR の有効性を検討した。試験(B)では、複数種の *Clostridium* 属菌の混合菌液を用い、それらの検出を試みた。同一牛由来 *C. perfringens*, *C. septicum* 及び他の牛由来 *C. chauvoei* の 3 種類についてマクファーランド濁度 4 の濃度に調整した菌液を 2 種類ずつそれぞれ比率を変え混合したもの、更に 3 種類の菌液を等量混合したものを PCR へ供した。

試験(C)では、*C. perfringens* 及び *C.*

septicum の混合感染時におけるスタンプ培地を再現し、そこからの菌種同定を試みた。病変中の菌種の菌量や比率は様々であることが想定されるため、試験(B)で用いた比率の異なる *C. perfringens* と *C. septicum* の 2 種混合菌液を更に希釈し、血液寒天培地に接種して 24 時間培養後、培地上からランダムにコロニーを掻き取ったものから DNA を抽出し、PCR へ供した。

結果

試験(A)では、全ての検体において *C. perfringens* では 793 bp, *C. septicum* では 594 bp, *C. chauvoei* では 522 bp の特異バンドが 1 本ずつ確認された(図 1)。

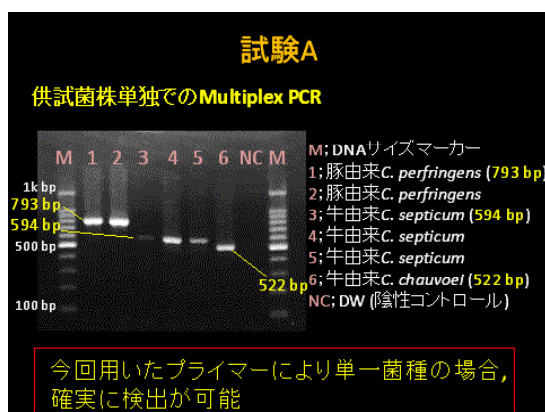


図 1 単独の菌種における Multiplex PCR

試験(B)では、*C. perfringens* と *C. septicum*(図 2), *C. perfringens* と *C. chauvoei* 及び *C. septicum* と *C. chauvoei*(図 3)のそれぞれの 2 種混合菌液において陽性コントロールでは 1 本、混合菌液では 2 本のバンドが確認され、検体に含まれる全ての株について検出可能であった。なお、バンドの濃さは混合液中の菌液の比率に比例していた。更に、3 種等量混合菌液では 3 本のバンドが確認された(図 4)。

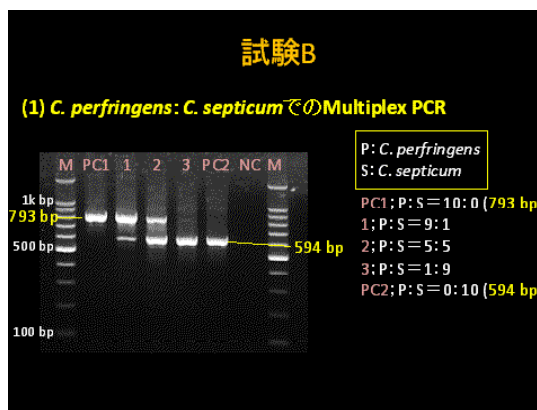


図 2 *C. perfringens*/*C. septicum* の 2 種混合菌液での Multiplex PCR

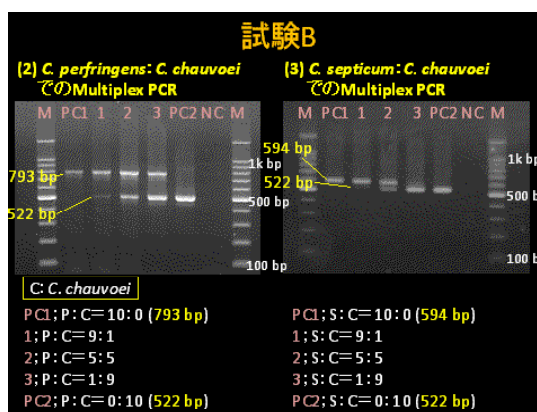


図 3 *C. perfringens*/*C. chauvoei* 及び *C. septicum*/*C. chauvoei* の 2 種混合菌液での Multiplex PCR

