

第3章 調査研究

令和5年度 調査研究

- 管内と畜場における豚の *Yersinia* 属菌保有状況
阿久根食肉衛生検査所 富野 由通
- 県内と畜場で分離された大腸菌の各種病原因子の保有状況
大口食肉衛生検査所 芝野 秀和
- 家畜における *Escherichia albertii* の保菌状況調査
鹿屋食肉衛生検査所 上村 綾萌
- 管内と畜場における豚胸膜肺炎に関する調査
串木野食肉衛生検査所 杉本 源
- ウシの腹腔内に認められた *Actinobacillus lignieresii* による多巣性化膿性肉芽腫性炎
志布志食肉衛生検査所 丸山 覚詞
- 豚の舌及び筋間脂肪組織でみられた嚢胞性病変の2症例
末吉食肉衛生検査所 東條 悦子
- 鹿児島県内のと畜場で認められた牛、豚におけるリンパ腫の組織学的分類
串木野食肉衛生検査所 猪俣 有美
- 選択分離培地を用いたサルモネラ検査法簡略化の検討
鹿屋食肉衛生検査所 安樂 雄太
- 保存菌株の16s rDNA解析を活用した菌種同定の試み
阿久根食肉衛生検査所 神田 卓弥

管内と畜場における豚の *Yersinia* 属菌保有状況

富野由通 小牟田綾 戸田昌宏¹⁾ 赤坂敬史郎 宇都誠二

阿久根食肉衛生検査所 1) 末吉食肉衛生検査所

はじめに

Yersinia 属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、4℃以下でも発育可能な低温細菌である。食中毒の原因となる病原性 *Yersinia* 属菌は、病原因子を保有した *Yersinia enterocolitica* (以下, *Y.e*) および *Y. pseudotuberculosis* (以下, *Y.p*) であり、国内での食中毒事例では過去に集団感染例も報告されている[1]。食中毒の原因食品は本菌に汚染された井戸水や食肉等が考えられ、市販生豚肉からの検出報告もある[2]。今回、豚肉に対する本菌の汚染リスクについて把握するため、管内と畜場搬入豚の腸管内 *Yersinia* 属菌の保有状況及び病原性等について調査したので概要を報告する。

材料及び方法

(1) 材料

2022年12月に管内と畜場に搬入された豚50頭(5農場、各10検体)の直腸内容物を材料とした。

(2) 分離・同定

直腸内容物 1 g を PBS 9 ml と混和し、4℃、4週間培養した。その後、0.75%水酸化カリウム加0.5%塩化ナトリウム水溶液を培養液と同量加え、30秒間アルカリ処理し、CHROMagar *Y. enterocolitica* に接種し30℃、24~36時間培養した。*Y.e* 及び *Y.p* を疑う紫色及び青色コロニーを1平板あたり最大5コロニー釣菌し、Api rapid ID32E を用いて菌を同定した。

(3) 血清型別・生物型別・自己凝集性試験

同定された菌株は、エルシニア・エンテロコリチカO群別用免疫血清「生研」を用いて血清型別を行った。さらにWautersら[3]の生物型分類に基づき、糖分解能を含む生化学性状を確認し、生物型別を行った。また、病原性を調べるため、BHI培地に分離株を接種し37℃24時間培養し、自己凝集性の有無を確認した。

(4) 病原性遺伝子の検出

純培養した菌株からDNAを熱抽出し、PCRにより[4]、表1に示す病原性遺伝子(*ail*, *yadA*, *VirF*, *ystA*)の保有状況を確認した。

表1 病原性遺伝子の役割, 増幅サイズ, プライマー配列

病原性遺伝子	病原性遺伝子の役割	増幅サイズ (bp)	プライマー配列(5' - 3')
<i>ail</i>	プラスミド上の <i>Y.e</i> , <i>Y.p</i> 共通の“ <i>Yersinia</i> outer-membrane proteins”制御に関わる	351	F: GGCAGAACAGCAGTCAGACATA R: GGTGAGCATAGAGAATACGTCG
<i>yadA</i>	プラスミド上の自己凝集性, 接着に関わる	849	F: CTTAAGATACTGGTGTGCGCTGT R: ATGCCTGACTAGAGCGATATCC
<i>VirF</i>	染色体上の細胞への接着, 侵入に関わる	561	F: TAATGTGTACGCTGCGAG R: GACGTCTTACTTGCACTG
<i>ystA</i>	染色体上の耐熱性エンテロトキシン	79	F: ATGCACACCAATAACCGCTGAG R: CCAATCACTACTGACTTCGGCT

結果

管内と畜場搬入豚の直腸内容物 5 農場50検体中、A, C, E 3 農場 9 検体 (18%) から *Yersinia* 属菌が分離され、そのうち Y.e が C, E 2 農場 8 検体から分離された。分離された Y.e の血清型はすべて O3 であり、生物型はいずれも 4 型であった。また、ヒトに対して病原性を示さない *Y. intermedia* (以下、Y.i) が 1 農場 1 検体から検出され、Y.p は分離されなかった。分離されたすべての Y.e 株は CHROMagar *Y. enterocolitica* 培地上で病原性を示す紫色コロニーであり (図 1)、自己凝集性試験においても全株が凝集した。さらに Y.e 全 8 株が病原性遺伝子である *ail*, *yadA*, *VirF*, *ystA* 遺伝子 4 種類すべてを保有していた (表 2)。



図 1 CHROMagar *Y. enterocolitica* 培地上の病原性 Y.e (紫色コロニー：青矢印)、その他 *Yersinia* 属菌及び腸内細菌科属菌 (青色コロニー：赤矢印)

考察

Y.e は家畜や野生動物、環境中など広く自然界に分布し、中でも豚が重要な保菌動物として知られている。今回の調査で、管内と畜場に搬入される複数農場の豚の腸管内から病原性を有する Y.e が検出され、分離された菌株は、過去の集団食中毒事例で報告のあった血清型 O3 であった [5]。また、ヒトに病原性を示す Y.e 株は特定の血清型：生物型に属することが知られており、分離された株はすべて血清型 O3：生物型 4 で既報と同様の結果であった [6]。

また、本菌は 0～4℃の低温条件下でも発育可能な菌であることから、枝肉が汚染された場合、豚肉の冷蔵流通から保管、販売の過程において菌が増殖し、食中毒を引き起こすリスクにつながる。と畜場におけるエルシニア食中毒の予防対策として、解体工程における枝肉の消化管内容物汚染を防ぎ、汚染が認められた場合は適切なトリミングを徹底することが重要である。今回得られた結果を施設側に周知し、効果的な衛生指導につなげたい。

表 2 分離株の菌種、血清型、生物型、自己凝集性及び病原性遺伝子の保有状況

分離株No	菌種	血清型	生物型	自己凝集性	病原性遺伝子			
					<i>ail</i>	<i>yadA</i>	<i>VirF</i>	<i>ystA</i>
A-1	Y.i	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*	NT*
C-1	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
C-2	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
E-1	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
E-2	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
E-3	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
E-4	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
E-5	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+
E-6	Y.e	O3	4	+	+	+	+	+

NT : not tested

ま と め

今回の調査で、管内と畜場搬入豚5農場50検体中、2農場8検体から Y.e が分離され、分離された菌株はすべて血清型 O3 : 生物型 4 であった。また、分離 Y.e 全株が 4 種類の病原性遺伝子を保有していた。このことから、管内と畜場搬入豚が病原性 Y.e を保菌していることが明らかとなり、と畜場の解体工程において枝肉の消化管内容物汚染を防ぎ、汚染が認められた場合の適切なトリミングの重要性が再認識できた。

今後も、と畜場における HACCP に基づく衛生管理の徹底を啓発し、より安全な食肉の生産に寄与していきたい。

参考文献

- [1] Asakawa Y, Akahane S, Kagata N, Noguchi M, Sakazaki R, Tamura K : The Journal of Hygiene, 71, 715-723(1973)
- [2] Asakawa Y, Aakahane S, Shiozawa K, Honma T : Microbiology and Immunology, 5, 115-121(1979)
- [3] Wauters G, Kandolo K, Janssens M : Microbiology and Immunology, 9, 14-21(1987)
- [4] P Thoerner, C I Bin Kingombe, K Bögli-Stuber, B Bissig-Choisat, T M Wassenaar, J Frey, T Jemmi : Environmental of biotechnology, 69(3), 1810-1816 (2003)
- [5] Hayashidani H : Japanese Journal of Food Microbiology, 33(4), 175-181(2016)
- [6] Zen-Yoji H, Maruyama T : Japanese Journal of Food Microbiology, 16(6), 493-500(1972)

牛及び鶏を対象とした *Escherichia albertii* の保菌状況調査

上村綾萌 栗脇耕二
鹿屋食肉衛生検査所

はじめに

Escherichia albertii(以下, E.a)はグラム陰性通性嫌気性桿菌で, 2003年に新種の*Escherichia*属菌として分類された[1]。ヒトに下痢等の消化器症状を引き起こすことがあり, 新規の食中毒原因菌として注目されている。近年, 国内で本菌による食中毒事例が散発しており, 中には患者数が100名を超える大規模な事例も報告されている[2]。E.aはヒトのほか, 多くの鳥類や哺乳類から分離されているが, E.aの保菌宿主や環境内動態についてはよく分かっていない。家畜においては, 豚や鶏などでE.aの分離報告があり, 家畜由来のE.aがヒトへの感染源となる可能性が考えられている[3-6]。

当検査所では2021年に豚における保菌状況調査を実施し, 豚75頭中1頭からE.aが分離された。今回, 他の畜種でのE.aの保菌状況を明らかにするため, 管内と畜場及び食鳥処理場に搬入された牛及び鶏を対象とした調査を実施した。

材料及び方法

(1) 材料

2023年4~6月に管内と畜場及び食鳥処理場に搬入された牛111頭(23農場), 鶏90羽(2農場8鶏舎)を対象とした。供試動物の盲腸を切開し, 滅菌綿棒で盲腸便を採取し検体とした。

(2) スクリーニング試験

検体をノボビオシン加mEC培地9mlに懸濁し, 42℃一晩増菌培養した。DNA抽出のため, 牛では増菌液100µlをとり遠心(10,000rpm, 10分)した。鶏では5検体の増菌液を100µlずつ等量混和し遠心した(プール試料)。上清を取り除き沈殿からアルカリ熱抽出法でDNAを抽出し, E.a種特異的配列を標的としたNested PCRによるスクリーニング試験を行った(表1)[7]。

(3) 菌分離

スクリーニング陽性となった検体について, 増菌液を0.9%滅菌生理食塩水で 10^3 倍または 10^4 倍に適宜希釈後, DHL寒天培地に塗抹し, 37℃一晩培養した。E.aと疑われる, 乳糖・白糖非分解の白色コロニーを釣菌し, *lysP*, *mdh*, *clpX*の3遺伝子を

標的としたMultiplex PCRを行った(表1)[8]。3遺伝子全て検出した菌株をE.aと同定した。

表1 E.aの検出に用いたプライマー

PCR名	プライマー名	塩基配列(5'-3')	サイズ
スクリーニング 試験 Nested PCR	1st E_al_OF	GGTCCATAATGAATCTGACTGA	846bp
	E_al_OR	CCATATGACAGGCGTAATTGAT	
	2nd E_al_NF	CAGTCGATGGTTTCACCTGA	731bp
	E_al_NR	ACACCGTGGCGAAATGGCA	
同定 Multiplex PCR	clpX clpX_28	TGGCGTCGAGTTGGGCA	383bp
	clpX_411R	TCCTGCTCGGGATTTACG	
	lysP lysP_107F	GGGCGCTGCTTTCATATTTCTT	252bp
	lysP_358R	TCCAGATCCAACCGGAGTATCAGGA	
mdh mdh_50F	CTGGAAGGCGCAGATGTGGTACTGATT	115bp	
mdh_164	CTTGCTGAACCGATTCTTCAATACCG		

結果

(1) スクリーニング試験

牛では111検体中3検体が陽性であった(図1, 表2)。鶏のプール試料は18試料中1試料が陽性であった(表3)。スクリーニング陽性となった牛3検体とプール試料に含まれる鶏5検体について分離培養を行った。

(2) 菌分離

牛3検体からは白色コロニーを認めず、鶏では5検体全てから白色コロニーを合計107個認めた。これらの全てのコロニーについて Multiplex PCR を行い、全て陰性であった(図2, 表2, 表3)。

表2 牛のスクリーニング試験及び菌分離結果

検体数	スクリーニング陽性数 (陽性率)	分離数 (分離率)
111	3 (2.7%)	0 (0%)

表3 鶏のスクリーニング試験及び菌分離結果

検体数	プール試料数	スクリーニング陽性数	分離数 (分離率)
90	18	1	0 (0%)



図1 Nested PCR (2nd PCR) 泳動像

M: 100bp マーカー, P: 陽性対照, N: 陰性対照,
1~21: 検体, 21を陽性と判定した。

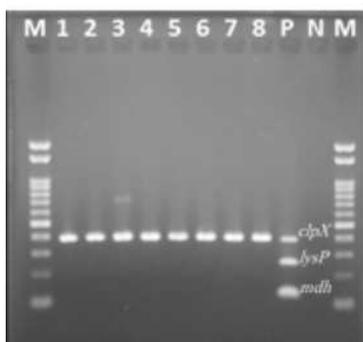


図2 Multiplex PCR泳動像

M: 100bp マーカー, P: 陽性対照, N: 陰性対照,
1~8: 検体, 全て陰性と判定した。

考察

牛及び鶏における E.a の保菌状況については、国内では数例の報告があるのみで E.a の分離例はない(表4)。海外では鶏で分離報告があり、その保菌率は数%程度であった[9]。また、福岡県の調査では市販の鶏肉104検体中2検体(1.9%)から E.a が分離されている[10]。本調査では、スクリーニング試験において牛及び鶏の検体で E.a 種特異的配列を検出したものの、E.a を分離することはできなかった。スクリーニング試験や分離培養方法が異なるため正確に比較することはできないが、これまでの調査と概ね同様の傾向を示した。

