

## 原著論文

*Salmonella enterica* 血清型 O4:i:- による豚サルモネラ症と分離株の分子疫学的解析

藤井誠一、増子朋美、一條 満（北海道胆振家畜保健衛生所）

Fujii, S., Masuko, T. and Ichijo, M. (2013). Field cases of *Salmonella enterica* serotype O4:i:- infection in pigs and molecular epidemiological analysis of the isolates.*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 62, 27-32.

キーワード：*Salmonella enterica* 血清型 O4:i:-、*Salmonella enterica* 血清型 Typhimurium、PFGE、MLVA、分子疫学的解析

## 要約

*Salmonella enterica* 血清型 O4:i:- (O4:i:-) は、届出伝染病の対象である *S. enterica* 血清型 Typhimurium (*S. Typhimurium*) の H 抗原第 2 相が欠失した単相変異株であると報告されている。

2012 年、消瘦を伴う腸炎を呈した管内の肥育豚から O4:i:- が分離され、サルモネラ症の特徴的な病理組織学的所見が肝臓及び腸管において認められた。また、分子疫学的解析の結果、分離した O4:i:- は過去に管内で分離した豚由来の *S. Typhimurium* と高い相同性を示した。

これらのことから、O4:i:- は届出伝染病の対象ではないものの、軽視することなく、警戒を強めるべきサルモネラであると考えられた。

## はじめに

豚サルモネラ症は、消瘦を伴う腸炎や敗血症による死亡など、主に離乳後の肥育豚において発育や成長を低下させる重大な疾病であり<sup>12)</sup>、公衆衛生上も重要な位置付けにある<sup>7)</sup>。我が国においては、届出伝染病の対象である *S. Typhimurium* と *S. enterica* 血清型 Choleraesuis による発生が多く、これらの血清型以外では、近年、O4:i:- が国内外の家畜及び人において多数分離されており<sup>13,16)</sup>、北海道内の家畜からも多数分離されている<sup>8,11)</sup>。O4:i:- は Kauffmann-White の抗原構造表には記載されていないが、*S. Typhimurium* の H 抗原第 2 相が欠失した単相変異株であると報告されている<sup>4)</sup>。

2012 年に、消瘦を伴う腸炎を呈した管内養豚場 4 戸の肥育豚から、O4:i:- (A、B 及び C 養豚場由来) 及び *S. Typhimurium* (D 養豚場由来) を分離した。病理組

織学的検査では、いずれもサルモネラ症に特徴的な病変が認められた。

これらの分離株及び過去に管内で分離された豚由来 *S. Typhimurium* 株について分子疫学的解析を行ったところ、株間に高い相同性が確認された。本研究ではこれらの成績について報告する。

## 材料

2012 年 6～8 月にかけて、管内 4 養豚場 (A、B、C 及び D 養豚場) から消瘦を伴う腸炎の原因究明のために当所へ搬入された 21～81 日齢の肥育豚計 6 頭を病性鑑定に供試した。また、2008 年管内 C 養豚場、2010 年管内 E 養豚場及び 2006 年管内 F 養豚場で分離した豚糞便由来 *S. Typhimurium* 3 株を分子疫学的解析に供試した。

## 方法

## 1. 病理解剖学的検査

供試豚の臨床症状を観察した後に病理解剖学的検査を実施した。

## 2. 細菌学的検査

主要臓器及び腸内容物を用い、血液寒天培地 (37℃、24～48 時間、5 % CO<sub>2</sub> 培養) 及び DHL 寒天培地 (37℃、24～48 時間、好気培養) 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、サルモネラ免疫血清 (デンカ生研、東京) を使用して O 型別及び H 型別試験を実施し、得られた O 抗原と H 抗原から Kauffmann-White の抗原構造表に沿って同定した。なお、H 型別試験において第 2 相が誘導されなかった菌株については、第 2 相－ (マイナス) とした。

## 3. ウイルス学的検査

供試豚の肺門リンパ節乳剤を用いた PCR 法による豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) 遺伝子検査<sup>3)</sup> 及び豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) 遺伝子検査<sup>6)</sup>、