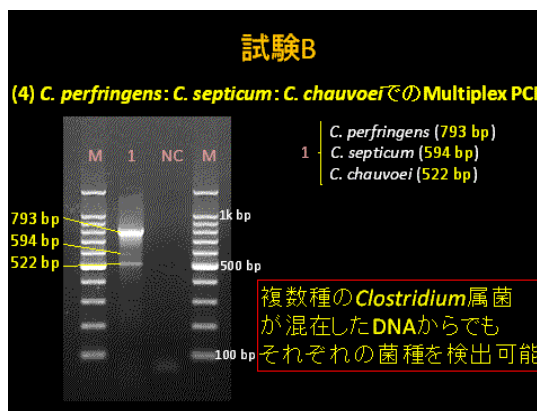


図 4 3 種等量混合菌液における Multiplex PCR

試験(C)では、2 種混合菌液を接種し 24 時間培養後の培地上において、肉眼的に乳白色コロニーが単一、または乳白色コロニ

一及び遊走性コロニーが混在して認められた。

2種類のコロニーを掻き取った場合は *C. perfringens* 及び *C. septicum* が、乳白色コロニーのみが確認された培地を掻き取った場合は *C. perfringens* のみ検出された。なお、肉眼的にコロニーが認められなかった領域を掻き取った場合はバンドは認められなかった(図5)。

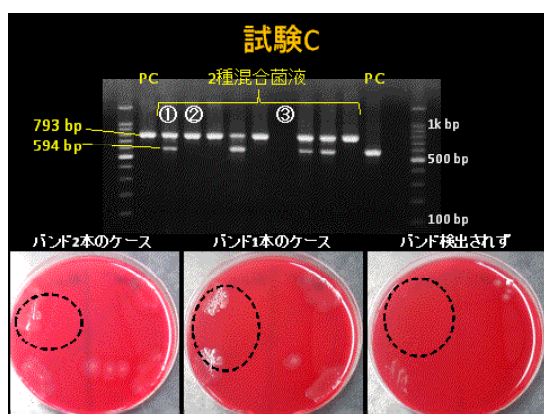


図5 試験(C) Multiplex PCR 結果

試験(A)~(C)について、PCR mixture 及び PCR 反応条件を SOP カクテルを用いた場合と専用試薬を用いた場合で比較したところ、全ての試験において同様の検出パターンであった(図6)。

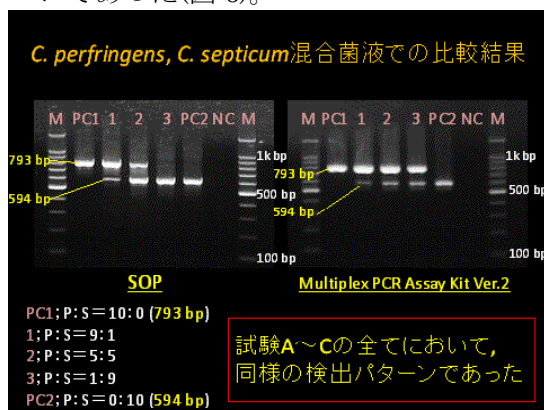


図6 PCR mixture 及び PCR 反応条件の比較の一例

考察

届出伝染病である気腫疽は迅速な診断が求められ、鑑別の観点から、現在、本県の SOP における *Clostridium* 属菌の PCR の対象は *C.*

septicum 及び *C. chauvoei* のみである。その一方で、悪性水腫の起因菌の一種である *C. perfringens* をはじめ他の *Clostridium* 属菌の感染事例も散発しているのが現状である。本研究の結果より、SOP に準じたプライマーに加え、本研究で用いた *C. perfringens* の検出を目的としたプライマーを用いることにより、単独菌種の DNA だけでなく複数種の *Clostridium* 属菌が混在した DNA からであってもそれぞれの菌種を同定可能であると考えられた。更に、専用試薬を用いることで、PCR サイクル時間の大幅な短縮及び試薬の種類を減らすことが可能であった。以上のことから、*Clostridium* 属菌の混合感染により培地上で複数種のコロニーが観察された場合、Multiplex PCR によって菌種特異 DNA 配列を増幅でき、一度に複数種の菌種の同定が可能であるため、検査の省力化及び短時間化へとつながるといえる。更に、専用試薬を用いることで、検査の更なる迅速化及び簡便化が期待できると考える。

今後は、より迅速な診断が可能となるよう実際の症例において臓器より直接抽出した DNA でも同様の結果が得られるか検討が必要である。また、*C. sordellii* や *C. novyi* 等を検出可能であるプライマーを増やし、より多くの *Clostridium* 属菌の迅速な同定を可能とする Multiplex PCR 法も検討していきたい。

参考文献

- [1] 明石博臣, 大橋和彦, 小沼操, 菊池直哉, 後藤義孝, 高井伸二, 宝達勉: 動物の感染症, 第三版, 125, 近代出版, 東京 (2014)
- [2] Kikuchi E, Miyamoto Y, Narushima S, and Itoh K. Microbiol. Immunol., 46(5), 353-358, 2002.

