

## 1 2. 豚サルモネラ症発生農場における疫学的考察と感染豚からの*Salmonella Choleraesuis*検出法の検討

大分家畜保健衛生所、宇佐家畜保健衛生所<sup>1)</sup>

○病鑑 吉田史子・滝澤亮 (病鑑)<sup>1)</sup>・病鑑 武石秀一・病鑑 壁村光恵

### 【はじめに】

*Salmonella Choleraesuis* (SC) は、豚サルモネラ症の原因菌であり、豚に敗血症、胃腸炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、時に流産を引き起こす<sup>1)</sup>。SCは、宿主特異性が強く、主に罹患豚鼻汁の飛沫や接触によって感染が成立する。また、不顕性感染が多く、肝臓、脾臓、白血球等に潜伏感染し、PRRSV、PCV2等の他の病原体の混合感染、ストレス等によって宿主の免疫力が低下すると敗血症を引き起こすと考えられている<sup>2)</sup>。さらに、SCは、糞便に排泄されにくいこと、生物型*Choleraesuis*は硫化水素非産生性であることなどから、通常のサルモネラ検査では摘発されにくいと考えられる。その上、ひとたび農場に侵入すれば、常在化しやすいといわれている。

農場でSC感染症が発生した場合、抗生剤の投与や消毒等の一般的な衛生対策に加え、上述のSCの特性から、発症誘因、感染時期を調査し、それらを考慮した対策を講じること、そして他の豚への感染源となる汚染豚群を迅速に隔離することが重要となる。そこで今回、A農場で初めて豚サルモネラ症が発生したことに関連し、感染経路、発症誘因の調査を目的とした、A農場にSCが進入した時期を推測するための保存血清を用いた抗体調査（調査①）、A農場で分離されたSCの由来を調べるための県内分離SC株、A農場分離SC株を用いた性状解析（調査②）、汚染豚群の迅速な隔離を目的とした、A農場同居豚からのマルチプレックスPCR（m-PCR）法を用いたSC検出法の検討（調査③）を行ったので、概要を報告する（図1）。

**SC感染症発生時に重要と考えられること**

- ◆感染経路、発症誘因の調査
  - ◆汚染豚群の迅速な隔離
- ◆感染経路、発症誘因の調査
  - A農場にSCが侵入した時期の推測  
保存血清を用いた抗体調査－調査①
  - A農場のSCの由来を調査  
SC株(A農場分離株、県内分離株)の性状解析－調査②
- ◆汚染豚群の迅速な隔離
  - ×分離培養法は最短5日を要し、迅速性に欠ける
  - 迅速に農場の汚染状況を把握可能な検査法の検討  
マルチプレックスPCR法によるA農場同居豚からのSC検出－調査③

図1 本調査の目的

【発生概要】

2012年10月下旬、母豚270頭規模のA農場において40日齢前後の離乳豚に、チアノーゼを呈する個体が散見されるようになり、一部の個体は死亡。アンピシリン投与による治療を実施したものの、11月に入っても死亡が続くため家保に通報があり、死亡した離乳豚2頭を用いて病性鑑定を定法に従い実施した（図2）。結果、*Salmonella Choleraesuis*による豚サルモネラ症と診断した。

なお、発生は入り口に近く隙間風の入りやすい豚房に限局されていた。また、A農場は、一貫経営であり、県外、県内から豚の導入を実施していた。2012年5月には、PRRSVが農場内に侵入したことが確認された。

1. 病理組織学的検査  
 材料: 主要臓器、脳、小腸、扁桃、腸間膜リンパ節、鼠径リンパ節、下顎リンパ節  
 方法: H-E 染色  
 結果: 髄膜に好中球浸潤、髄膜炎、肺に好中球、マクロファージの浸潤  
 肝臓に巣状壊死、線維素析出  
 脾臓に巣状壊死、白脾髄の縮小、うっ血

2. ウイルス学的検査  
 材料: 扁桃、リンパ節(下顎、肺門、腸間膜、鼠径)  
 方法: 蛍光抗体法…豚コレラ検査  
 遺伝子検査…PCV2, PRRSV  
 結果: 豚コレラ 陰性  
 PCV2, PRRSV 陰性

3. 細菌学的検査  
 材料: 主要臓器及び脳  
 方法: 菌分離…血液寒天培地、DHL寒天培地  
 血清型別…市販の血清型別用抗血清  
 結果: 主要臓器及び脳: *Salmonella Choleraesuis*(O7:c:1,5)分離