扁桃凍結切片を用いた“京都微研”豚コレラ FA（京都微研、京都）による豚コレラウイルス抗原検査、腸内容物を用いたディップスティック‘栄研’ロタ（栄研化学、東京）によるロタウイルス抗原検査を実施した。

#### 4. 病理組織学的検査

主要臓器を10%中性ホルマリン緩衝液で固定、パラフィン包埋後薄切し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を実施した後に鏡検した。

#### 5. 分子疫学的解析

感染源あるいは感染経路を特定するための手法である分子疫学的解析<sup>5)</sup>を実施し、遺伝子レベルでの病原体の型別を行った。

病性鑑定で分離したA、B及びC養豚場由来のO4:i-各1株、D養豚場由来のS. Typhimurium 1株、2008年管内C養豚場、2010年管内E養豚場及び2006年管内F養豚場の肥育豚から分離したS. Typhimurium 3株の計7株について、株間の分子疫学的解析を実施した。

##### (1) マルチプレックス PCR (m-PCR)

Akiba ら<sup>1)</sup>の方法による m-PCR を実施し、S. Typhimurium 特異遺伝子領域である Typhimurium-specific region (TSR) 1～3の保有状況を確認した。

##### (2) バルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

制限酵素 Xba I による PFGE を実施した<sup>14)</sup>。得られた PFGE プロファイルを基に BioNumerics version 6<sup>®</sup> (Applied Maths NV、Sint-Martens-Latem、ベルギー) による系統樹解析を行った。

##### (3) multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

ゲノム中の反復縦列配列を含む5種類の遺伝子座位 STTR3、STTR5、STTR6、STTR9 及び STTR10 を PCR で増幅し、各座位の繰り返し回数を解析する手法である MLVA を実施した<sup>10)</sup>。得られた MLVA プロ

ファイルを基に、Kurosawa ら<sup>9)</sup>が解析した1979～2009年に北海道で分離された牛由来 S. Typhimurium 544株に供試株を加えた MLVA 系統樹を BioNumerics version 6<sup>®</sup> により作成した。

#### (4) 薬剤感受性試験

一濃度ディスク法により、アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、スルファジメトキシシン (SDMX)、オキシテトラサイクリン (OTC)、カナマイシン (KM)、スルファメソキサゾール・トリメトプリム (ST)、セファゾリン (CEZ)、ナリジク酸 (NA)、ゲンタマイシン (GM)、コリスチン (CL)、エンロフロキサシン (ERFX) の12薬剤について実施した。

#### 6. 養豚場間の疫学調査

生産ピラミッド、飼料会社、食肉処理場、化製場及び管理獣医師等の情報について聞き取り調査を行うとともに、養豚場間の位置関係等の疫学的な関連について調査を行った。

## 結果

### 1. 病理解剖学的検査

外景は、発症豚に共通して消瘦、被毛粗剛及び黄色～褐色下痢便付着が顕著であった。内景は、腸管の菲薄化及び赤色化、腸間膜リンパ節の腫大及び黒色化が認められた。

### 2. 細菌学的検査

A、B及びC養豚場の豚からO4:i-を分離した。A及びC養豚場の豚については、腸内容物の他にも主要臓器からもO4:i-が分離され、敗血症を起こしていたと考えられた(表1)。D養豚場の豚については腸内容物からS. Typhimuriumを分離した。その他、死亡や消瘦に関与したと考えられる有意な細菌は分離されなかった。