豚赤痢の分離培地及び検査法の検討

岩元美鈴 西園幹雄 宇都誠二 内大久保均
串木野食肉衛生検査所

はじめに

豚赤痢は、*Brachyspira hyodysenteriae* (以下、Bh) による出血性大腸炎を特徴とすると畜場法の全部廃棄対象疾病であり、鹿児島県では平成 19 年から全国食肉衛生検査所協議会微生物部会「豚赤痢の判定基準について」[1]を基に作成した豚赤痢検査実施標準作業書に準じて検査を実施している (以下、従来法)。従来法において Bh の分離培養に使用する 1/2BJ 培地は、豚糞便抽出液、羊脱繊維血液、5 種類の抗生物質 (コリスチン、バンコマイシン、スペクチノマイシン、リファンピシン、スピラマイシン) を必要とする培地のため (図 1)、作製が煩雑である。さらに、市販の羊脱繊維血液の使用期限等を考慮すると、一度に必要な数以上を作製し保管することになるため、保管条件によっては培地が劣化し、Bh の発育が悪い事例がある。そこで、今回、より簡便で効率的な Bh 分離及び検査法について比較検討したので、報告する。

材料及び方法

平成 28 年 4 月から平成 29 年 6 月の期間、管内と畜場において豚赤痢を疑い保留した豚の大腸を材料として、以下の試験①～③の Bh 分離培地及び試験④ PCR について、従来法の手順 (図 1) に従い、比較試験を実施した。



図 1. 従来法の検査手順

試験①『従来法の各種抗生物質より安価で純度が明確な同等品を使用した 1/2BJ 培地』: 従来法に記載されている各種抗生物質を再検討し、購入可能な薬剤から、より安価で純度が明確な同等品の抗生物質を選択した (図 2)。それらの抗生物質を調製後混合して、1/2BJ 培地を作製し分離培養を行った。

試験① 5種類の抗生物質の検討

	従来法の抗生物質	検討した同等品
コリスチン	コリスチンメタン スルホン酸ナトリウム (Sigma)	コリスチンメタン スルホン酸ナトリウム (和光純薬)
バンコマイシン	バンコマイシン塩酸塩 (Sigma)	注射用バンコマイシン塩酸塩 (シオノギ製薬)
スペクチノマイシン	注射用スペクチノマイシン 塩酸塩水和物 (Upjohn)	注射用スペクチノマイシン 塩酸塩水和物 (ファイザー)
リファンピシン	リファンピシン (Sigma)	リファンピシン (和光純薬)
スピラマイシン	スピラマイシン (Sigma)	スピラマイシン (和光純薬)

()はメーカー名。

図 2. 検討を行った抗生物質一覧

試験②『20%豚糞便抽出液を添加しない 1/2BJ 培地』: Bh は羊血液寒天培地 (以下、血寒) で純培養できることから、20%豚糞便抽出液が Bh の分離に必要な不可欠であるか確認するため、20%豚糞便抽出液を添加しない 1/2BJ 培地を作製し分離培養を行った。

試験③『試験①で検討した抗生物質混合液を塗布した市販の血寒』: 試験②で作製した 20%豚糞便抽出液を添加しない 1/2BJ 培地は、血寒に 5 種の抗生物質を加えた培地であることから、市販の血寒に抗生物質混合液を塗布したものを使用して分離培養を行った (図 3)。

試験③で使用する抗生物質混合液は、従来法で使用する各種抗生物質を培地 1 枚当たりの量に換算し、血寒に塗布した際に吸収されやすい量（100 μ l）になるよう 2 倍濃度に調製後混合し、1 検体分ずつ小分けし冷凍した（図 4）。検査実施時に、血寒の表面をふ卵器内で軽く乾かし、解凍した抗生物質混合液を 100 μ l 滴下、コンラージ棒で塗布したものを使用した（図 5）。