**「Salmonella Choleraesuis による豚サルモネラ症」**

図2 病性鑑定概要

【調査①：抗体調査】

A農場保存血清62検体（2008年～2012年に採材）を供試し、小林の方法<sup>3)</sup>に基づき、07群LPS-ELISAを実施した。結果、抗体陽性率は、2008:8/8（100%）、2009:0/6（0%）、2010:1/8（12.5%）、2012:23/40（57.5%）となり、2008年より前に、A農場内にSCが進入していた可能性もあると考えられた（表1）。

表1 抗体調査：結果・まとめ

採材年	08	09	10	12					-12	12
採材月	6	10	12	7					8	9
日齢	肥育豚	肥育豚	肥育豚	30	60	90	120	150	離乳豚	離乳豚
陽性頭数	8/8	0/6	1/8	1/6	2/5	4/5	5/5	5/5	1/6	5/8

※サルモネラ症の発生は2012年11月

2008年、2010年、2012年（発症前）にも、抗体陽性豚が存在

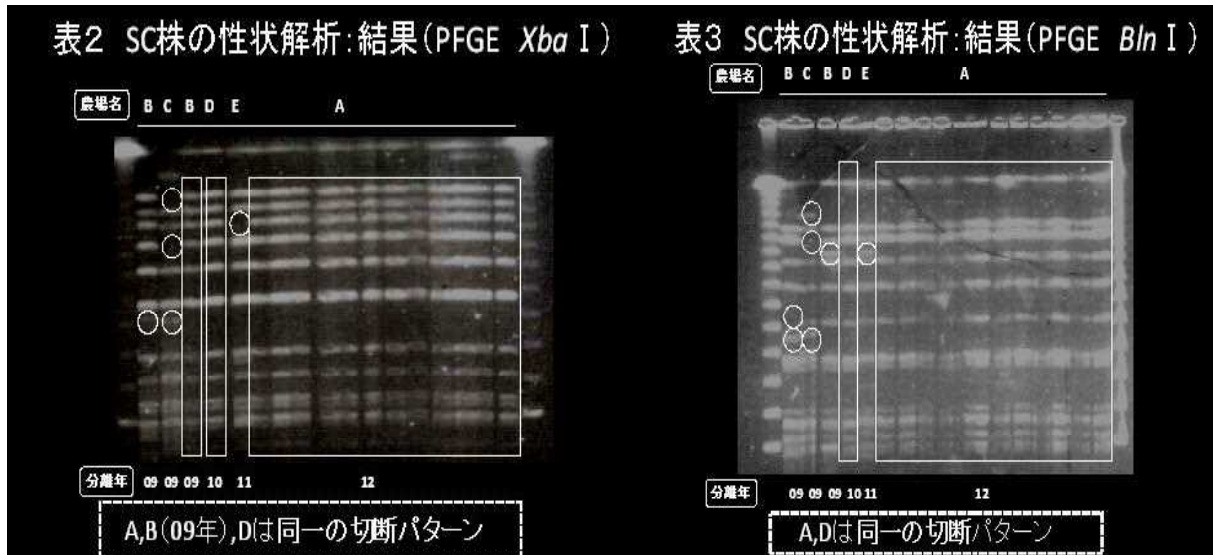


少なくとも2008年にはSCがA農場内へ侵入

【調査②：SCの性状解析】

SCの性状解析では、A農場分離12株、県内4農場（B～E農場）分離5株を供試し、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）、薬剤感受性試験を実施した。

PFGE:制限酵素*Xba* I、制限酵素*Bln* I を用い、秋庭の方法<sup>4)</sup>に従い実施した。*Xba* I を用いた場合は、A農場分離株、B農場2009年分離株、D農場分離株が同一の切断パターンとなった（表2）。制限酵素*Bln* I を用いた場合は、A農場分離株、D農場分離株が同一の切断パターンとなった（表3）。



薬剤感受性試験：アモキシシリン、アンピシリン、カナマイシン、エリスロマイシン、ゲンタマイシン、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール、ナリジクス酸、エンロフロキサシン、ST合剤、セファゾリン、ノルフロキサシンを用い、一濃度ディスク拡散法によって実施した。結果、A農場分離株、C農場分離株、D農場分離株が同一の薬剤感受性パターンを示し、全ての薬剤に感受性を示した（表4）。

**表4 SC株の性状解析:結果(薬剤感受性試験)**

農場名	B	C	B	D	E	A	A	A	A
分離年	2008	2008	2009	2010	2011	2012	2012	2012	2012
AMX	R	S	R	S	R	S	S	S	S
ABPC	R	S	R	S	R	S	S	S	S
KM	S	S	S	S	R	S	S	S	S
GM	S	S	S	S	S	S	S	S	S
OTC	R	S	R	S	R	S	S	S	S
CP	S	S	R	S	R	S	S	S	S
NA	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ERFX	S	S	S	S	I	S	S	S	S
SXT	R	S	I	S	R	S	S	S	S
CEZ	R	S	S	S	S	S	S	S	S
NOR	S	S	S	S	S	S	S	S	S