表1 病性鑑定成績

| 養豚場名 | 豚No. | 日齢 | 細菌学的検査 (サルモネラ) |   |    |    |    |         |      | 血清型                    | 病理組織学的検査              |                  |
|------|------|----|----------------|---|----|----|----|---------|------|------------------------|-----------------------|------------------|
|      |      |    | 心臓             | 肺 | 肝臓 | 脾臓 | 腎臓 | 腸間膜リンパ節 | 腸内容物 |                        | 肝臓                    | 腸管               |
| A    | 1    | 21 | +              | + | +  | +  | +  | +       | +    | O4:i-                  | 巣状壊死・チフス様結節、静脈内血栓及び菌塊 | NT <sup>1)</sup> |
| B    | 2    | 31 | -              | - | -  | -  | -  | -       | +    | O4:i-                  | チフス様結節                | -                |
|      | 3    | 41 | -              | - | -  | -  | -  | -       | +    | O4:i-                  | チフス様結節                | 回腸～結腸粘膜壊死        |
| C    | 4    | 67 | +              | - | +  | -  | +  | +       | +    | O4:i-                  | 桿菌増生                  | -                |
|      | 5    | 60 | -              | - | +  | -  | -  | +       | -    | O4:i-                  | -                     | 大腸粘膜壊死           |
| D    | 6    | 81 | -              | - | -  | -  | -  | -       | +    | Typhimurium (O4:i:1,2) | -                     | 小腸粘膜壊死           |

1) 死後変化が強く診断できず

### 3. ウイルス学的検査

C及びD養豚場の豚においてPCV 2が陽性であった。PRRSV、豚コレラウイルス及びロタウイルスはいずれも陰性であった。

### 4. 病理組織学的検査

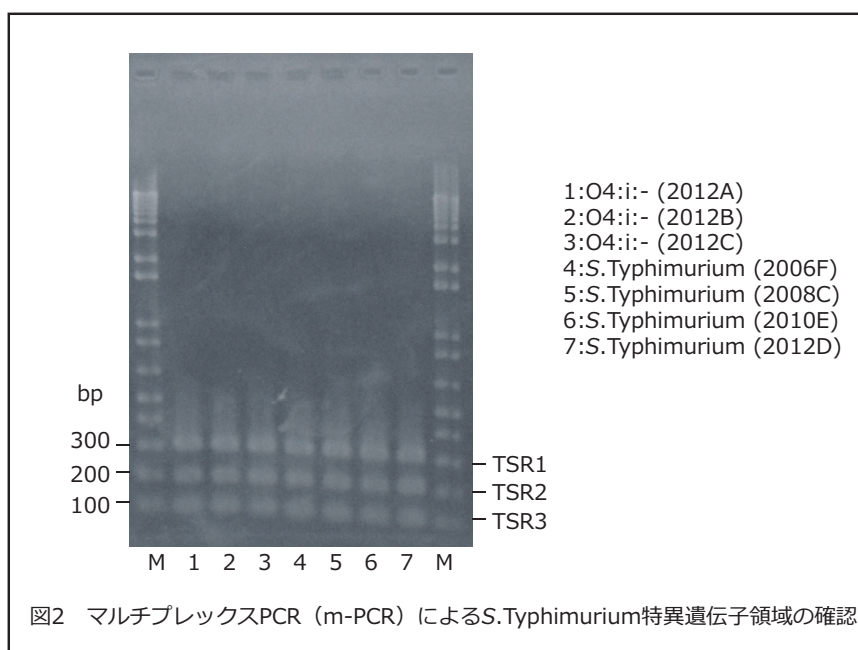
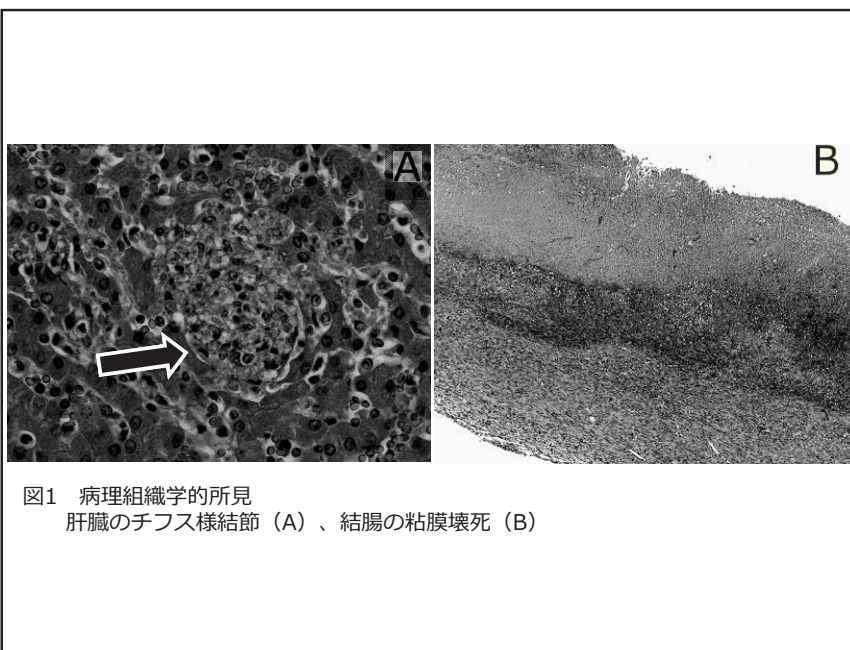
サルモネラ症の特徴的な所見である肝臓の巣状壊死やチフス様結節 (図1 A)、回腸～結腸の腸管粘膜壊死 (図1 B) 等が認められた。なお、C養豚場の2頭は脾臓におけるリンパ球減少及び肺とリンパ節における多核巨細胞の出現が認められ、PCV 2との混合感染と考えられた。