これまでの多くの報告で、スクリーニング試験陽性となった検体からの E.a 分離率は低く、菌分離は容易でないことが示されている(表4)。その理由として、既存の増菌培地及び分離培地では E.a の選択性を高める要素は少なく、他の夾雑菌が優位に発育することが考えられる。また、E.a は特徴的な生化学性状が乏しく、既存の分離培地では他の腸内細菌等との区別がつきにくい。

E.a は公衆衛生上重要な細菌であることから引き続き保菌状況調査を行う必要があるが、E.a の分離は容易ではないため、最適な分離培養方法を検討する必要がある。

表4 国内の家畜における E.a の保菌状況調査報告

年	都道府県	畜種	検体数	スクリーニング陽性数(陽性率)	分離数(分離率)	保菌率
2016	静岡県	豚	152	7(4.6%)	2(28.6%)	1.3%
		牛	17	0(0%)		0%
2017	静岡県	鶏(第1報)	100	2(2.0%)	0(0%)	0%
		鶏(第2報)	136	0(0%)		0%
2017	山形県	豚	525	96(18.3%)	17(17.7%)	3.2%
		豚	250	40(16.0%)	17(42.5%)	6.8%
2017	沖縄県	牛	100	0(0%)		0%
		山羊	100	0(0%)		0%
		豚	124	32(25.8%)	20(62.5%)	16.1%
2020	名古屋市	豚	124	32(25.8%)	20(62.5%)	16.1%
		牛	39	0(0%)		0%
2020	東京都	豚	80	-	6	7.5%
		豚	141	4検体1プール試料	0(0%)	0%
2021	宮城県	牛	20	0(0%)		0%
		鶏	269	0(0%)		0%
		フランスガモ	10	0(0%)		0%
		アヒガモ	42	0(0%)		0%
2021	秋田県	豚	105	12(11.4%)	3(25.0%)	2.9%
2021	鹿児島県	豚	75	17(22.7%)	1(5.9%)	1.3%
2023	鹿児島県(本調査)	牛	111	3(2.7%)	0(0%)	0%
		鶏	90	5検体1プール試料	0(0%)	0%

参考文献

- [1] Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 May;53 (Pt 3):807-810. doi: 10.1099/ijs.0.02475-0. PMID: 12807204.
- [2] Tokoi Y, Kataoka S, Wakatsuki A, Tanizawa A, Nakada Y, Seki A, Ishioka M, Arai K, Okago Y, Kaneko J, Hase M, Kihara H : Case Report of *Escherichia albertii* Food Poisoning in Utsunomiya City, *Jpn J Food Microbiol*, 35(3), 159 – 162(2018)
- [3] 佐藤空見子, 永井章子, 小原準, 遠藤千春, 林哲也, 大岡唯祐, 瀬戸順次, 村上光一 : 山形県内と畜場搬入豚の *Escherichia albertii* 保菌状況及びその疫学的特徴, *日本獣医師会雑誌*, 73 (5) , 265 - 273 (2020)
- [4] 比嘉万理子, 岡野祥, 高良武俊 : 家畜における *Escherichia albertii* 保菌状況調査と分離株の解析, *日本獣医師会誌*, 74, 315 ~ 320 (2021)
- [5] 富山満里奈, 市川隆, 村松智恵子, 浅井鉄夫 : 東海地方の家畜からの *Escherichia albertii* の分離と性状解析, *日本獣医師会誌*, 75, e107 ~ e113 (2022)
- [6] 神門幸大, 畠山 薫, 小林甲斐, 久保田寛顕, 小西典子, 小林和弘, 藤澤美和子, 横山敬子, 鈴木淳, 貞升健志 : 都内のと畜場に搬入されたブタの *Escherichia albertii* 検出状況と遺伝子解析, *東京健康安研七年報 Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, 73, 45-50, 2022
- [7] Ooka T, Ogura Y, Katsura K, et al. Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*. *Genome Biol Evol*. 2015;7(12):3170-3179. Published 2015 Nov 3. doi:10.1093/gbe/evv211
- [8] Oaks JL, Besser TE, Walk ST, et al. *Escherichia albertii* in wild and domestic birds. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(4):638-646. doi:10.3201/eid1604.090695
- [9] Hinenoya, A., Li, X. P., Zeng, X., Sahin, O., Moxley, R. A., Logue, C. M., Gillespie, B., Yamasaki, S., & Lin, J. (2021). Isolation and characterization of *Escherichia albertii* in poultry at the pre-harvest level. *Zoonoses and public health*, 68 (3), 213–225.
- [10] Maeda, E., Murakami, K., Sera, N., Ito, K., & Fujimoto, S. (2015). Detection of *Escherichia albertii* from chicken meat and giblets. *The Journal of veterinary medical science*, 77 (7), 871–873.

管内と畜場における豚胸膜肺炎に関する調査

杉本源 小牟田綾¹⁾ 山田耕一¹⁾ 外園千代
串木野食肉衛生検査所 1) 阿久根食肉衛生検査所

はじめに

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下, App)による豚胸膜肺炎は、慢性化した場合、飼料効率及び増体率の低下等を引き起こし、養豚成績に影響を及ぼす呼吸器疾患である。管内と畜場におけるApp発生は年間を通じて多く見られることから、出荷豚のApp浸潤状況及び枝肉成績への影響を把握する目的で、今回、肺炎検体からAppを分離し、分離菌株について薬剤感受性試験を実施した。さらに、App発生率と枝肉成績との関連についても検討したので概要を報告する。

発生状況

2022年9月から2023年1月の期間の管内と畜場のと畜豚79,725頭について、と畜検査管理システムで集計した22農場（交雑種：14農場、バークシャー種：8農場）の月別App発生率について調査した（図1）。

管内と畜場で処理される農場は全て同一系列農場であり、繁殖農場で肥育前期まで飼養した後、肥育後期に各農場で仕上げ肥育を行い出荷される。母豚と子豚のワクチンプログラムや給与飼料及び与える抗菌性物質は同一であるにも関わらず、App発生率は農場間で差があり、また同一農場においても出荷季節間で大きな差がみられた。また、調査期間中の交雑種14農場の平均App発生率は4.3%、バークシャー種8農場は1.5%であり、交雑種が高い傾向にあった。

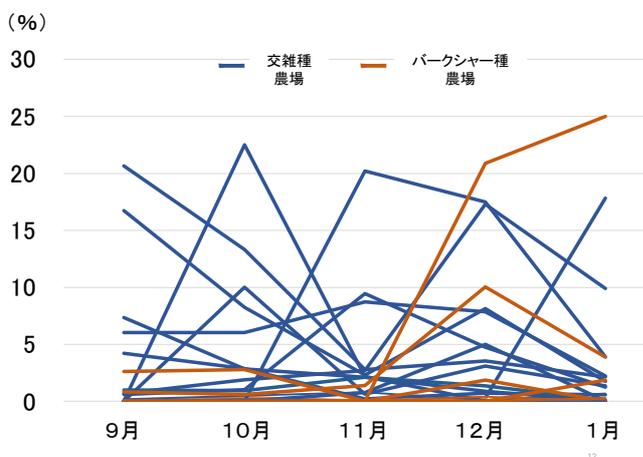


図1 管内と畜場における農場別App発生状況

材料及び方法

(1) 細菌検査：2022年9月から2023年1月の期間のApp発生状況調査から、App発生率の高い10農場を選定し、同時に胸膜炎を伴う暗赤色肺炎病変、肝変化などの肉眼的にApp様肺炎を呈する肺130検体を採取し材料とした。肺病変部を焼烙滅菌後、チョコレート寒天培地に無菌的にスタンプし、37℃、24時間ロウソク培養を行った。Appを疑うコロニーを純培養し、Api NHを用いて簡易同定した後、PCR法による血清型別試験を実施した。また、分離菌株53株について、市販ディスクを用いた一濃度ディスク法により、ペニシリン (PCG)、アンピシリン (ABPC)、アモキシシリン (AMPC)、カナマイシン (KM)、テトラサイクリン (TC)、ドキシサイクリン (DOXY)、エリスロマイシン (EM)、クロラムフェニコール (CP)、コリスチン (CL)、セファゾリン (CEZ)、セフトキサシム (CTX)、スルファメトキサゾール-トリメトプリム合剤 (ST) の8系統12薬剤に対する薬剤感受性試験を実施した。

(2) 枝肉成績調査：前述のApp発生状況調査をもとに、交雑種農場とバークシャー種農場別に、各農場の平均App発生率3%以上をApp高発生農場群、3%未満をApp低発生農場群とした。さらに、と畜場から提供された枝肉重量及び格付け上物率（極上と上との合計）について、App高発生農場群と低発生農場群のそれぞれの平均値を算出し、両群の枝肉重量及び格付け上物率の関係について、Welchのt検定を実施した。

結果

(1) 細菌検査に供したApp様肺炎130検体のうち、92%にあたる120検体からAppが分離され、血清型はApp 2型が117株、1型が3株であった。また、交雑種農場では全てApp 2型、バークシャー種農場からはApp 2型に加え1型3株が分離された(表1)。さらに、App 2型50株、1型3株について分離した菌株の中から薬剤感受性試験の結果は、App 2型全株がカナマイシン及びST合剤に耐性を示し、テトラサイクリン系薬剤にも高率に耐性を示した。また、App 1型3株全てがカナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールに耐性を示した(表2)。農場別の薬剤耐性パターンは、農場ごとに異なる傾向を示し、53株全てにおいて2薬剤以上の耐性を認めた。さらに、バークシャー種農場のApp 2型8株で、5種類の薬剤に対する耐性が認められた(表3)。

表1 農場別App分離状況

農場	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	合計
品種	交雑種							バークシャー種			
供試検体数	25	20	20	10	15	5	10	15	5	5	130
App 1型								2		1	3
App 2型	25	20	18	8	14	5	9	10	5	3	117
農場別合計	25	20	18	8	14	5	9	12	5	4	120

表2 薬剤感受性試験結果(薬剤耐性率)

系統	薬品名	App2型50株耐性率(%)	App1型3株耐性率(%)
①ペニシリン系	ベンジルペニシリン(PCG)	0	0
	アンピシリン(ABPC)	0	0
	アモキシシリン(AMPC)	0	0
②アミノグリコシド系	カナマイシン(KM)	100	100
③テトラサイクリン系	テトラサイクリン(TC)	72	100
	ドキシサイクリン(DOXY)	40	0
④マクロライド系	エリスロマイシン(EM)	0	0
⑤クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール(CP)	34	100
⑥ホリヘパチド系	コリスチン(CL)	0	0
⑦セファロsporin系	セファゾリン(CEZ)	0	0
	セフトキシム(CTX)	0	0
⑧その他合成抗菌薬	スルファメキサゾール/トリメプリーム(ST)	100	0

表3 農場別薬剤耐性パターン

農場	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	耐性パターンの割合(%)
品種	交雑種							バークシャー種			
供試株数	10	8	8	4	6	2	4	6	2	3	
App2型50株	KM-ST			2	2		1	2			14
	KM-CP-ST						3	2	2		14
	KM-TC-ST	10			4						28
	KM-TC-DOXY-ST			8		2				2	24
	KM-TC-CP-ST				2						4
App1型3株	KM-TC-DOXY-CP-ST		8								16
	KM-TC-CP							2		1	100
耐性なし											0

(2) 調査期間中の交雑種農場におけるApp高発生農場群(8農場)の平均枝肉重量は70.39kg、低発生農場群(6農場)は71.00kgであり、バークシャー種農場におけるApp高発生農場群(2農場)の平均枝肉重量は73.39kg、低発生農場群(6農場)は74.68kgであった。交雑種及びバークシャー種ともApp高発生農場群の平均枝肉重量が低い傾向にあったが、両群の平均枝肉重量に有意差は認められなかった(図2)。同様に、交雑種農場におけるApp高発生農場群の平均格付け上物率は54.31%、低発生農場群は60.24%であり、平均枝肉重量と同様、App高発生農場群の格付け上物率が低い傾向にあった。一方、バークシャー種農場におけるApp高発生農場群の平均格付け上物率は50.19%、低発生農場群は46.64%であり、低発生農場群のほうが格付け上物率が低い