A,C,Dは同一の薬剤感受性パターン

SCの性状解析の結果、A農場分離株とD農場分離株は、PFGEパターン、薬剤感受性パターンはともに一致しており、同一由来である可能性が極めて高いと考えられた（表5）。なお、A農場、D農場は地理的に近い農場であった。

**表5 SC株の性状解析:まとめ**

菌株名	農場名	分離年	PFGE型		薬剤感受性 パターン
			XbaI	EcoRI	
1	B	2008	I	a	1
2	C	2008	II	b	2
3	B	2009	III	c	3
4	D	2010	III	d	2
5	E	2011	IV	e	4
6	A	2012	III	d	2
7			III	d	NT
8			III	d	NT
9			III	d	NT
10			III	d	2
11			III	d	NT
12			III	d	NT
13			III	d	NT
14			III	d	2
15			III	d	NT
16	III	d	NT		
17	III	d	2		

← 同一由来の可能性が極めて高い

← 農場同士が近い

【調査③：SC検出方法の検討】

A農場同居豚12頭の鼻腔、直腸スワブ、バフィーコートを供試し、分離培養法と迅速同定法とによってSCの検出を行った。分離培養法では、定法に従いサルモネラの分離培養を実施し、市販の型別用抗血清でサルモネラの血清型別を行った。迅速同定法では、検体をラパポートバシリヤディスソーヤペプトン培地で37℃ 1晩培養した増菌培養液からDNAを抽出し、秋庭らの報告<sup>5)</sup>に基づきm-PCR法によるSC特異遺伝子の検出を実施した（図4）。

<材料>  
同居豚12頭の鼻腔、直腸スワブ及びバフィーコート計36検体

<方法>

**標準法:** 分離培養後、市販の型別用抗血清でサルモネラの血清型同定を実施

1日目    2日目    3日目    4日目    5日目:血清型同定

**迅速同定法:** 増菌培養液からDNAを抽出し、マルチプレックスPCR (m-PCR) によってSC特異遺伝子を検出(秋庭ら,2011)

1日目    2日目:血清型同定

m-PCR・・・サルモネラ特異遺伝子と血清型特異遺伝子を同時に検出。以下の2通りの使用方法がある。  
①寒天培地上の分離菌に対して使用  
②増菌培養液から直接DNAを抽出して使用