### 5. 分子疫学的解析

m-PCRの結果、すべての株においてTSR 1～3が増幅されたことから、供試したO4:i- 3株が*S. Typhimurium*の単相変異株である可能性が示唆された (図2)。

PFGEによる解析の結果、70%の相同性で2つの型に分類され、タイプIの6株は80%以上の高い相同性を示した (図3)。なお、O4:i- (2012A) と O4:i- (2012 B) は同一のプロファイルが検出された。

MLVAにより得られた、遺伝子座位5ヶ所における繰り返し数 variable number of tandem repeats



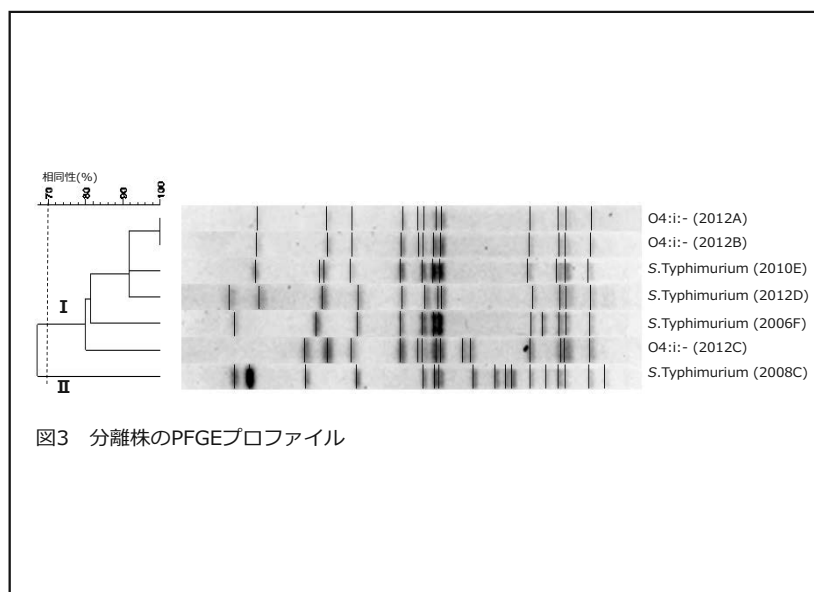


図3 分離株のPFGEプロファイル

(VNTR)を表2に示した。MLVAはPFGEと比較して識別能力が高く、組み合わせて実施することでより有用な解析が可能と考えられている<sup>15)</sup>。VNTRがすべて同一もしくは違いが1ヶ所までであったO4:i:-3株とS.Typhimurium(2010E)は、系統樹上で一つのク