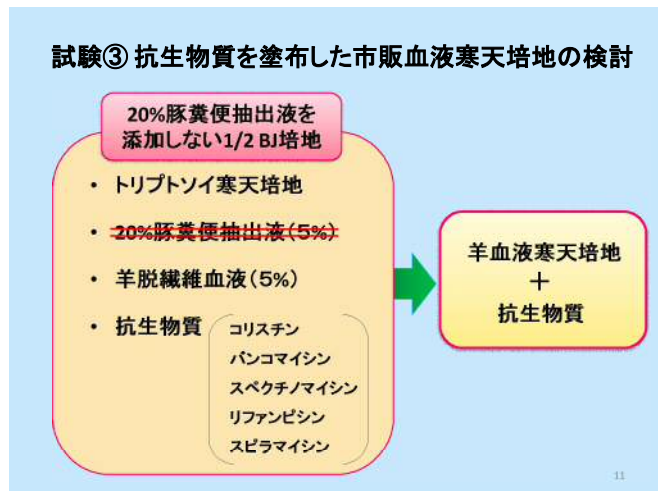


図 3. 抗生物質を塗布した血液寒天培地の検討

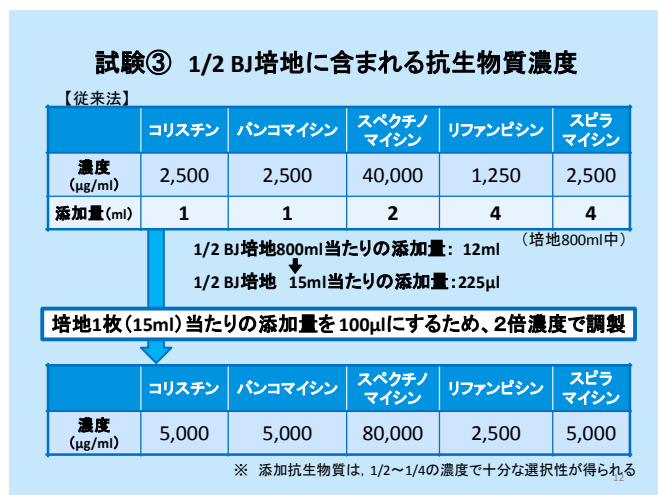


図 4. 塗布した抗生物質の濃度調製

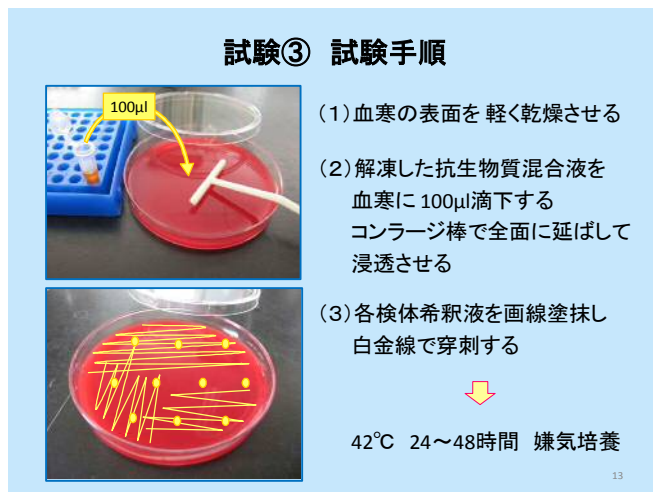


図 5. 抗生物質塗布血寒を用いた検査手順

試験④ 従来法 PCR とコロニーダイレクト PCR の検出感度及び作業工程の比較：検査で分離した Bh について、サイクラー前に DNA 抽出工程が必要な従来法 PCR とコロニーダイレクト PCR との作業工程と結果の比較を行った。試薬については、従来法 PCR は TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)、コロニーダイレクト PCR は EmeraldAmp PCR MasterMix (タカラバイオ)、Quick Taq HS DyeMix (東洋紡) を使用した（図 6）。

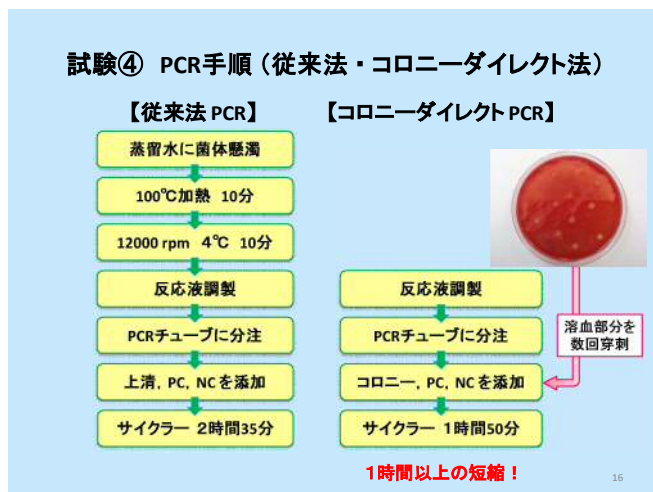


図 6. PCR 検査手順の比較

成績

試験①の培地は、従来法の 1/2BJ 培地と同様に他菌の発育を抑制し、24 ~ 48 時間で β 溶血性薄膜状コロニーを形成し、穿刺部には β 溶血環を認めた。コロニーからグラム陰性らせん状菌を確認後、PCR

で Bh と同定することができた。

試験②では、試験①と同様に、従来法の 1/2BJ 培地と同等の結果が得られた。

試験③においても、試験①、②と同様に、従来法の 1/2BJ 培地と同等の結果が得られた（図 7）。

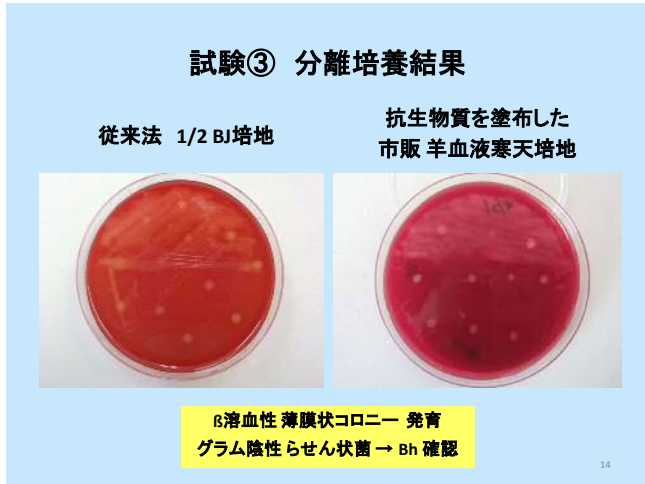


図 7. 抗生物質塗布血寒の Bh 分離培養結果

試験④の PCR 比較では、従来法 PCR よりコロニーダイレクト PCR の方が検出感度が良いケースもあるなど、同等以上の結果が得られた。また、DNA 抽出工程が不要で作業が簡便なため、検査時間を短縮できた（図 8）。