結果となったが、交雑種、パークシャー種農場とも両群の平均格付け上物率に有意差は認められなかった（図3）。

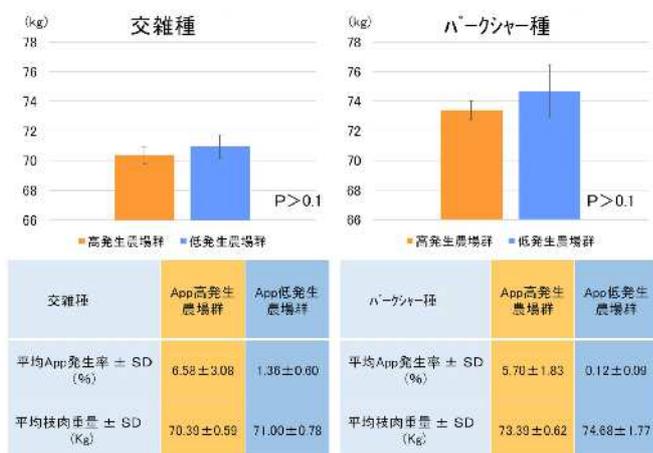


図2 App高・低発生農場群の枝肉重量

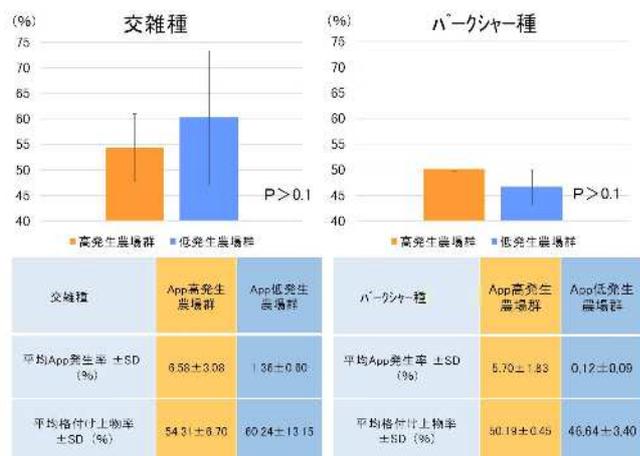


図3 App高・低発生農場群の格付け上物率

考察

今回、管内と畜場におけるApp様肺炎からの分離菌の大部分はApp 2型であり、パークシャー種農場からApp 1型が少数分離された。このことから、農場ではApp 2型が広く浸潤していると考えられ、過去の鹿児島県内におけるApp分離状況と同様の傾向を示した [1]。また、薬剤感受性試験において、供試菌株すべてがカナマイシン耐性であり、さらに、2剤以上の薬剤耐性を認めたことから、Appの薬剤耐性株が増加しているという報告と一致していた [2]。今回の調査農場は全て同一系列農場であるが、App発生率は農場間で著しく差があり、また、薬剤感受性試験においても様々な耐性パターンを示したことから、各農場の飼養衛生状況の差異や菌の常在化による薬剤耐性獲得が影響している可能性がある。今後は、農場における抗菌性物質の使用に慎重を期し、飼養環境の改善を含めた対策が必要であると思われた。また、App発生率と枝肉成績の関連について検討した結果、枝肉重量については、交雑種及びパークシャー種農場ともApp高発生農場群の平均枝肉重量が低い傾向にあったことから、Appによる肺疾患は増体効率を低下させ、枝肉重量に影響を与える可能性があることが示唆された。

今回、管内と畜場搬入豚におけるApp浸潤状況を調査するとともに、と畜検査データと、と畜場から提供された枝肉情報を分析することで、Appが枝肉成績に与える影響について若干の知見を得ることができた。今後も、と畜検査データを活用し多角的な解析を加えたフィードバックデータを農場に還元することで、農場の飼養衛生や成績向上に寄与したいと考える。

参考文献

- [1] 松山とも子：平成10年度鹿児島県食肉衛生検査所業務概要，111～115（1998）
- [2] 有川彰信：日獣会誌 61，705～707（2008）

牛の腹腔内に認められた*Actinobacillus lignieresii*による多巣性化膿性肉芽腫

丸山覚詞 芝原友幸¹⁾ 藤元英樹

志布志食肉衛生検査所 1) 農研機構動物衛生研究部門鹿児島研究拠点

はじめに

牛のアクチノバチルス症は、アクチノバチルス属のグラム陰性桿菌である*Actinobacillus lignieresii*の感染によって発症し、特徴的な所見として硫黄顆粒を含む慢性化膿性肉芽腫が認められる。一般的に病変は頭頸部の軟部組織に好発し、特に硬結性の慢性化膿性肉芽腫性舌炎を引き起こすことから、牛の「木舌」として知られるが[1-3]、リンパ組織を介して肺などの臓器や軟部組織に侵入する傾向があり、肺[4]、四肢[4, 5]、鼻腔[6]、大網[7]、脳及び眼球[8]、腹腔内[3]、帝王切開後の術創[9]などで病変を形成した報告がある。世界各地で散発的に発生が認められ[2,3]、非常に稀ではあるが人の発症例も9例報告されており、うち3例が致死的であったとされ[10]、人獣共通感染症として知られる。

本報告では、解体後検査において腹腔内に播種性腫瘤が認められ、組織検索と分離株の同定により

*A. lignieresii*による牛の腹腔内アクチノバチルス症と診断した事例について、その詳細を述べる。

材料及び方法

(1) 材料

鹿児島県曾於市の黒毛和種生産農場において、56か月齢の黒毛和種の経産牛が食欲不振を呈し、2022年6月1日に獣医師の診察にて消瘦及び肺炎と診断された。当該牛は2022年6月2日に管内と畜場で緊急と畜された。

(2) 病理学的検査

肉眼的検査後、病変部（肝臓、第一胃、第四胃の漿膜下の腫瘤、腸間膜及び骨盤腔の軟部組織の腫瘤）のスタンプ標本を作製し、Diff-Quik染色にて細胞診を行った。また、病変部を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、グラム染色、チールネルゼン染色及びFITE法による組織検索を行った。

(3) 免疫組織化学（IHC）

病変部（腸間膜及び骨盤腔の軟部組織の腫瘤）のパラフィン包埋切片を用いて、Kasuya[3]らの報告に従いIHCを実施した。組織を3%過酸化水素メタノールで室温30分（内因性ペルオキシダーゼ活性の抑制）反応させ、0.1%アクチナーゼE液で37℃20分（抗原賦活化）処理した。その後、抗*A.*

lignieresii serotypes 1 to 6 mix 家兔ポリクローナル抗体（農研機構 動物衛生研究部門、つくば）[3]を一次抗体に用いて室温30分インキュベートし、2次抗体（Histofine Simple Stain MAX-PO（multi）、Nichirei Bioscience Inc., 東京）にてマニュアル通り処理し、AEC（Histofine Simple Stain AEC solution, Nichirei Bioscience Inc.）を用いて室温5分反応させ発色後、ヘマトキシリンで対染色した。

(4) 細菌学的検査

腸間膜腫瘤の断面を羊血液寒天培地（アキュレート™ 羊血液寒天培地、（株）島津ダイアグノティクス、東京）及びチョコレート寒天培地（アキュレート™ チョコレート寒天培地 EX II、（株）島津ダイアグノティクス）に無菌的にスタンプし、5% CO₂及び嫌気条件で37℃48時間培養した。単離された菌株（以下、分離株）に対し、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験を実施し、培養同定・一般細菌キット（IDテスト・HN-20ラピッド「ニッスイ」、（株）日水製薬、東京）による簡易同定を実施した。さらに、分離株をDHL寒天培地（パールコア© DHL寒天培地「栄研」、（株）栄研化学、栃木）、MacConkey寒天培地（MacConkey寒天培地（顆粒）「ニッスイ」、（株）日水製薬）に接種し、5

% CO₂ 条件で 37 °C 48 時間培養した。加えて、Barrow らの成書[11]の記載に基づき *Actinobacillus* 属を区別する生化学性状試験を追加した。

(5) 遺伝子解析

分離株から DNA 精製マトリックス (InstaGene™ Matrix, Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) を用いて DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の約 1,500 bp の領域に対して、ユニバーサルプライマー対である 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')、1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') [12] を用いて PCR を行った。また、*rpoB* 遺伝子の約 440 bp の領域に対して、新規に設計した *rpoB*-F (5'-TTCACAACCTTCGCAATTTATG-3')、*rpoB*-R (5'-TAACGCACGGTTCGCAT-3') プライマー対を用いて PCR を行った。得られた各 PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定し、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて相同性解析を実施した。また、分離株の *rpoB* 遺伝子の部分塩基配列及び BLAST にてこれと高い相同性が認められた NCBI GenBank データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (参照 2023-06-13) 上の全 28 株の塩基配列を供試し、分子系統解析を実施した。統合解析環境として MEGA11 を用いて、MUSCLE プログラムに基づき多重配列アライメント (MSA) を構築し、K2 モデルを採用し最尤法による系統樹推定を実施した。さらに、1,000 回の再サンプリング及び MSA の再構築を行い Bootstrap 法に基づく系統樹推定の信頼性評価を実施した。

成績

(1) 解体後検査における肉眼所見

腹腔内から骨盤腔内にかけて、肝臓、第一胃、第四胃、小腸、大腸などの臓器漿膜下の軟部組織及び腹膜、横隔膜、腸間膜、大網を中心に直径約 1~4cm の腫瘍が播種性に密発し、重度の腹膜炎を伴い広範に癒着していた (図 1)。腫瘍は割するに内部に微小膿瘍を含み、周囲は線維性結合組織によって被覆

されていた (図 2)。腹腔内臓器にみられた播種性腫瘍はいずれも漿膜下に留まり、臓器実質には認められず、枝肉内部にもみられなかった。なお、頭頸部及び胸腔内に著変は認められなかった。



図 1 回腸部周囲の腹腔内播種性腫瘍
Bar = 約 10cm



図 2 腸間膜の腫瘍 Bar = 2cm

(2) 細胞診及び病理組織学的所見

病変部の細胞診では好中球、マクロファージ、リンパ球、多核巨細胞が多数認められた。病理組織学的検査では、検索したすべての腹腔内腫瘍において、微小壊死の散発及びアステロイド体を伴う化膿性肉芽腫性炎が認められた。アステロイド体は HE 染色で弱好塩基性、グラム染色にて陰性を示す桿菌と、桿菌を取り囲む好酸性の Splendore-Hoeppli 物質よりなり、周囲に好中球、類上皮細胞、多核巨細胞が集簇し、ラングハンス型巨細胞も認められた (図 3, 4)。なお、抗酸菌染色 (チールネルゼン染色及び FITE 法) にて陽性を示す菌体は認められなかった。

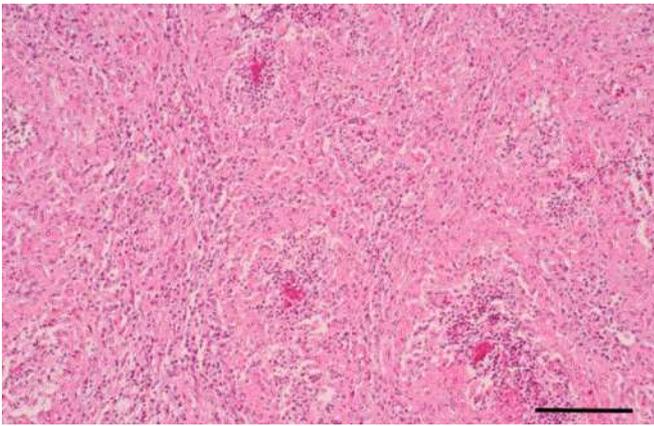


図3 腸間膜腫瘍のアステロイド体を伴う
化膿性肉芽腫性炎 HE Bar = 200 μ m

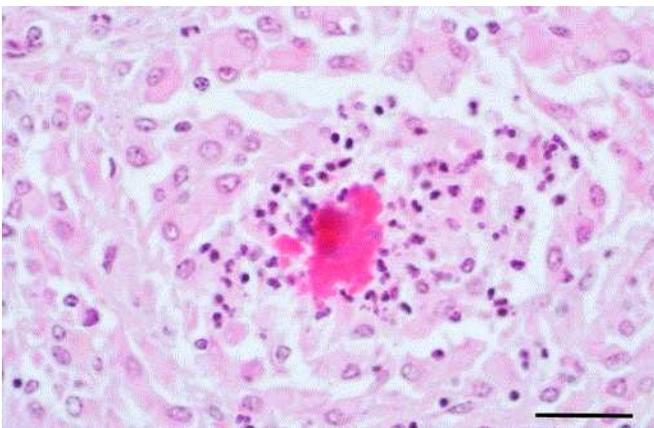


図4 腸間膜腫瘍のアステロイド体を伴う
化膿性肉芽腫性炎 HE Bar = 50 μ m

(3) IHC

病変部のアステロイド体内部に含まれる桿菌は、抗 *A. lignieresii* serotypes 1 to 6 mix 家兎ポリクローナル抗体を用いた IHC で陽性反応を示した (図 5)。

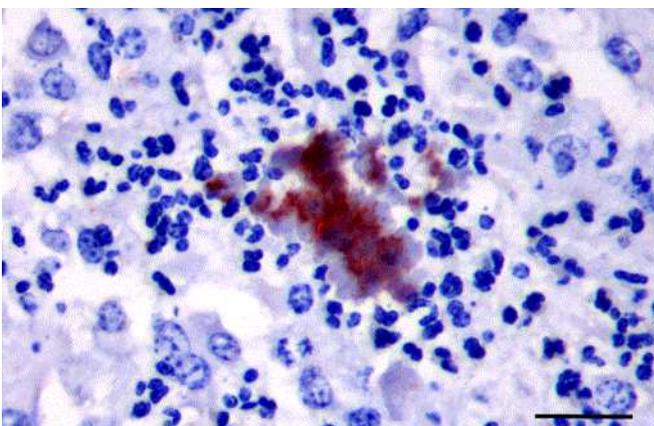


図5 アステロイド体内部の菌体は抗 *A. lignieresii*
血清に陽性反応を示す HE Bar = 50 μ m

(4) 細菌学的検査

全ての培地及び培養条件において、灰白色、S型、非溶血性、やや粘稠性のコロニーの発育が認められた。分離株はカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性を示すグラム陰性桿菌であり、ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」にてアクチノバチルス属菌と推定され、菌種は相対確率の高い順に *Actinobacillus pleuropneumoniae* (54%), *A. lignieresii* (40%) 及び *Actinobacillus equuli* (5%) であった。また、追加で実施した生化学性状試験と併せて表1の結果を得たが、生化学性状のみでの菌種同定には至らなかった。