ラスタを形成した(図4)。また、牛由来S.Typhimuriumと同一のVNTRを示すS.Typhimuriumも認められた。

薬剤感受性試験の結果、供試株は4つの耐性パターンに分類された(表3)。O4:i:-(2012A)、O4:i:-(2012

表2 分離株のMLVAプロファイル

| 分離株名                 | 繰り返し数(VNTR) |       |       |       |        |
|----------------------|-------------|-------|-------|-------|--------|
|                      | STTR3       | STTR5 | STTR6 | STTR9 | STTR10 |
| O4:i:-(2012B)        | 11          | 12    | 11    | 4     | 0      |
| O4:i:-(2012A)        | 11          | 12    | 9     | 4     | 0      |
| S.Typhimurium(2010E) | 11          | 12    | 9     | 4     | 0      |
| O4:i:-(2012C)        | 11          | 11    | 9     | 4     | 0      |
| S.Typhimurium(2012D) | 11          | 15    | 10    | 6     | 0      |
| S.Typhimurium(2006F) | 10          | 11    | 16    | 4     | 13     |
| S.Typhimurium(2008C) | 13          | 17    | 12    | 3     | 11     |

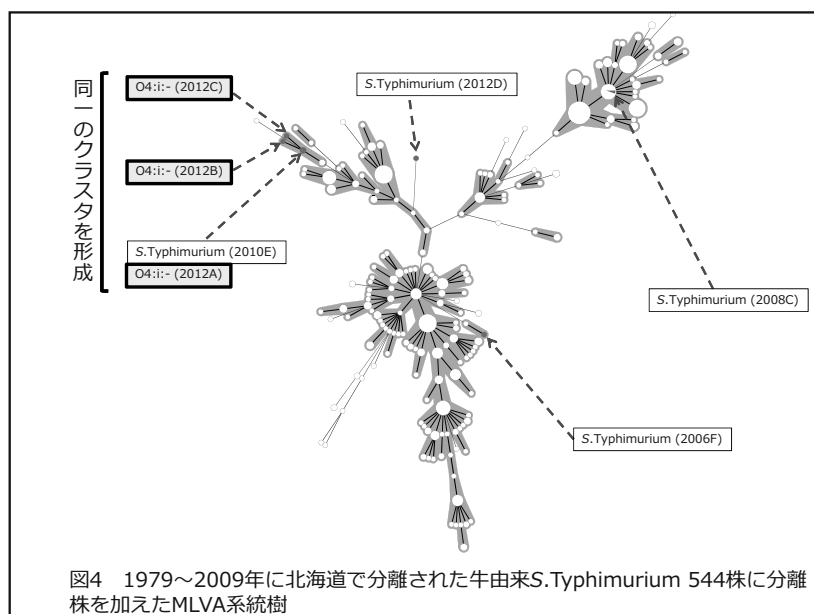


図4 1979～2009年に北海道で分離された牛由来S.Typhimurium 544株に分離株を加えたMLVA系統樹



表3 分離株の薬剤耐性パターン

| 分離株名                   | 耐性薬剤名 |    |      |     |    |    |    |
|------------------------|-------|----|------|-----|----|----|----|
|                        | ABPC  | SM | SDMX | OTC | CP | ST | KM |
| O4:i:- (2012B)         | R     | R  | R    | R   |    |    |    |
| O4:i:- (2012A)         | R     | R  | R    | R   |    |    |    |
| S. Typhimurium (2010E) | R     | R  | R    | R   |    |    |    |
| O4:i:- (2012C)         | R     | R  | R    | R   | R  | R  |    |
| S. Typhimurium (2012D) |       |    | R    |     |    |    |    |
| S. Typhimurium (2006F) |       |    | R    |     |    |    |    |
| S. Typhimurium (2008C) | R     |    | R    | R   |    |    | R  |

R:耐性

B)、S. Typhimurium (2010E) は ABPC、SM、SDMX 及び OTC の 4 剤耐性パターンを示した。O4:i:- (2012C) は、この 4 剤に加えて CP と ST にも耐性を示す 6 剤耐性パターンを示した。

#### 6. 養豚場間の疫学調査

PFGE で同じ型に分類され、MLVA で同一のクラスタを形成した 4 株の由来である A、B、C 及び E 養豚場について疫学調査を行ったところ、A 及び B 養豚場は同一生産ピラミッド内にあり、いずれも管外の同一養豚場から豚が導入されていた。飼料会社と食肉処理場は、A 及び B 養豚場間、B、C 及び E 養豚場間で共通していた。化製場は、B 及び E 養豚場で共通していた。各養豚場の管理獣医師は共通ではなかった。各養豚場の位置関係はいずれも 4 km 以上離れた場所に立地しており隣接はしていなかった。