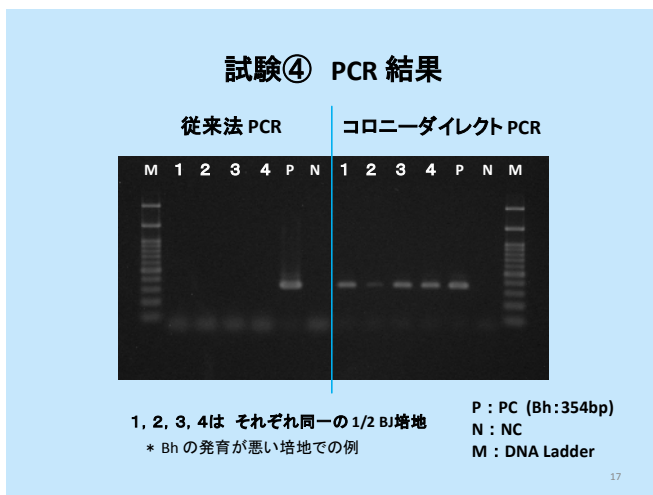


図 8. PCR 結果の 1 例

考 察

試験①において、従来法の各種抗生物質を検討した結果、費用を半分以下に抑えられ、1 薬剤を注射用アンプル液に変更したことで、抗生物質混合液

の調製作業を簡略化することもできた。試験②で、豚糞便抽出液は Bh の発育に必ずしも必要ではないと確認できたことから、市販の血寒に抗生物質混合液を必要量塗布したものを使用して培養したところ、Bh を良好に分離することができた（試験③）。この試験③の方法は、従来法の 1/2BJ 培地作製時の温度による抗生物質の失活、培地作製後の冷蔵保管条件及び光・温度感作等による経時的な培地の劣化の問題を解決し、また、高価な各種抗生物質も検査の都度必要量を解凍して使用するため、さらにコストの削減を図ることができた。加えて、試験④のコロニーダイレクト PCR は、作業の簡略化と検査時間の短縮、確実性の向上、費用の削減が見込めた。

これらのことから、各種抗生物質を塗布した血寒（市販）による Bh の分離培養とコロニーダイレクト PCR による Bh の同定を採用することは、簡便性、効率性、費用削減の上で、有用な検査法と考えられる。

参 考 文 献

- [1] 全国食肉衛生検査所協議会微生物部会：「豚赤痢の判定基準について」（平成 18 年 2 月 6 日 全食検協微第 12 号）
- [2] 全国食肉衛生検査所協議会：新・食肉衛生検査マニュアル，233-237（2011）
- [3] 農林水産省消費・安全局：病性鑑定マニュアル 第 3 版，250-251（2008）

鶏大腸菌症由来 *Escherichia coli* の薬剤耐性および遺伝的特徴

神田卓弥 牧田真悠子 田中輝美 久保田堯 藤元英樹 吉満文隆
志布志食肉衛生検査所

はじめに

鶏大腸菌症は、鶏病原性大腸菌(Avian Pathogenic *Escherichia coli*; APEC)により生じる感染症であり、主に呼吸器により感染し、血行性に全身性疾患を生じ敗血症を呈する。また、我が国では、鶏大腸菌症は農場においては斃死、食鳥処理場においても全部廃棄疾病の主因の一つであるため、養鶏農家における重大な経済的損失の原因となっている[1]。APEC の病原性には付着因子、鉄の獲得能、血清抵抗性などの関与が知られており、その他に毒素、バクテリオシン、プロテクチンなども関連が示唆されている[2]。発症要因として混合感染、宿主の生理的要因、環境要因が報告されており[2]、多くの要因が鶏大腸菌症に関与していると思われる。

またAPEC、それ以外の大腸菌でも多剤耐性が問題となっており、現在、最終選択薬であるコリスチンに対しても耐性の報告があり[3]、大腸菌における薬剤耐性は治療を行う上で重要であると考えられる。