**図4 SC検出方法の検討:材料及び方法**

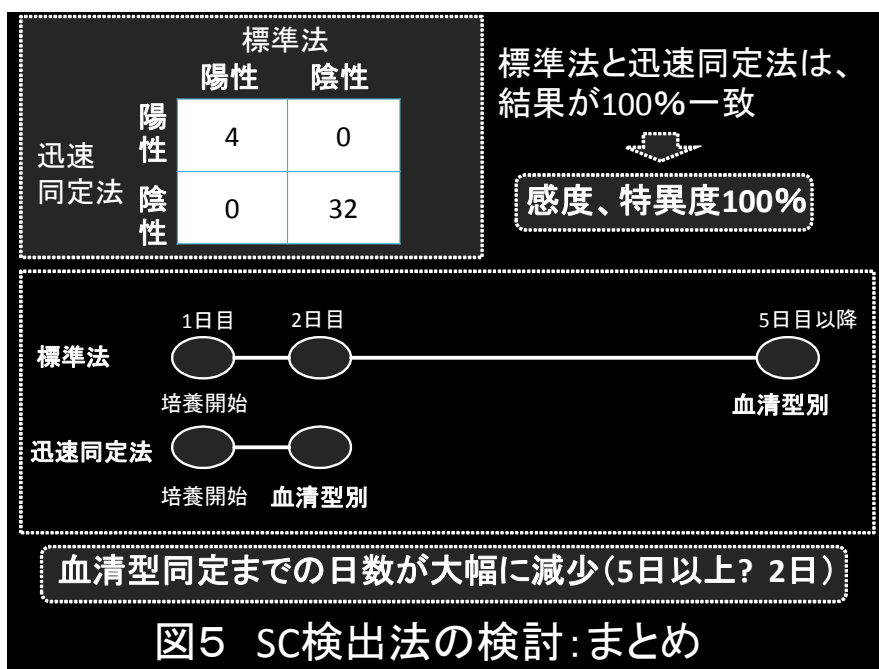
結果、標準法、迅速同定法とも2個体4検体からSCが検出された（表6）。

**表6 SC検出方法の検討:結果**

検体番号	検体種類	標準法	迅速同定法	検体番号	検体種類	標準法	迅速同定法
1	直腸スワブ	-	-	7	直腸スワブ	-	-
	鼻腔スワブ	-	-		鼻腔スワブ	-	-
	パフィコート	-	-		パフィコート	-	-
2	直腸スワブ	+	+	8	直腸スワブ	-	-
	鼻腔スワブ	+	+		鼻腔スワブ	-	-
	パフィコート	+	+		パフィコート	-	-
3	直腸スワブ	-	-	9	直腸スワブ	-	-
	鼻腔スワブ	-	-		鼻腔スワブ	-	-
	パフィコート	+	+		パフィコート	-	-
4	直腸スワブ	-	-	10	直腸スワブ	-	-
	鼻腔スワブ	-	-		鼻腔スワブ	-	-
	パフィコート	-	-		パフィコート	-	-
5	直腸スワブ	-	-	11	直腸スワブ	-	-
	鼻腔スワブ	-	-		鼻腔スワブ	-	-
	パフィコート	-	-		パフィコート	-	-
6	直腸スワブ	-	-	12	直腸スワブ	-	-
	鼻腔スワブ	-	-		鼻腔スワブ	-	-
	パフィコート	-	-		パフィコート	-	-

**標準法、迅速同定法とも2個体4検体からSCを検出**

よって、迅速同定法は、標準法に対し100%の感度特異度を有しており、SCの検出法として十分有用であると考えられた。また、迅速同定法は血清型同定までに要する時間が約2日であり、最短でも5日を要する標準法と比較し、結果判明までの時間を大幅に短縮可能であった（図5）。



**【まとめ及び考察】**

2012年11月、A農場で初めてSCを原因とした豚サルモネラ症が発生したため、SCが農場に進入した時期を推測するための抗体調査、A農場にSCが進入した時期を推測するための保存血清を用いた抗体調査（調査①）、A農場で分離されたSCの由来を調べるための県内分離SC株、A農場分離SC株を用いた性状解析（調査②）、汚染豚群の迅速な隔離を目的と

した、A農場同居豚からのm-PCR法を用いたSC検出法の検討（調査③）を実施した。

調査①の結果、2008年よりサルモネラ07群ELISA抗体陽性であり、2008年以前にA農場内にSCが進入していた可能性があることが判明した。SCは不顕性感染が多く、通常のサルモネラ検査では検出されにくいといった特徴があることから、2012年に発症するまで、農場内で不顕性感染を繰り返していた可能性があると考えられた。2012年11月にサルモネラ症で死亡した個体の病性鑑定では他の病原体の関与が認められなかったこと、発生が隙間風の入りやすい豚房に限局されていたこと、40日齢前後の離乳豚を中心とした発生であったことから、2012年11月に、寒冷、離乳、移動等のストレスによって発症したのと考えられた。

調査②の結果、A農場分離SC株とD農場分離SC株が同一由来の可能性が極めて高いことが判明した。A農場とD農場は同一の農場より豚の導入を行っていたこと、また農場同士が地理的に近いことから、導入豚による感染や、野生動物による伝播等が起こった可能性があると考えられた。

調査③の結果、分離培養法（標準法）とm-PCR法（迅速同定法）の結果は一致し、m-PCR法の感度、特異度は100%となり、SCの検出法として十分利用可能であると考えられた。また要する日数は分離培養法が5日以上、m-PCR法が2日と大幅な検査時間の短縮が可能であった。今後は、汚染豚群の早期隔離対策等に有用であると考えられた。

今後、今回得られた知見をもとに、迅速同定法も取り入れたサルモネラ対策を行っていききたい。

最後に、本研究の遂行にあたり、m-PCRについてご指導、ご助言いただきました動物衛生研究所の秋庭正人先生、ELISAについてご指導、ご助言いただきました動物衛生研究所の小林秀樹先生に深謝いたします。

- 1)小沼操、明石博臣、菊池直哉、澤田拓士、杉本千尋、宝達勉：動物の感染症 第Ⅱ版 p.189 近代出版 2006
- 2)小林秀樹：養豚農場におけるサルモネラ検査法と汚染の低減化．感染症検査実習マニュアル(日本獣医師会)． p.49-64. 2008,
- 3)小林秀樹：簡易LPS抽出キットを用いた豚サルモネラのELISA抗原調整と診断． All About Swine. 30, p.25-38.2007,
- 4)秋庭正人：パルスフィールドゲル電気泳動による腸管出血性大腸菌O157：H7の分子疫学解析法 JVM, Vol.53 No.1 p.14-21 2000
- 5)Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. Rapid identification of *Salmonella* enterica serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR. J Microbiol Methods. 85(1):9-15. 2011