表1 分離株の生化学性状

生化学性状		Isolated strain
カタラーゼ	(CAT)	+
オキシダーゼ	(OX)	+
MacConkey寒天での発育		+
L-アラビノース	(ARA)	-
乳糖	(LAC)	-
マルトース	(MLT)	+
糖発酵	マンニトール (MAN)	+
ラフィノース (RAF)	+	
糖能	D-ソルビトール (SOR)	-
白糖	(SUC)	+
トレハロース	(TRE)	-
キシロース	(XYL)	+
β -ガラクトシダーゼ	(ONP)	+
エスクリン加水分解	(ESC)	+
硝酸塩還元	(NIT)	+
亜硝酸塩還元	(NIR)	+
インドール	(IND)	-
ゼラチナーゼ	(GEL)	-
ウレアーゼ	(URE)	+
H ₂ S		-
オルニチンデカルボキシラーゼ	(ODC)	-

(5) 遺伝子解析

各増幅産物の BLAST において、分離株との相同性 (%identity) が、16S rRNA : 97%以上かつ *rpoB* : 96%以上である全 28 菌株を表 2 に示す。分離株の 16S rRNA 遺伝子及び *rpoB* 遺伝子の部分塩基配列は *A. lignieresii* 基準株 (NCTC4189 ; GenBank accession number NR_118758, AY170215) の塩基配列とそれぞれ 99.32%, 99.08%一致していた。さらに、*rpoB* 遺伝子配列に基づく分子系統解析では、分離株は *A. lignieresii* 基準株及び *A. lignieresii* 野外株 (NCTC10568 ; GenBank accession number LR134169) と Bootstrap 値 99 でクレードを形成し、表 2 にリストされた *A. pleuropneumoniae* 野外株と

区別された (図 6)。以上の成績より、本症例を牛の腹腔内に認められた *A. lignieresii* による多巣性化膿性肉芽腫と診断した。

表 2 分離株の各遺伝子配列 (16S rRNA 遺伝子及び *rpoB* 遺伝子) と相同性が高い菌株 28 種との比較

No. Species	Strain	Accession No.	SEQUENCE				
			16S rRNA (nucleotide 81-231)	<i>rpoB</i> (nucleotide 262)	% Query cover	Identity	
1	<i>Actinobacillus lignieresii</i>	NCTC10568	1R134169	100	99.67	100	99.54
2		NCTC4189	NR_118758, AY170215	97	99.32	100	99.08
3	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	MIDG2331	LN008249	100	99.40	100	96.56
4		AP_123	CP10664	100	99.40	100	96.56
5		GD2107	CP097377	100	99.40	100	96.56
6		WF83	CP031869	100	99.40	100	96.56
7		405	CP031866	100	99.40	100	96.56
8		AP76	CP001091	100	99.40	100	96.56
9		N273	CP031861	100	99.34	100	96.56
10		16287-1	CP031856	100	99.40	100	96.33
11		7311555	CP031855	100	99.40	100	96.33
12		OR61224	CP031854	100	99.40	100	96.33
13		Femo	CP006996	100	99.40	100	96.33
14		K17	CP069797	100	99.40	100	96.33
15		AP15	CP063424	100	99.40	100	96.33
16		S1421	CP031874	100	99.40	100	96.33
17		8329	CP031862	100	99.40	100	96.33
18		AP06	CP026009	100	99.40	100	96.33
19		JL53	CP006097	100	99.40	100	96.33
20		NCTC10976	LK134515	100	99.34	100	96.33
21		S1536	CP031875	100	99.34	100	96.33
22		P1875	CP079921	100	99.34	100	96.33
23		AP9HAP	KJ919954, KJ919956	97	99.32	100	96.33
24		L20	CP060509	100	99.37	100	96.33
25		A-85/14	CP069195	100	99.20	100	96.33
26		D13039	CP031864	100	99.20	100	96.33
27		BE143	CP031859	100	99.14	100	96.33
28		SC1810	CP071698	100	99.07	100	96.33

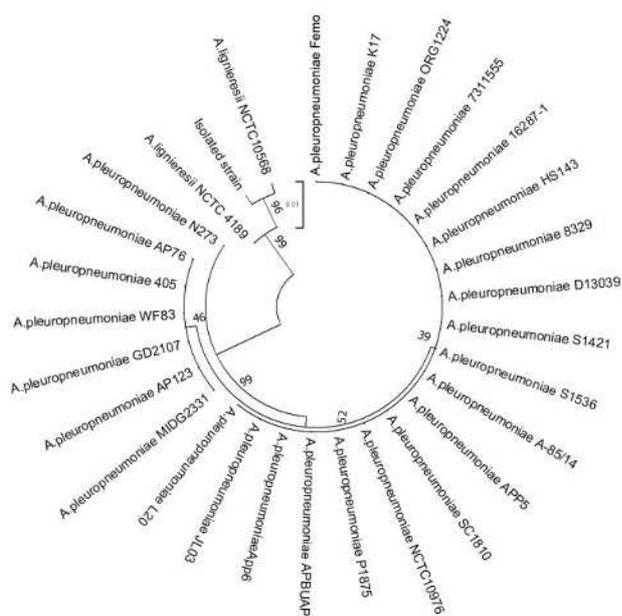


図 6 分離株及び表 2 の 28 株の *rpoB* 遺伝子配列に基づく最尤系統樹 (K2 モデルを採用)

考察

A. lignieresii は、牛の口腔内や第一胃内の常在菌であるが、創傷部から感染する場合があります。典型例では舌や頭頸部の軟部組織に肉芽腫性病変が認められる [1-3, 4]。その一方で、肉芽腫性病変の非定型的な分布として、体表の裂傷に起因する四肢 [4,5]

や術創 [9] での発生例が報告されており、さらに稀な事例として腹腔内 [3], 大網 [7], 脳及び眼球 [8] において既報がある。Kasuya [3] らは、豪州から日本に輸入され、検疫期間中に突然死した雑種アングス牛 (去勢雄, 8~12 か月齢) において、腹腔内播種性に *A. lignieresii* による化膿性肉芽腫が認められたと報告している。本症例の病変分布はこの報告と類似するが、日本国内で生産された黒毛和種 (経産, 56 ヲ月齢) に認められた点が異なっている。本症例では、病原体の腹腔内播種に関連する病歴はみられず、加えて口腔内及び頭頸部に著変は認められなかった。また、明らかな貫通創も確認できなかったため侵入門戸は不明だが、一般的に *A. lignieresii* はリンパ管を介して播種することが知られており [1, 8], 本症例においても *A. lignieresii* がリンパ行性に播種し病変を形成した可能性が考えられた。その一方で、病変部はいずれも腹腔内漿膜面もしくは周囲の軟部組織に留まり、筋層を越えた臓器実質にはみられなかったことから、腹腔内に侵入した *A. lignieresii* が漿膜上に播種され、軟部組織に病変を形成したとも推察された。

アクチノバチルス症は結核と類似した肉眼所見を呈する疾病であり、結核が家畜伝染病予防法における家畜伝染病であることから、特に確実な鑑別が必要とされる。我が国では 2021 年 4 月 1 日を開始日として、国際獣疫事務局 (WOAH) に牛の結核の清浄国と認められたが、肉眼的に結核とアクチノバチルス症などの肉芽腫性病変を鑑別することはできず、Dubarry [13] らはアルゼンチンのと畜検査において、肉眼的に結核と診断した病変の約 14% が実際にはアクチノバチルス症または放線菌症であったと報告している。そのため本症例では組織検索、細菌検査及び遺伝子解析を包括的に実施し、病原体が *A. lignieresii* であることを証明したが、その際に *A. pleuropneumoniae* と鑑別に苦慮した。伊藤 [14] によると、*A. lignieresii* と *A. pleuropneumoniae* はその生化学性状及び抗原性に類似性が認められ、血清学的に交差する場合があります。さらに DNA レベルでも類似性を持っているとされる。実際に *A. lignieresii* 基準株 (NCTC4189 ; GenBank accession number

NR_118758) と *A. pleuropneumoniae* 基準株 (4074; GenBank accession number CP029003) の 16S rRNA 遺伝子配列は 99 %以上の相同性を示す[14]。本症例においても、生化学性状試験及び 16S rRNA 遺伝子解析では、菌種同定は困難であった。ゆえに本症例では、パスツレラ科で強く保存されており 16S rRNA 遺伝子及び DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果と良好な相関関係を持つとされる *rpoB* 遺伝子 [15] を標的として分子系統解析を実施した。分離株と 16S rRNA 遺伝子の相同性が 99 %以上であった *A. pleuropneumoniae* 野外株は、いずれも *rpoB* 遺伝子の相同性は 97 %未満に留まり、最尤系統樹において分離株を含む *A. lignieresii* のクレードと *A. pleuropneumoniae* 野外株のクレードは明確に区別された。*rpoB* 遺伝子は通常、16S rRNA 遺伝子よりも高い分解能を持つとされるが[15]、*A. lignieresii* においても分子系統解析に有用であることが確かめられた。現在、国際データベース上において利用可能な *A. lignieresii* の *rpoB* 遺伝子部分塩基配列データは乏しいが、16S rRNA 遺伝子と *rpoB* 遺伝子を並列評価することはこの種の同定に役立つと考えられる。

今回、牛の腹腔内に *A. lignieresii* による多巣性化膿性肉芽腫が認められた。腹腔内播種性腫瘤を形成する牛のアクチノバチルス症はきわめて稀であり、この特徴的な病変から IHC 及び分離株の同定により *A. lignieresii* を証明した報告はわれわれが知るかぎり国内 2 例目である。さらに、本報告は組織検索、細菌検査、遺伝子解析を包括的に実施し確定診断に至った点において、今後の検査業務の参考となると思われた。

参考文献

[1] Rycroft AN, Garside LH : *Actinobacillus* species and their role in animal disease, Vet. J., 159, 18-36 (2000)

[2] Caffarena RD, Rabaza A, Casaux L, Rioseco MM, Schild CO, Monesiglio C, Fraga M, Giannitti F, Riet-Correa F : Natural lymphatic ("atypical") actinobacillosis in cattle caused by *Actinobacillus*

lignieresii, J. Vet. Diagn. Invest., 30, 218-225 (2018)

[3] Kasuya K, Manchanayake T, Uenoyama K, Kawa S, Takayama K, Imai N, Shibahara T : Multifocal suppurative granuloma caused by *Actinobacillus lignieresii* in the peritoneum of a beef steer, J. Vet. Med. Sci., 79, 65-67 (2017)

[4] Relun A, Cesbron N, Bourdeau P, Dorso L, Brement T, Assié S, Christensen H, Guatteo R : Atypical actinobacillosis affecting hind limbs and lungs in a single beef cattle herd, J. Vet. Intern. Med., 33, 297-301 (2019)

[5] Cahalan SD, Sheridan L, Akers CR, Lorenz I, Cassidy J : Atypical cutaneous actinobacillosis in young beef cattle, Vet. Rec., 171, 375 (2012)

[6] Wessels M, Harwood D, Welchman D, Isaacs A : Rhinitis due to actinobacillosis in a UK suckler cow herd, Vet. Rec., 170, 599 (2012)

[7] Abdul Rahman, Sheikh Omar : Actinobacillosis of the omentum in a cow, Pertanika J Trop Agric Sci, 3, 64-65 (1980)

[8] Salvaggio A, Giunta RP, Percipalle M, Scalzo F, Marino AMF : Infection due to *Actinobacillus lignieresii* in cattle with brain and ocular involvement: histological and microbiological features, Vet. Sci., 10, 311 (2023)

[9] de Kruif A, Mijten P, Haesebrouck F, Hoorens J, Devriese L : Actinobacillosis in bovine caesarean sections, Vet. Rec., 131, 414-415 (1992)

[10] Dutta Arnab, De Abhishek, Das Sudip, Kar Chinmay, Halder Deepika : A rare case of zoonotic infection in human - Emphasising the one health concept, Indian J. Dermatol., 67, 314 (2022)

[11] Barrow G.I. and Feltham R. K. A. : 7. 7 パスツレラ科およびパスツレラ様菌群, 医学細菌同定の手びき, 坂崎利一訳, 第 3 版, 132-135, 菅原律子, 東京 (1993)

[12] Hashemi A, Shojaei H, Heidarieh P, Aslani MM, Naser AD : Genetic diversity of Iranian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, New Microbiol, 35, 61-65 (2012)

[13] Dubarry J. R, Alvarez A. R., Errea A. L., Maria

A. E., Vera O. A., Véspoli Pucheu M. V., & Galeano M. F. : Actinomycosis y Actinobacilosis : una causa frecuente de lesiones granulomatosas en los bovinos del Departamento Maracó de la provincia de La Pampa, República Argentina, *Ciencia Veterinaria*, 6, 34-41 (2004) [in Spanish with English abstract(summary)]
[14] 伊藤博哉 : 動物由来のパスツレラ科に属する細菌の PCR による同定・検出及び血清型の同定法

ならびに RTX 毒素について, 家畜衛生学雑誌, 45, 1 - 38 (2019)

[15] Korczak B, Christensen H, Emler S, Frey J, Kuhnert P : Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1393-1399 (2004)