そこで、鶏大腸菌症に関与する APEC について、病原体の現状を把握する目的で、薬剤感受性ならびに分子生物学的調査を実施した。

材料と方法

・APEC の分離および保存

2017年5月～6月において当検査所が所管する食鳥処理場に搬入された14農場の鶏を対象とした。解体検査において大腸菌症として判定された個体を1農場あたり5～10羽無作為抽出し、肝臓70検体を採材した。なお、本県の鶏大腸菌症の判定基準である肝臓等にチーズ様炎症産物の付着を認めた個体を鶏大腸菌症と判定した。採材した肝臓は数時間以内に無菌的にDHL培地(栄研化学)にスタンプし、37°C好気条件下で一晩培養を行った。その後、1検体につき *E. coli* と思われる赤色の3コロニーを、EMB培地(栄研化学)に画線塗抹し、上記の条件で一晩培養し、金属光沢を認めた株を *E. coli* とした。分離株は、10%スキムミルク(BD)、30%グリセリン(ナカライテスク株式会社)添加PBSに懸濁し、-80°Cで使用まで保存した。DNA抽出には Insta-Gene Matrix (Bio-rad)を用い、説明書に準拠し抽出し、-20°Cで保存した。

・薬剤感受性試験

分離株は、K-B法によるセンシディスク(BD)を用いた薬剤感受性試験を実施した。選択薬剤としてアンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、コリスチン(CL)の2

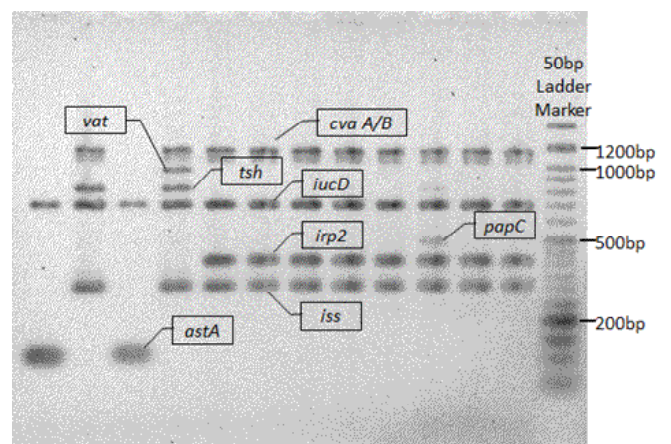


図1 野外株におけるVGAs保有状況

系統3薬剤を使用した。

さらにABPC、CEZでいずれかに対して耐性を示した株で、*bla*_{TEM}を[4]、CL耐性株は *mcr-1*、*mcr-2* の遺伝子保有[5]をそれぞれ Quick Taq HS(TOYOBO)を用いて、PCRにより確認した。

・病原性関連性遺伝子

病原性関連性遺伝子(virulence associated genes; VAG)の保有状況調査として、鉄キレートに関与する *iucD*、*irp2*、接着に関与する *papC*、*tsh*、毒素産生に関与する *astA*、*vat*、血清抵抗性に関与する *iss*、コリスチンVプラスミドに関与する *cva A/B* の8遺伝子を対象に、Multiplex-PCRにより調査した[6](図1)。

さらに、分離された APEC の病原性関連遺伝子保有パターン(Molecular Pathotype; MP)を鶏レベルで評価した。

・統計

Excel 2015 (Microsoft office)によりデータベースを作成し、グラフ、散布図を描画した。統計解析は R3.4.0 (<https://www.r-project.org/>)を用い、一般化線形モデルにより実施した。

結果

・分離結果

72 検体中、70 検体から 186 株の *E. coli* が分離された。

・薬剤耐性

薬剤耐性は ABPC28.5%(53 株)、CEZ23.1%(43 株)、CL1.1%(2 株)となった。なお、CL 耐性株は、ABPC、CEZ に対しては感受性であった。農場毎においては、ABPC、CEZ(0-87%)で差を認めた(図 2)。また、ABPC、CEZ いずれかに耐性を示した 54 株中、35 株で *bla*_{TEM} の保有を確認した。また、CL 耐性 2 株のうち 1 株において *mcr-1* 遺伝子陽性を示したが、*mcr-2* は検出されなかった。

・VAG

分離株 186 株中 184 株でいずれかの VAG の保有を認めたが、2 株については、いずれの遺伝子も陰性

であった。いずれかの VAG を有した 184 株は 31 種類 (VAG を有していない2株を除く) の MP に分類された。その中で頻度の高かったものを表2に示した。また、鶏における APEC は単一の MP である個体と複数の MP である個体が存在していた。MP と斃死率、廃棄率との相関は認められなかった。

農場毎における、VAG の保有状況と農場における斃死率(斃死率)、食鳥処理場における大腸菌症による廃棄率(廃棄率)との比較を行ったが、これらの間に有意差は認められなかった(p>0.10)(表 1)。

次に、宿主への侵襲性に関与すると思われる接着、毒素因子に関与する遺伝子の保有状況と斃死率、廃棄率との比較を実施したが、有意差を認めなかった(p>0.10)