#### 考察

2012 年に分離した豚由来 O4:i:- 3 株は、いずれも TSR 1～3 が増幅され、過去に管内で分離した豚由来 S. Typhimurium と PFGE で高い相同性を示した。中でも S. Typhimurium (2010E) とは共通した 4 剤に耐性を示し、識別能力が高い MLVA で同一のクラスタを形成したことなどから、O4:i:- 3 株はいずれも S. Typhimurium (2010E) が単相変異して派生した株である可能性が示唆された。

O4:i:- の養豚場への侵入経路は特定できなかったものの、養豚場間で、豚の導入経路や利用している飼料会社、食肉処理場及び化製場等に共通点があり、これらの疫学的関連が、サルモネラの侵入に関与した可能性が示唆された。北海道内においては、アライグマ、キタキツネ、カラス等の野生鳥獣のサルモネラ保菌が報告されており<sup>2)</sup>、管内においても野生鳥獣におけるサルモネラ保菌状況調査を実施中である。各養豚場においてサルモネラ侵入防止を図るためには、飼養衛生管理基準に基づいた適切なバイオセキュリティの構築が

必要である。

養豚場によっては、O4:i:- が届出伝染病の対象ではないことを理由に、積極的に対策を実施しない場合がある。しかし、O4:i:- は、感染豚において臨床症状及び病変の形成が認められたことや、分離株の分子疫学的解析において届出伝染病の対象である S. Typhimurium と PFGE で 80% 以上の高い相同性があり、MLVA で同一のクラスタを形成したことなどから、軽視することなく、警戒を強めるべきサルモネラであると考えられた。

#### 謝辞

本研究に際し、分離株の分子疫学的解析にご協力いただいた動物衛生研究所北海道支所 内田郁夫先生、玉村雪乃先生、田中聖様に深謝いたします。

#### 引用文献

- 1) Akiba M, et al. (2011) Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. J Microbiol Methods, 85(1): 9-15.
- 2) 藤井啓 (2011) 感染源としての野生生物とその対策. デーリィ・ジャパン, 56(7): 38-40.
- 3) Hamel AL, et al. (1998) Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J Virol, 72(6): 5260-5267.
- 4) 井戸徳子ら (2012) 血清型 Typhimurium 単相変異株としてのサルモネラ O4:i:- の性状. 第154回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 154: 224.
- 5) 加藤行男 (2011) 分子疫学. 獣疫学会編 獣疫学－基礎から応用まで－ <第二版>, p151－153, 近代出版, 東京.
- 6) Kono Y, et al. (1996) Nested PCR for detection

- and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. J Vet Med Sci, 58(10): 941-946.
- 7) 呉克昌 (2007) 一貫生産農場におけるサルモネラ・ティフィムリウムの清浄化事例報告. 日本豚病研究会報, 51:19-24.
- 8) 黒澤篤ら (2010) 家畜由来 *Salmonella* O4:i- の分子疫学的解析. 第150回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 150 : 200.
- 9) Kurosawa A, et al. (2012) Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. Vet Microbiol, 160(1-2): 264-268.
- 10) Lindstedt BA, et al. (2003) DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. J Clin Microbiol, 41(4): 1469-1479.
- 11) 中岡祐司ら (2010) 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策. 家畜診療, 57 ( 5 ) : 279 – 285.
- 12) 鮫島俊哉 (2006) 豚のサルモネラ症. 見上彪監修 獣医感染症カラーアトラス 第2版, p18 – 19, 文永堂出版, 東京.
- 13) Soyer Y, et al. (2009) *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J Clin Microbiol, 47(11): 3546-3556.
- 14) Tamamura Y, et al. (2011) Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. Appl Environ Microbiol, 77(5):1739-1750.
- 15) 玉村雪乃ら (2012) 牛サルモネラ症由来株の分子疫学的解析. 北海道獣医師会雑誌, 56:157-162.
- 16) 八柳潤ら (2008) 東北地方で2006 (平成18) 年度に分離されたサルモネラの血清型と薬剤耐性. IASR, 29:164-166.