豚の舌及び筋間脂肪組織でみられた嚢胞性病変の2症例

東條悦子 中島靖剛

末吉食肉衛生検査所

はじめに

と畜検査では、生体検査のほか一頭毎に内臓・枝肉・頭の検査を行っているが、通常のと畜検査では探知することが困難で、解体後のカット処理後や流通後に発見される限局的な病変もみられる。今回、一旦と畜場及び併設食肉処理施設から出荷され、豚の舌の深部の嚢胞、また肩ロース(胸最長筋前方部分)の筋間脂肪に嚢胞が見られたため返品された製品の2症例について病理組織学的検査を行ったのでその概要を報告する。

材料及び方法

と畜場及び併設食肉処理施設から出荷され嚢胞性病変がみられた豚の舌(1)及び脂肪組織(2)を実体顕微鏡で観察し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法に従いパラフィンブロックを作製、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色及びマッソントリクローム(MT)染色、PAS染色を施した。また、豚の舌については塗抹標本を作製しディフクイック染色を行った。

質、好中球、リンパ球などの炎症細胞が観察された(図1, 2)。

結果

(1) 豚の舌については、舌根部に近い中央部分に、灰白色の厚い結合組織様の被膜に縁取られた長径1cm程度の嚢胞が見られた。嚢胞内の緑黄色の泥状の内容物を塗抹し、無染色、ディフクイック染色で鏡検したところ、重層扁平上皮と球形

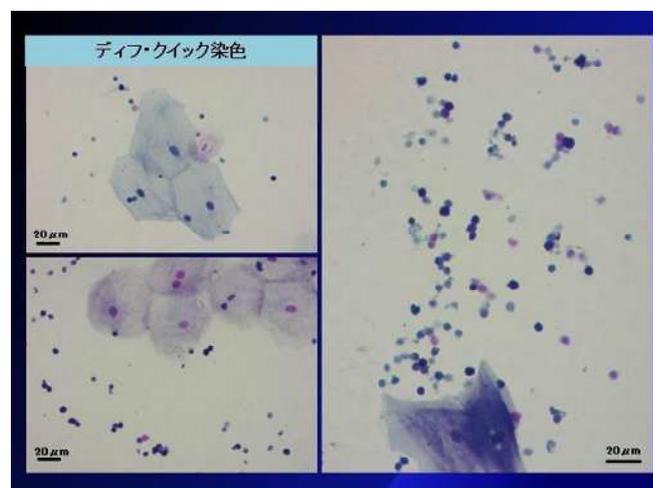


図2：内容物のディフクイック染色

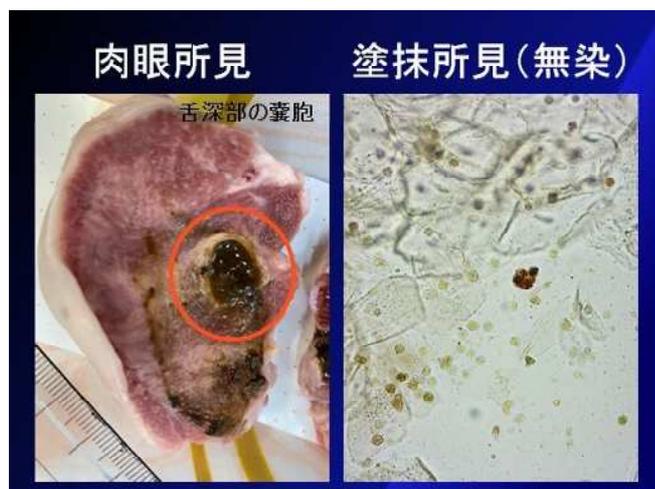


図1：舌深部の嚢胞と無染色塗抹標本の物

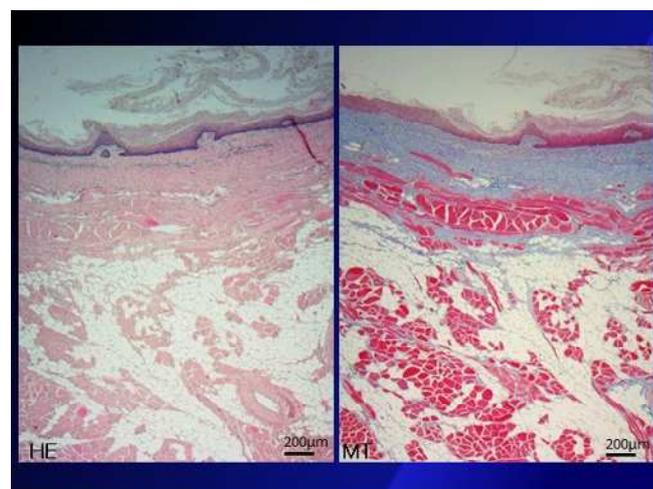


図3：舌嚢胞の重層扁平上皮と脂肪、結合組織

病理組織学的に嚢胞壁は錯角化を呈する重層扁平上皮と結合組織、脂肪組織からなり、正常な舌組織との境界は明瞭ではなかった(図3)。

嚢胞の内腔付近では錯角化を呈する重層扁平上皮と好塩基性のケラトヒアリン顆粒を有する顆粒細胞、有棘細胞、基底細胞層が認められ、真皮乳頭を形成していた。腔内では変性角化物や黄褐色球形の物質とともに好中球などの炎症細胞もみられた(図4)。

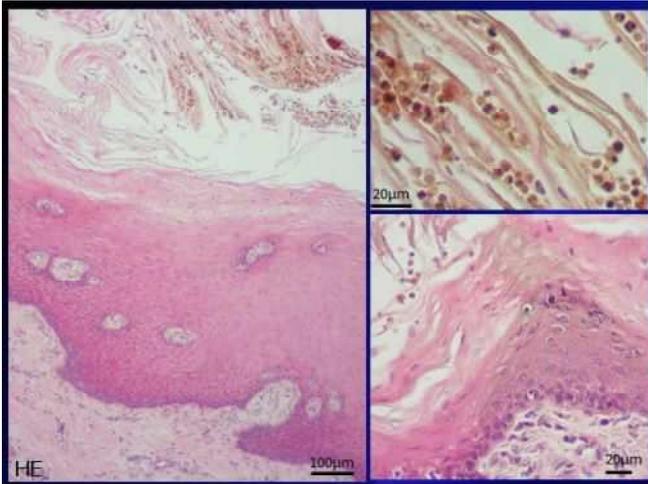


図4：舌嚢胞の角化重層扁平上皮と真皮乳頭

また、結合組織と舌固有のものと思われる筋肉組織との間に毛包様の構造(F)、皮脂腺様の構造(S)と汗腺様の構造(A)が認められた(図5)。

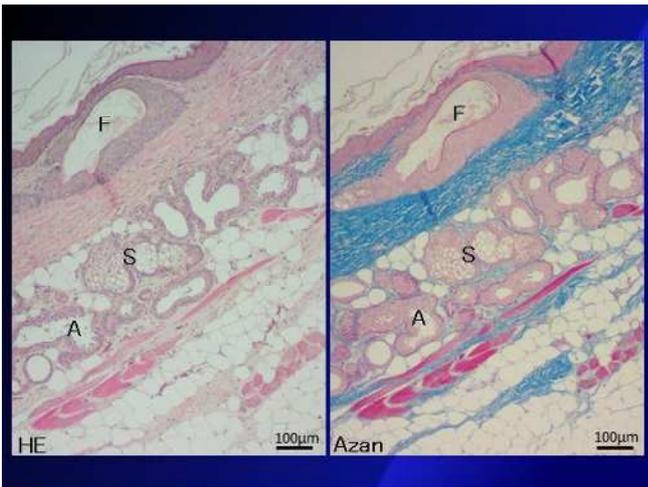


図5：舌嚢胞の毛包・汗腺・皮脂腺様構造

嚢胞内の単層上皮様に配列した汗腺様の組織構造は、発達した筋上皮細胞に取り囲まれ、管腔に面した細胞質の一部が隆起して細胞から切り離される断頭分泌がみられたことから、アポクリン汗腺と思われる。腔内には変性角化物とともに分泌物や好中球

などの炎症細胞が観察された(図6)。

なお、嚢胞周囲の結合組織内には粘液腺組織(M)と軟骨組織(C)が存在していた(図7)。

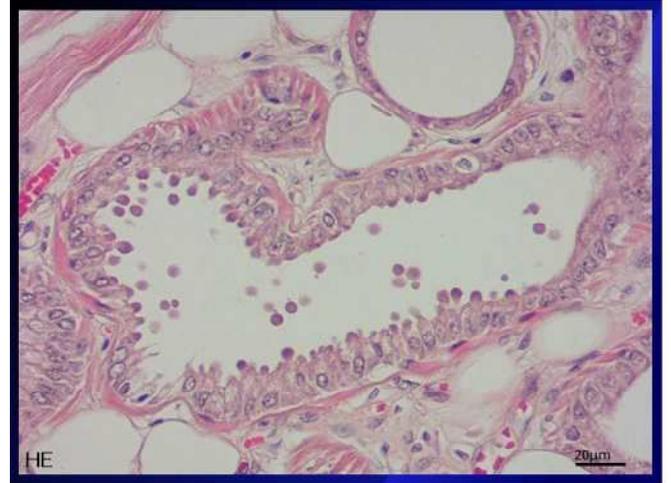


図6：アポクリン汗腺



図7：舌嚢胞の粘液腺組織と軟骨組織

(2) 胸最長筋付近の脂肪組織に、外界とは通じていない、長径1.5cm程度で内腔にワラ様の異物やナイロン様の異物を容れた嚢胞がみられた(図8)。

と畜後の時間経過が長いため組織の保存状態は芳しくないが、嚢胞は角化重層扁平上皮により内張りされていた。嚢胞内及び嚢胞付近の結合組織中に毛包のような構造物がみられたが明確に識別できず、また、皮膚付属器官も確認できなかった(図9)。

肉眼・実体顕微鏡所見



図8：胸最長筋付近脂肪組織内の嚢胞

組織所見

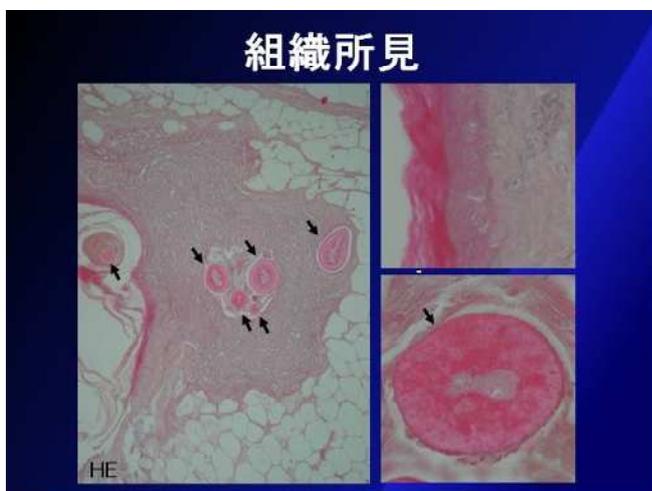


図9：脂肪組織内の嚢胞組織

診断及び考察

表皮様の角化重層扁平上皮によって被覆された嚢胞性の病変は、皮膚付属器官の有無により類皮嚢胞と類表皮嚢胞とに区別される。

症例（1）については、錯角化した重層扁平上皮に裏打ちされた嚢胞を形成し、皮脂腺及び汗腺、毛包等の皮膚付属器官と軟骨組織が確認されたことから、類皮嚢胞と診断した。

症例（2）については角化した重層扁平上皮に裏打ちされた嚢胞を形成し、一部に毛包のような組織もみられたが、組織の保存状態が良好ではなく皮膚付属器官として特定に至らなかったことから、類表皮嚢胞と診断した。

類皮嚢胞及び類表皮嚢胞は、肛門、卵巣、睪丸などに多く発生するが^{1) 2) 5)}、顔面・口腔領域

での発生は少なく^{1) 2) 3) 4)}、また舌に発生したり軟骨を含むものはまれである⁵⁾。また、これらの嚢胞は皮膚付属器官の有無で区別され、胎生期における外胚葉の迷入、もしくは外傷や炎症などによる上皮組織の挿入に由来するとされている^{1) 2) 3) 4)}

症例（1）の類皮嚢胞については、皮脂腺及び汗腺、毛包等の皮膚付属器官や軟骨組織など多彩な組織構造が確認されたこと、また、明らかな外傷性の所見が得られなかったことから胎生期に起こりえる外胚葉の迷入が疑われる。

症例（2）の類表皮嚢胞については、嚢胞内に外界からの異物が認められたことから、生育時点で表皮が外界の異物とともに背部のかなり深部まで外傷性に挿入されたことが原因ではないかと考えられた。（図10）

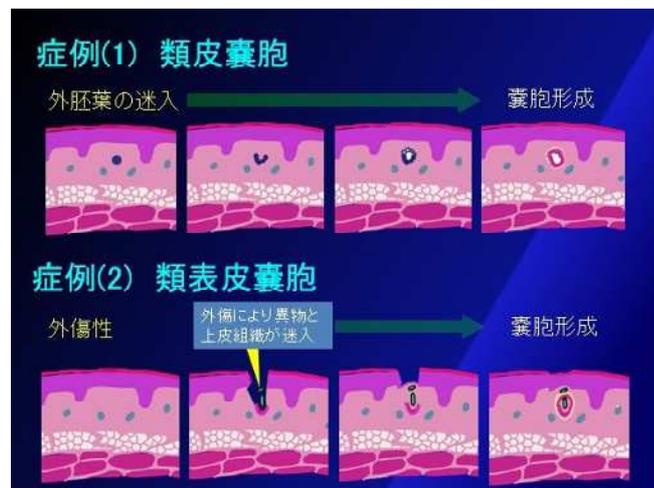


図10：類皮嚢胞と類表皮嚢胞の形成

まとめ

症例（1）については、塗抹標本の観察により類表皮嚢胞もしくは類皮嚢胞を推測できたことから、組織診断に先立ち細胞診を行うことは補助的検査として有用であると思われる。