考察

本調査において、薬剤耐性はいずれの薬剤も既報と同等程度もしくはそれ以下の獲得率であったが[2、7]、薬剤耐性と斃死率、廃棄率の関連性は認められなかった。ABPC、CEZ 耐性は、農場において大きな差を認めたが、農場でのこれらの薬剤の使用履歴は確認されず薬剤耐性の原因は不明であった。また、飼料添加物として発育促進の目的で CL の使用を認めたが、薬剤耐性は既報と比較して[8]、大きな差を認めなかったことから、飼料添加物として低用量の CL 使用が CL 耐性獲得に関与している可能性は低いと思われた。

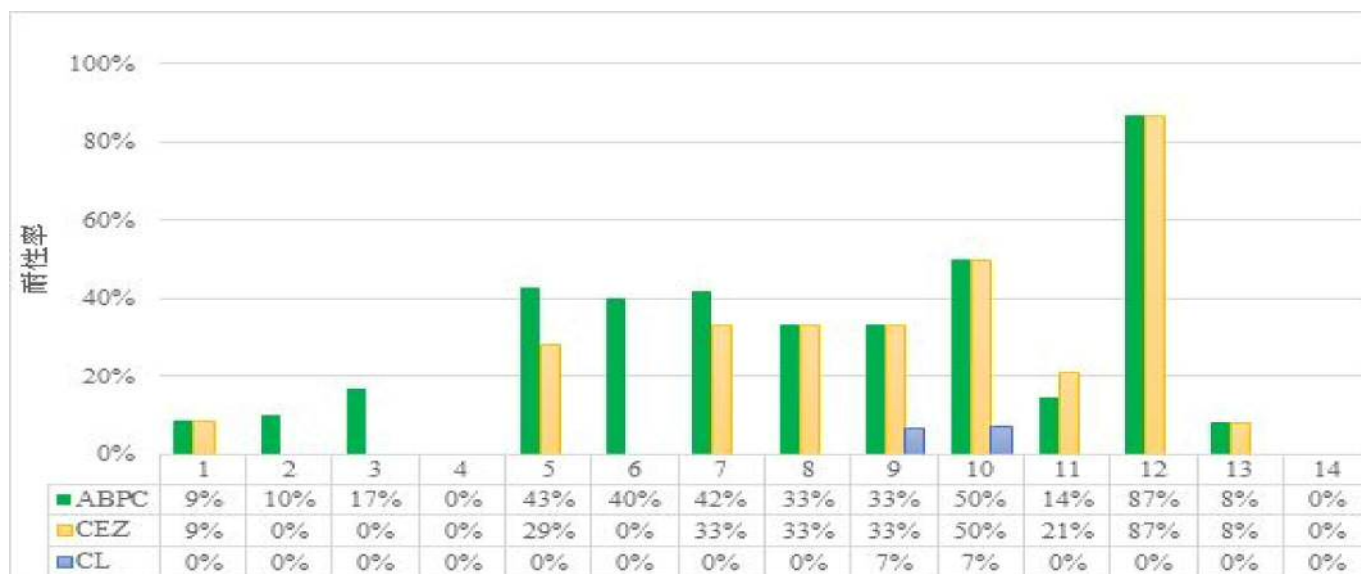


図 2 農場毎の薬剤耐性率

表 1 農場ごとの VAGs 保有率と斃死率、廃棄率

Farm No	斃死率	廃棄率	VAGs(%)							
			<i>iucD</i>	<i>iss</i>	<i>irp2</i>	<i>cva A/B</i>	<i>astA</i>	<i>tsh</i>	<i>papC</i>	<i>vat</i>
1	0.43	0.1	90	60	50	30	10	20	20	0
2	4.90	0.3	100	93	100	87	13	13	33	20
3	0.35	0.4	100	92	50	25	25	8	25	17
4	0.26	0.6	100	71	57	21	7	36	7	0
5	0.60	0.6	100	100	100	75	0	17	0	17
6	1.60	0.6	100	27	100	0	55	0	27	0
7	2.00	0.7	85	77	46	54	23	8	0	0
8	4.30	1.0	87	80	7	27	13	33	7	13
9	0.26	1.5	100	21	64	21	21	0	0	14
10	1.40	1.5	100	87	87	93	7	20	0	7
11	0.43	1.7	33	17	17	0	67	0	33	17
12	2.87	2.2	93	79	64	71	21	14	0	7
13	0.35	3.1	100	92	42	8	33	0	8	0
14	3.20	3.4	96	83	39	35	9	4	4	13
総計			91.7	69.9	58.8	39.1	21.8	12.4	11.8	8.9

表 2 APEC の主要な MP

MP	農場数	株数	羽数*
<i>iucD, iss, irp2, cva A/B</i>	8	45	22(10)
<i>iucD, iss</i>	8	34	19(7)
<i>iucD, astA</i>	7	10	8(1)
<i>iucD, iss, irp2</i>	3	10	8(1)
<i>iucD, irp2</i>	5	10	5(3)
<i>iucD, iss, irp2, cva A/B, tsh</i>	6	8	7(0)