また、と畜検査で発見が困難で、日頃検査員が目に見えない病変について病理組織学的検査を行い、検査員間で情報共有することは、病理学的知識の向上はもとより、現場検査での病変観察の技術の向上にもつながるものと考えられた。

参考文献

- 1) 口唇部・頬部に発生した類表皮嚢胞の臨床統計的検討 Niigata Dent. J43(1):57-64, 2013
- 2) 類皮嚢胞の2例 日本口腔外科学会雑誌:1244-1249, Oct. 1980
- 3) 類皮・類表皮嚢胞15例の臨床的観察 日本口腔外科学会雑誌:47-53, Jan. 1986
- 4) 口底に生じた巨大な奇形腫様嚢胞の1例 日本口腔外科学会雑誌:280-283, May. 2002
- 5) 舌に発生した軟骨を伴う類皮嚢胞の1例 日本口腔外科学会雑誌:270-273, May. 2018

鹿児島県内のと畜場で認められた牛、豚におけるリンパ腫の組織学的分類

猪俣有美^{1) 2)} 是枝七奈²⁾ 濱田順子²⁾ 岩元幸江²⁾ 牧田万悠子²⁾ 丸山覚詞²⁾

楠原莉菜²⁾ 宮島洋行²⁾ 吉田清保²⁾ 外園千代¹⁾ 西園幹雄¹⁾

1) 串木野食肉衛生検査所, 2) 令和3年度鹿児島県病理部会

はじめに

食肉検査において、リンパ腫は牛、豚ともに現場で遭遇する確率の高い腫瘍の一つである。特に、牛においては、牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)感染によって引き起こされる地方病性の牛伝染性リンパ腫(EBL)は県内でも多く認められ、年間における牛の廃棄疾病の5割を占めている。牛伝染性リンパ腫は、牛の年齢、腫瘍の形成部位、BLVの感染の有無に基づき地方病性と散発性(胸腺型・皮膚型・子牛型)に分けられる[1][4]。一方、ヒトのリンパ腫においては、治療方針の決定や予後推測等の観点から組織学的分類(WHO分類)を行っている。また、2002年にWHOから動物の悪性リンパ腫の新たな分類体型である新WHO分類(WHO分類第2版)が提唱されたことから、犬猫においては既に新WHO分類に沿った診断が試みられている[2]。そこで今回、県内8食肉衛生検査所で認められた牛豚のリンパ腫について、その発生部位、組織所見、免疫組織学的染色結果から、新WHO分類に基づく組織診断を行ったので、その概要を報告する。

材料及び方法

県内8食肉衛生検査所において、令和3年6月～9月にリンパ腫と診断された牛23症例、豚4症例を材料とした。牛23症例は月齢23～117ヵ月齢で、そのうちF1(交雑種)が1例、ホルスタインが5例、残り17例は黒毛和種であり、20例が雌で残り3例は去勢であった。豚は4例全てが月齢6ヵ月齢のF1で、雌2例、雄2例であった(表1)。

表1 症例の概要

牛 23頭

品種：黒毛和種 17頭, ホルスタイン 5頭, F1 1頭
月齢：23～117ヵ月齢
性別：雌 20頭, 去勢雄 3頭

豚 4頭

品種：F1 4頭
月齢：6ヵ月齢
性別：雌 2頭, 去勢雄 2頭

腫瘍細胞の浸潤が疑われた臓器を採材し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で3～5日間固定後、常法によりパラフィンブロックを作製、3μmに薄切後HE染色、免疫染色を行った。免疫染色には、一次抗体としてCD3、CD5、CD20、BLA36を用いた(表2)。

また、牛についてはPCR検査によりBLV抗原由来遺

伝子の確認を行った。

表2 免疫染色に用いた抗体

抗体	クローン	希釈倍率	前処理	メーカー(型番)	標的
CD3	polyclonal	ready to use (×1)	クエン酸AC (pH6.0,121°C10min)	Dako(IR503)	T細胞
CD5	polyclonal	×200	クエン酸AC (pH6.0,121°C10min)	Invitrogen (PA5-80437)	B-1細胞, 胸腺細胞, 成熟T細胞
CD20	polyclonal	×200	クエン酸AC (pH6.0,121°C10min)	Invitrogen (PA5-16701)	B細胞
BLA36	A27-42	×25	クエン酸AC (pH6.0,121°C10min)	BioGenex (MU231-UC)	B細胞

成績

今回検索した牛のリンパ腫では、全ての症例においてPCR検査によりBLV抗原由来遺伝子が確認された。肉眼的には、牛23例中20例で躯幹リンパ節の腫大が認められた(図1)。



図1 躯幹リンパ節の異常

また、20例で心臓に病変が認められ（図2）、その他、腸間膜リンパ節、縦隔リンパ節、肝門部リンパ節等の腫大、消化管、膀胱、子宮等の粘膜肥厚、脾臓、肝臓の腫大等、肉眼的には多中心型リンパ腫様を呈したが（図3）、1例のみ胸腺の腫大が認められた（図4）。

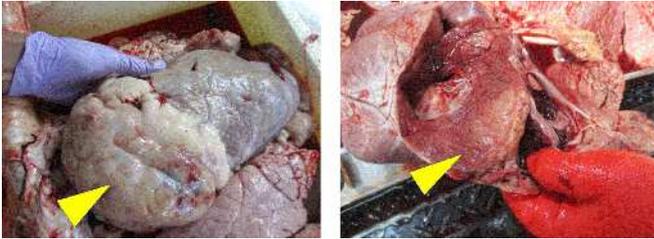
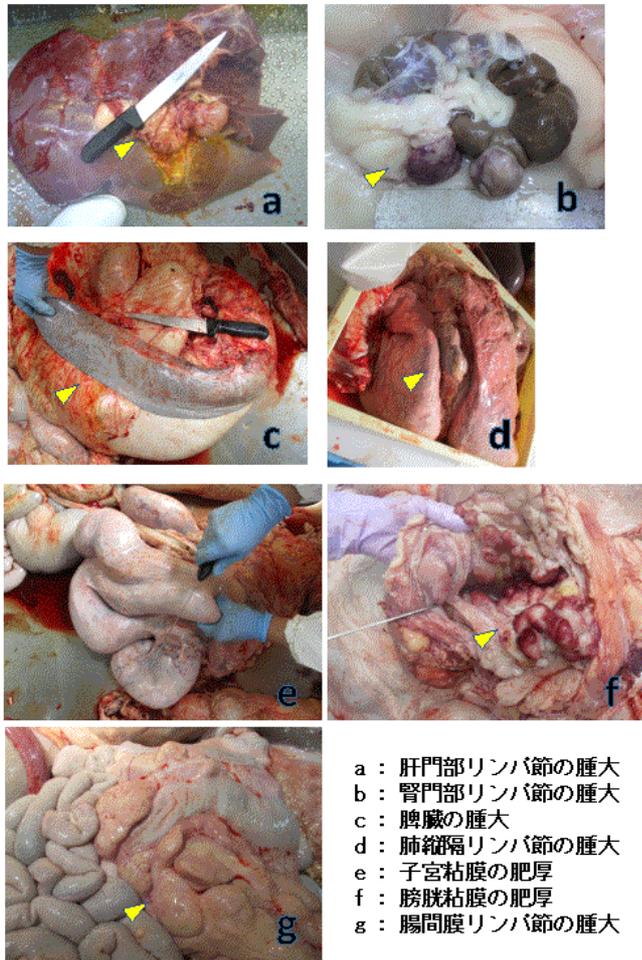


図2 心臓の異常



- a : 肝門部リンパ節の腫大
- b : 腎門部リンパ節の腫大
- c : 脾臓の腫大
- d : 肺縦隔リンパ節の腫大
- e : 子宮粘膜の肥厚
- f : 膀胱粘膜の肥厚
- g : 腸間膜リンパ節の腫大

図3 その他臓器の異常

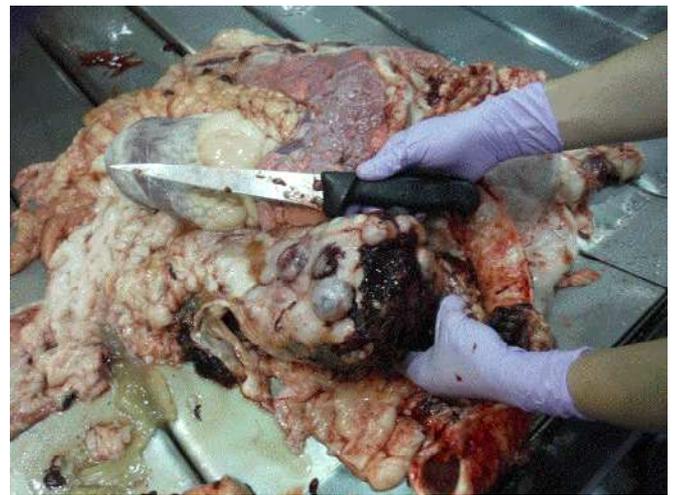
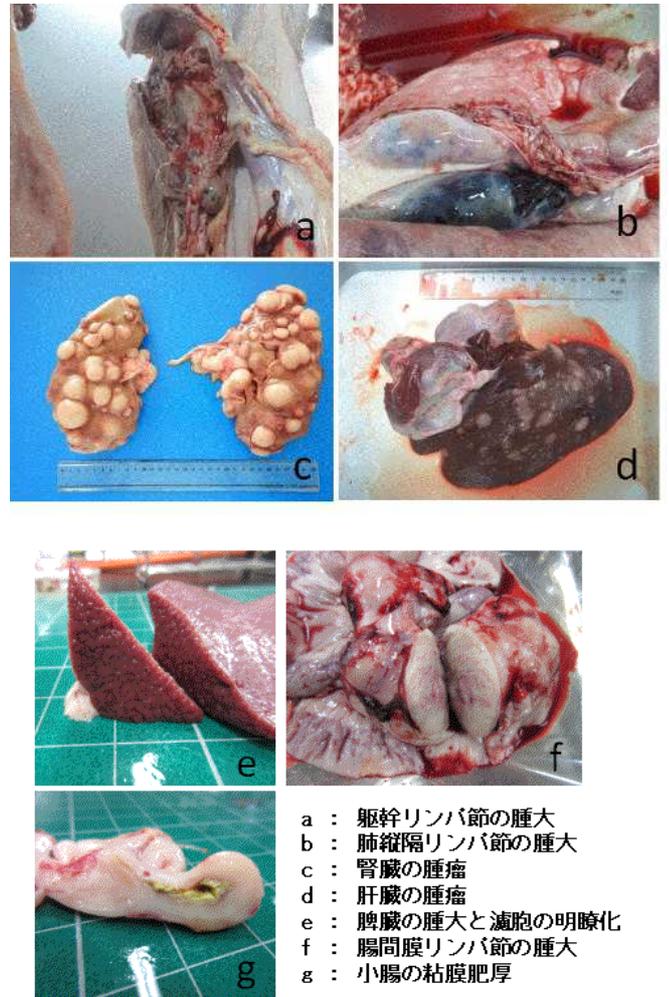


図4 胸腺の腫大

豚も同様に肉眼的には多中心型リンパ腫様を呈した（図5）。



- a : 躯幹リンパ節の腫大
- b : 肺縦隔リンパ節の腫大
- c : 腎臓の腫大
- d : 肝臓の腫大
- e : 脾臓の腫大と濾胞の明瞭化
- f : 腸間膜リンパ節の腫大
- g : 小腸の粘膜肥厚

図5 豚の臓器所見

組織学的には、牛22例において大型で多型性を示すリンパ球がびまん性に増殖していた。このリンパ球は明瞭な核小体を有し、有糸分裂像も散見された。免疫染色では22例中16例で腫瘍性リンパ球はCD 5、CD20、およびBLA36に陽性を示し、CD 3に陰性を示した事からB細胞由来と考えられ、組織学的にびまん性大細胞性Bリンパ腫と診断された（図 6， 7）。