*0内は単一 MP であった鶏の数

本国を含め世界的に大腸菌の CL 耐性は重要視されており[3、8、9]、大腸菌のみならずサルモネラ属菌等の腸内細菌科へのプラスミドによる薬剤耐性遺伝子の伝達が危惧されている状況であった。これらのことから APEC に対する治療の際には、農場毎に薬剤感受性試験を実施し、適切な抗菌剤を選択することが重要であると思われた。

鶏大腸菌症の肝臓から高率に VAG を保有した APEC が分離され、既報と同様に[2、5、10]、鶏大

腸菌症にこれらの VAG が関与している可能性が示された。本調査において、各 VAG の保有率は既報とほぼ一致しており[2、10]、鉄キレートに関与する遺伝子の保有が高率であった。鉄キレートの明確な病原性の機序は不明であるが、関与が示唆されているため、今後も保有に関する調査を実施する必要があると思われた。しかし、VAG と斃死率、廃棄率との関連性は明らかにできなかった。また、MP と斃死率、廃棄率の間に相関は認められず、一羽の鶏から複数の MP が検出されている個体もあり、大腸菌症のファクターとなる MP も特定できなかった。

鶏大腸菌症に罹患している個体の糞便に APEC が排出されるため、農場での感染拡大にもつながり、くわえて、鶏は卵生であるために牛、豚と比較すると移行免疫が少なく、鶏の健康状態は衛生管理に依存している。これらのことから農場における的確な治療薬の選択、適切な飼養衛生が重要であると思われる。今後、より詳細に本菌の病原性と宿主への関与、APEC の農場間・内の変遷を調査し、農場へのフィードバック等に生かし、鶏大腸菌症低減につなげていきたいと考える。

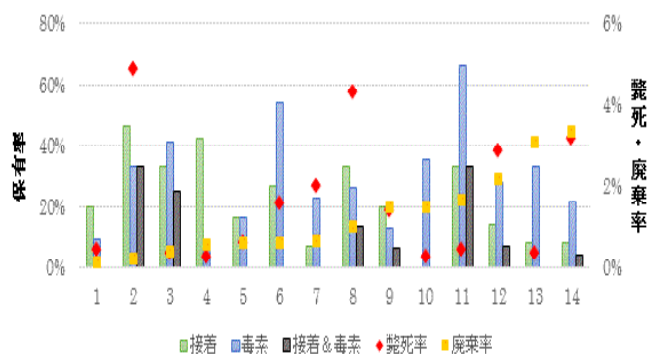


図3 農場毎の因子別遺伝子の保有率と斃死率、廃棄率

最後に、本研究遂行にあたり、サンプル提供を快諾していただいた食鳥処理場関係各位の厚意に深謝する。

参考文献

[1] Barnes HJ, Gross WB : Diseases of Poultry, 10th edition, 131 – 141, Iowa State Univ Press, Ames(1997).

[2] Kiguchi Y, Ojima T, Endoh C, Saito Y and Kusumoto M. β -Lactamase Production and Molecular Epidemiological Characteristics of *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens. Jpn Vet Med Assoc, 67, 739-746 (2014).

[3] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong, B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu, JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis, 16, 161-168 (2016).

[4] Alsultan A. A, Aboulmagd E, Tarek T. ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in Al-Ahsa, Saudi Arabia: antibiotic susceptibility and prevalence of *bla_{SHV}* and *bla_{TEM}*. J Infect Dev Ctries, 7, 1016-1019 (2013).

[5] Barbieri L N, Nielsen ND, Wannemuehler Y, Cavender T, Hussein A, Yan S, Nolan L, Logue CM. *mcr-1* identified in Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). PLoS One, DOI:10.1371/journal.pone.0172997 (2017).

[6] Christa E, Traute J, Sabine K, Philipp CH, Wieler HL. Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Avian Dis, 49, 269-273 (2005).

[7] Barbieri NL, de Oliveira AL, Tejkowski TM, Pavanelo DB, Rocha DA, Matter LB, Callegari-Jacques SM, de Brito BG, Horn F. Genotypes and pathogenicity of cellulitis isolates reveal traits that modulate APEC virulence. PLoS One, 8, e72322 (2013).

[8] Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, Shima A, Yamashita A, Sekizuka T, Kato K, Kuroda M, Koike R, Kijima M. Prevalence of Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan. Antimicrob Agents Chemother, 61, e02057-16 (2016).

[9] Suzuki S, Ohnishi M, Kawanishi M, Akiba M, Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. Lancet Infect Dis, 16, 284-285 (2016).

[10] Jeong YW, Kim TE, Kim JH, Kwon HJ. Pathotyping avian pathogenic *Escherichia coli* strains in Korea. J Vet Sci, 13, 145-152 (2012).