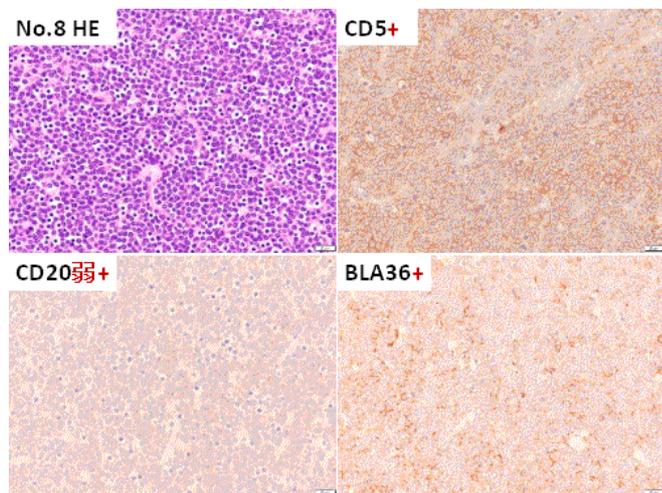


図 6 牛の組織像（症例No. 8）

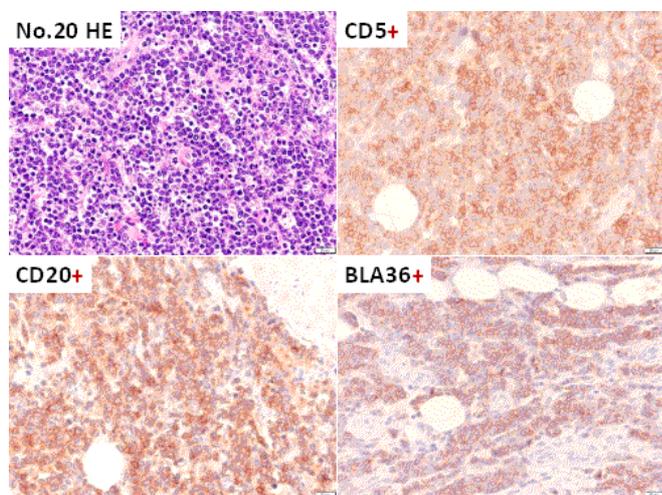


図 7 牛の組織像（症例No. 20）

胸腺の腫大が認められた牛の 1 症例においては、小～中型のリンパ球がびまん性に増殖し、免疫染色においてCD 3 とCD 5に陽性を示し、CD20、BLA36に陰性を示した事からT細胞由来と考えられ、組織学的にT/NK細胞性リンパ腫/白血病に分類された（図 8）。

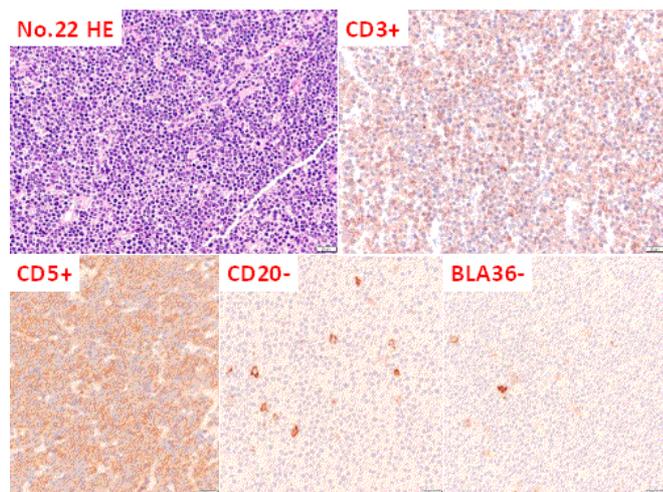


図 8 牛の組織像（症例No. 22）

豚の 4 症例については大型のリンパ球がびまん性に増殖していたが、免疫染色では染色性が様々で、CD 5、CD20に陽性を示すB細胞性（図 9）、CD 5、CD20、BLA36に陽性を示すB細胞性、CD 3にのみ陽性を示すT細胞性、今回検索した抗体では陽性反応が認められないものと多様な結果が得られた（表 3）。

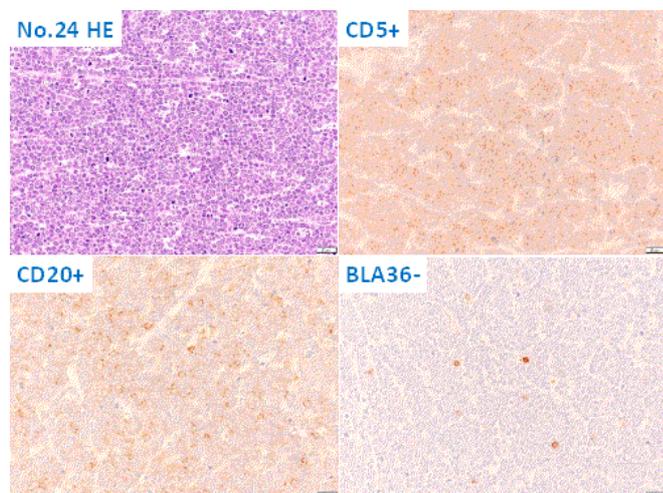


図 9 豚の組織像（症例No. 24）

表3 免疫染色結果

No.	畜種	BLV	分類	サイズ	CD3	CD5	CD20	BLA36		
1	牛	+	B	大型	-	+	弱+	辺縁+		
2					-	+	辺縁+	弱+		
3					-	+	辺縁+	+		
4					-	+	+	+		
5					-	+	+	+		
6					-	+	+	+		
7					NT	弱+	辺縁+	+		
8					NT	+	辺縁+	+		
9					NT	+	弱+	弱+		
10					NT	+	弱+	+		
11					NT	+	辺縁+	弱+		
12					NT	+	辺縁+	+		
13					-	弱+	弱+	+		
14					NT	+	+	+		
15					NT	NT	NT	NT		
16					NT	NT	NT	NT		
17					B	+	弱+	+		
18					NT	NT	NT	NT		
19					NT	NT	NT	NT		
20					NT	+	+	+		
21					NT	NT	NT	NT		
22					T	小~中型	+	+	-	-
23					NT	NT	NT	NT		
24	豚	+	B	大型	-	+	弱+	-		
25					-	-	-	-		
26					T	+	-	-	-	
27					B	-	+	+	+	

考察

地方病性の牛伝染性リンパ腫（EBL）は、B細胞由来の腫瘍であり、腫瘍性リンパ球は、CD5抗体に陽性を示すB-1細胞が腫瘍化したものと考えられている〔3〕。今回材料とした牛23例は、全例で全身性腫瘍が認められ、PCR検査でBLV抗原遺伝子が確認された。免疫染色では実施した17例中16例がB細胞のマーカーであるCD20、BLA36に陽性を示し、T細胞のマーカーであるCD3に陰性、またT細胞とB-1細胞のマーカーであるCD5に陽性であった。このことにより、これらの症例はBLV感染により腫瘍化するB-1細胞由来の腫瘍であると考えられた。同16例は組織学的に大型で多形を示す腫瘍性リンパ球がびまん性に増殖するという同様の所見を呈し、動物の腫瘍の新WHO分類におけるびまん性大細胞型Bリンパ腫（DLBCL）と診断した。牛ではBLVに起因するリンパ腫を多形型B細胞性リンパ腫と診断する場合があるが〔1〕〔4〕、今回は新WHO分類に準じてDLBCLと診断した（表4）。

表4 WHO腫瘍分類：B細胞性リンパ腫

前駆B細胞性腫瘍	形質細胞性腫瘍
B細胞性リンパ芽球性白血病/リンパ腫	低悪性形質細胞腫
成熟B細胞性腫瘍	退形成(悪性)形質細胞腫
B細胞性慢性リンパ球性白血病/リンパ腫	形質細胞性骨髄腫
B細胞性リンパ球性リンパ腫中間型	大型B細胞性リンパ腫
濾胞型リンパ腫	T cell rich Bリンパ腫
マントル細胞リンパ腫	大細胞性免疫芽球性リンパ腫
濾胞中心細胞性リンパ腫 I	びまん性大型B細胞性リンパ腫
濾胞中心細胞性リンパ腫 II	胸腺Bリンパ腫(縦隔Bリンパ腫)
濾胞中心細胞性リンパ腫 III	血管内大細胞Bリンパ腫
(リンパ)節性辺縁帯リンパ腫	パーキット型リンパ腫
脾臓辺縁帯リンパ腫	パーキット型グレードBリンパ腫
(リンパ)節外MALT随伴辺縁帯リンパ腫	
有毛細胞白血病	

胸腺に腫瘍が認められた1例は、HE染色で小~中型の腫瘍性リンパ球の増殖を認め、組織像は、今回診断したDLBCLと異なっており、T細胞マーカーであるCD3とT細胞とB-1細胞のマーカーであるCD5に陽性を示し、B細胞のマーカーであるCD20とBLA36に陰性を示したことから、T細胞性のT/NK細胞性リンパ腫/白血病と診断した（表5）。

表5 WHO腫瘍分類：**T/NK細胞性リンパ腫**

前駆T細胞性腫瘍	成熟T細胞/NK細胞性腫瘍
T細胞性リンパ芽球性白血病/リンパ腫	節外/末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)
成熟T細胞/NK細胞性腫瘍	大顆粒リンパ増殖性疾患(LGL)
T細胞性慢性リンパ球性白血病	PTCL, 混合リンパ球型
T細胞性LGLリンパ腫/白血病	PTCL, 混合炎症型
NK細胞性慢性リンパ球性白血病	成人型T細胞様リンパ腫/白血病
皮膚T細胞性腫瘍	血管免疫芽球性リンパ腫(AILD)
皮膚上皮向性リンパ腫(CEL)	血管向性リンパ腫
CEL, 菌状肉腫型	血管中心性リンパ腫(LG)
CEL, パジエット型細網症型	血管浸潤性リンパ腫
皮膚非上皮向性リンパ腫	消化管T細胞リンパ腫
	退形成大細胞リンパ腫(ALCL)

この症例は、PCRでBLV抗原遺伝子が確認されているが、組織像及び免疫染色の結果により、全身性の腫瘍はBLVに関係なく発生したものと推察された。

BLVが蔓延している地域において、全身性腫瘍が認められた牛のリンパ腫は、BLV抗原遺伝子の有無によってEBLと診断されがちである。しかしながら、今回認められた症例のように明らかにEBLではない症例も少なからず混在している。EBLの診断には患者畜からBLV抗原遺伝子が検出され、かつ腫瘍細胞がB細胞由来であることが必要となる。また、CD5に対してはB-1細胞と同時に、T細胞も陽性を示すことから、牛のリンパ腫がBLVに起因するかどうかの判別には、CD5に陽性を示すだけでなく、CD20やBLA36等のB細胞性マーカーに陽性で、かつT細胞マ

一カーであるCD3に陰性を示すことが必要である。
また、今回T/NK細胞性リンパ腫/白血病と診断した症例では、EBLではあまり認められない胸腺にも腫瘍が形成されており、組織像や細胞形態も明らかにDLBCLとは異なる事から、典型的なEBL所見を示さない症例は精査が必要である。

豚においては、今回は2例がB細胞性腫瘍、1例がT細胞性腫瘍、1例が判定不能との結果が得られた。B細胞性腫瘍の2例において、免疫染色結果が異なることから、BLVに起因することが多い牛とは異なり、発生原因が特定できないため、さらなる精査が必要である。また、検査症例が少ないことから、今後、検査数を増やして、データを蓄積することにより、ヒトや犬猫と同等の分類ができるのではないかと考えられる。

参考文献

〔1〕 門田耕一，石川義春：牛B細胞性腫瘍の組織学的分類，動衛研研究報告 第123号，11-22（平成23年3月）

〔2〕 坂井祐介，上塚浩司，中山裕之：新WHO分類による犬・猫の悪性リンパ腫の組織学的診断，日獣会誌 61 543～548（2008）

〔3〕 荒木美穂：牛白血病診断事例の発生状況と免疫組織化学染色による考察

〔4〕 萩原昌代，斉藤守弘，石川義春，門田耕一：牛白血病ウイルス感染牛におけるリンパ系腫瘍の組織学的検討，日獣会誌 67 199～203（2014）

運動培地を用いた豚サルモネラ症検査法簡略化の検討

安樂雄太 北原尚英 栗脇耕二

鹿屋食肉衛生検査所

はじめに

サルモネラ症の原因菌である *Salmonella enterica* には複数の血清型があり、*S. Choleraesuis* (SC), *S. Typhimurium* (ST), *S. Dublin* (SD), *S. Enteritidis* (SE) の4血清型が届出伝染病に指定されている。これらはと畜場法に基づき全廃棄の対象となるため、サルモネラ症を疑う場合、血清型同定が重要となる。豚ではSC及びSTの検出が多く、豚サルモネラ症として廃棄となる。サルモネラ症の血清型同定法にMohitが考案したDisk immuno-immobilization Method [1] (以下DII法)がある。これは、サルモネラ免疫血清を添加した濾紙ディスクとサルモネラ菌を置いて培養すると、菌は遊走・発育して培地上に広がるが、菌の血清型に対応したディスク周囲のみ遊走が阻害され、半円弧状又は流線型のImmuno-immobilizationという特異的な線(以下II線)が形成されることを利用し、II線の有無で血清型別を行う方法である。また、藤原らはDII法を応用し、ラパポート培地等市販の培地材料や血清を用いて同様の試験を行い、DII法を利用した相誘導法を考案した[2]。当所における豚サルモネラ症の検査法の現行SOP(以下現行法)では、採材した日を0日目とすると、増菌・分離・純培養を行い、3日目にO群別試験、4日目に1度目のH型別試験を判定するため、血清型別による合否判定ができるのが少なくとも4日目となる。また、逆相のH型別試験を判定できるのは更に相誘導・培養を行った後であるため最短で6日目となる。そのため判定まで時間を要し、作業も煩雑となる。そこで本試験では、藤原らの研究を参考に、サルモネラ菌の分離及び血清型別試験の簡略化を試み、と畜検査における有用性及び保留検体に対する行政措置までの期間を短縮できるか検討を行った。

材料と方法

検体はSC, ST, SD, SEの標準菌株(順にL-97, L-72, L-775, L-47株)、管内と畜場から分離されたSCの保存菌株3株、SCが分離された豚の肝臓3検体を使用した。培地は藤原らのDII法用の運動培地を参考にラパポート培地(栄研)0.175%, 寒天(BD)0.35%, カザミノ酸(Gibco)0.1%, 塩化ナトリウム0.36%の組成で作製した平板の運動培地を用いた。血清は市販のサルモネラ免疫血清(O4, O7, O9, H-1, H-2, H-5, H-c, H-G, H-i, H-m, H-p)(生研)及び相誘導用免疫血清(H-1, H-i)(生研)を使用した。

試験1 発育試験・血清型別試験

サルモネラ菌を培地中央に一白金耳接種し、培地中心の周囲2cmの位置に免疫血清を添加した濾紙デ

ィスクを概ね等間隔に置いて37℃18時間培養し、菌の発育試験とDII法による血清型別試験を行った。

試験2 同時検出試験

菌株の代わりに肝臓3検体を用いて試験1と同様に培養し、増菌を行わずに菌と血清型の同時検出が可能か試験を行った。

試験3 相誘導試験

現行の相誘導法にDII法を組み合わせ、濾紙の中心に穴を開け培地中央に置き、相誘導用血清を濾紙に浸透させた後、穴の部分にサルモネラ菌を接種して試験1と同様に免疫血清添加濾紙ディスクを置いて37℃24時間培養し、逆相H型別試験に要する期間の短縮が可能か試験を行った。

結果

試験 1 発育試験・血清型別試験

サルモネラ菌の標準菌株、保存菌株全てで遊走する菌の発育が認められ、SCがO 7, H-1, H-5, STがO 7, H-i, SDがO 9, H-G, H-p, SEがO 9, H-G, H-mのディスク周囲でII線を形成した(図1)。また、SCでは、H-c, STではH-1, H-2にII線は形成されなかった。

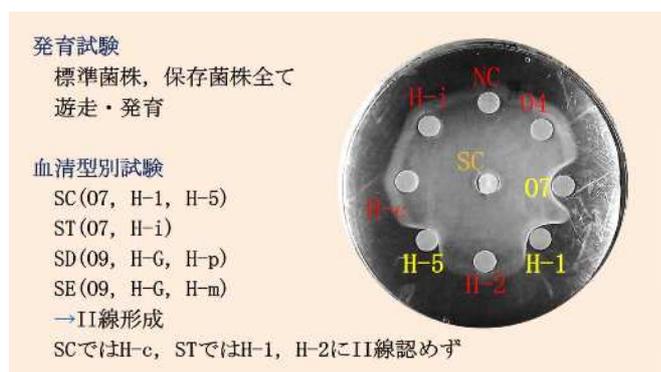


図1 発育・血清型別試験結果

試験 2 同時検出試験

3検体中2検体で菌の発育が認められ、試験1でSC菌株が反応した血清と同じO 7, H-1, H-5でII線が形成された(図2)。

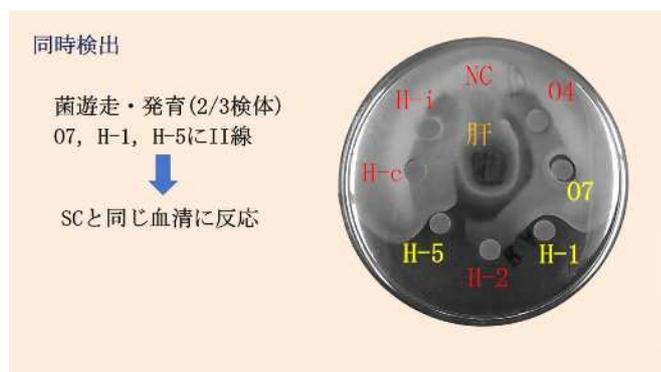


図2 同時検出試験結果

試験 3 相誘導試験

STは1回目のH型別でH-iにII線が形成されたため、相誘導用H-i血清を使用し試験を行い、H-1及びH-2でII線が形成されH-iの逆相が誘導されたことを確認した(図3)。

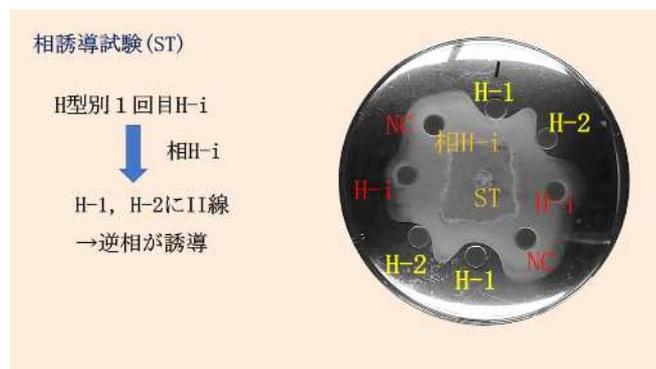


図3 相誘導試験(ST)

SCは1回目のH型別でH-1, H-5にII線が形成されたため、相誘導用H-1血清を使用し試験を行ったが、H-1, H-5でII線が形成され、逆相であるH-cを発現する菌の誘導は認められなかった(図4)。

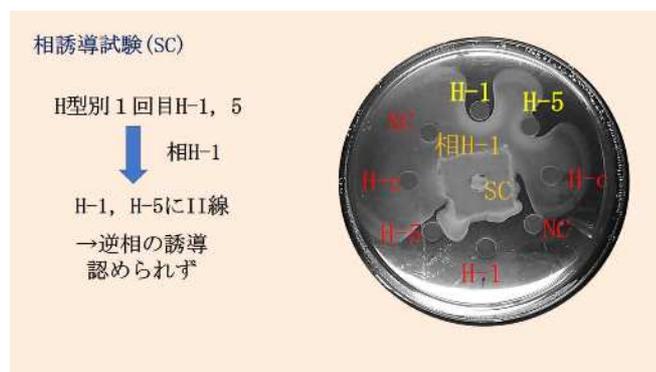


図4 相誘導試験(SC)

考察

試験1の結果から、今回作製した培地でサルモネラ菌の発育・遊走及びII線の形成が認められたため、純培養、O群別及びH型別試験を同時に可能であると考えられた。そのため、現行法での純培養から1度目のH型別試験までの工程に本試験を適用することで、現行法では3日間かかるこの検査を2日間に短縮することができることから試験の簡略化及び、保留検体の合否判定にかかる時間を短縮できると考えられた。

試験2では2検体で菌分離とO・Hの型別決定ができたが、増菌培養の必要性や菌の分離率については症例数が少なく検討が不十分と考えられた。また、試験3では、STについて、本培地を用いて相誘導を行うことが可能であると考えられたが、と

畜検査で分離頻度の高いSCでは相誘導試験が成立しなかったことにより、本培地での相誘導試験の有用性については確認できなかった。そのため、肝臓検体からの菌分離や本培地を用いた確実な相誘導法を今後検討することで改良につながれると考えられた。

今後は、合否判定までの更なる迅速化と精度の向上を図るため、試験2より肝臓を用いた菌分離を検討することで増菌から1度目のH型別試験まで同時に行い、更に試験3より、本培地を用いた確実な相誘導法を検討することで、相誘導と逆相のH型別試験を同時に行い、現行法で最短6日目まで

掛かる全ての検査を2日目には完了できる手法を検討したい。

参考文献

[1] Behzad Mohit: Disc immuno-immobilization Method for Simultaneous Typing and Isolation of *Salmonella* Flagellar Phases, Journal of Bacteriology, 96, 160-164 (1968)

[2] 藤原 正俊 田淵 博之 上垣 華穂 玉村 雪乃: サルモネラの選択分離とH抗原決定法の検討, 北獣会誌, 62, 108-112 (2018)

保存菌株の16S rDNA解析を活用した菌種同定の試み

神田卓弥, 平島宜昌*, 赤坂敬史郎, 宇都誠二

阿久根食肉衛生検査所 *肉用牛改良研究所

はじめに

食肉衛生検査所では、とちく・食鳥検査・衛生指導において細菌検査を実施しており、様々な種類の細菌が分離される。これらの野外株は公衆衛生上重要であり、野外株の正確な同定、菌株情報の管理が重要であると思われる。とちく検査においては、敗血症から分離される主要な細菌として *Streptococcus suis* (*S. suis*) があるが、近年、血清型の一部が *S. parasuis* や *S. ruminantium* に再分類された。しかしながら、生化学性状検査 (Api) では、*S. suis* と同定されるため、と畜場における浸潤状況は明らかになっていない。また、分離株において、Api による同定が困難な事例も存在する。そこで、敗血症由来の Api で同定不能、*S. suis* と判定された菌株について、16S rDNA シークエンスを用いた菌種の同定を試みた。さらに、これまでは紙媒体を用いて菌株を管理をしており、データの保存・検索に手間がかかるため、台帳の電子化を併せて検討した。

材料と方法

(1) 16S rDNA シークエンス

所管施設において、平成 23 年 9 月から令和 4 年 12 月の期間で、敗血症の牛および豚から分離され、保存されていた菌株を用いた。内訳として、Api による判定が同定不能 12 株、*S. suis* 93 株の計 105 株であった (表 1)。これら 105 株の DNA から 16S rDNA 領域を PCR を用いて増幅した [1, 2]。その後アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、ゲルの切り出し精製を行った。シークエンスは、4 つのシークエンスプライマーを用い [1, 2, 3, 4]、サイクルシークエンシング〜キャピラリー泳動の行程は FASMAC 社に外注した。波形データの納品後、MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>) により塩基配列のアライメントを行い、16S rDNA の全長の配列を決定した。

決定した 16S rDNA の配列は、Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による相同性検索を実施し、Type strain と相同性が 98.7% 以上の菌種が 1 種のみの場合、同種と判定した。

表 1 供試菌内訳

Api の同定結果	株数
1) 同定不能	12
2) <i>Streptococcus suis</i>	93

(2) 菌株台帳

これまでに当検査所で管理している紙媒体の菌株台帳をエクセルを用いて電子化を試みた。加えて 16S rDNA シークエンスによる同定結果も追記できるようにした。

結果

(1) 16S rDNA シークエンス

1) 同定不能

Api により同定不能であった 12 株のうち、16S rDNA シークエンスに基づいた同定の結果は、3 株は、腸内細菌科と判定されたが属は不明であった。残りの 9 株は、3 株が属レベル (*Bacillus*, *Schaalia* (*Actinomyces*), 6 株が種レベル (*Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* spp., *Trueperella pyogenes*, *Pasteurella multocida*) と判定された (表 2)。

表 2 同定不能菌における同定結果

同定結果	株数
<i>Bacillus</i> spp.	2
<i>Schaalia</i> (<i>Actinomyces</i>) ssp.	1
<i>Streptococcus suis</i>	2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> spp.	2
<i>Trueperella pyogenes</i>	1
<i>Pasteurella multocida</i>	1

2) *Streptococcus suis*

Api により *S. suis* と同定された 93 株は、16S rDNA シークエンスに基づいた同定により、91 株が *S. suis*、1 株が *S. ruminantium*、1 株が *Streptococcus* spp と同定された(表 3)。

表 3 *S. suis* における同定結果

同定結果	株数
<i>Streptococcus suis</i>	91
<i>Streptococcus ruminantium</i>	1
<i>Streptococcus</i> spp.	1

(2) 菌株台帳

エクセルによる管理を行うことで、フィルター機能による検索が可能となった。

考 察

16S rDNA シークエンスにより Api で同定出来なかった細菌の 9/12 を属レベルまで同定できた。しかしながら、*S. suis*、*S. dysgalactiae*、*T. pyogenes* といった Api で同定可能な菌種が含まれていたため、適切な細菌検査の手順・Api の選択を行うことが同定精度の向上につながると思われた。科レベルまでしか判定できなかった菌株では、塩基配列データを保存しておくことで、今後、同様の菌が分離された際に、より詳細な解析が可能になるため、菌株保存を継続して行くことが重要であると思われた。

Api で *S. suis* と同定された 93 株においては、すべてが *Streptococcus* であり、信頼性の高い同定方法であると思われた。*S. ruminantium* は牛の心内膜炎等で分離され、2017 年に新菌種として再分類された菌であるが、Api による生化学的性状に基づく分類では *S. suis* として判定されるため、現場での判別が困難である。今回の解析により、所管施設においても *S. ruminantium* の関与した牛の疣贅性心内膜炎の発生があったことが確認された。*S. suis* と *S. parasuis* は 16S rDNA 領域において非常に近縁であり、他の遺伝子領域を対象にした PCR により *S. suis*、*S. parasuis*、*S. ruminantium* の同定 PCR も開発されていることから[5, 6, 7]、これらの手法を

用いることで正確な同定につながるものと思われた。

台帳を電子化したことで保存してある菌株が膨大になっても該当の菌種をすぐに検索することが可能となった。菌株は公衆衛生において重要なデータを含んでいることから、菌株の正確な同定、適切なデータ管理につながり、保存菌株の有効活用につながると思われた。県下で保存菌株の台帳は様々であり、保存菌株の有効活用につなげるため、今後も保存菌株における管理法の検討をしていきたい。

参 考 文 献

- [1] Suzuki MT et al (1996). Appl Environ Microbiol.62(2):625-630.
- [2] Loy A et al (2002). Appl Environ Microbiol. 68(10):5064-5081.
- [3] Weisburg WG et al (1991). J Bacteriol. 173(2):697-703.
- [4] Lane DJ et al (1985). Proc Natl Acad Sci USA. 82(20):6955-6959.
- [5] Ishida S et al (2014). J Microbiol Methods, 107, 66-70.
- [6] Yamada R et al(2018). J Vet Med Sci, 80, 1101-1107.
- [7] Okura M et al (2019). Vet Res, 50, 94.