

食肉衛生検査所分離豚丹毒菌へのPCRによる同定と生菌ワクチン株との識別の試み

小畑晴美、喜田宗敬 三重県中央家畜保健衛生所

【はじめに】

三重県における豚丹毒の発生は、1998年以降農場での大発生はなく、食肉衛生検査所における摘発が大部分を占めている。また、*Erysipelothrix*属はかつて1菌種とされていたが、*E. rhusiopathiae*(以下Er)のほかに*E. tonsillarum*(以下Et)をはじめとしてDNAの相同性試験により少なくとも4菌種が含まれていると報告⁴⁾されている。これらは、生化学的性状からは分類できず、Polymerase Chain Reaction(以下PCR)での分類が実施されている。また、関節炎型から生菌ワクチン株が分離されるという報告²⁾がある。

今回、我々は、食肉衛生検査所から分離菌の分与を受け、菌種の分類、血清型別、1a型菌と生菌ワクチン株(小金井65-0.15)の識別を試みた。

【材料】

県下2箇所の食肉衛生検査所において、豚丹毒で摘発・届出された出荷豚から分離された以下の豚丹毒菌を検査材料とした。

材料1 平成18年度上半期に6農場の出荷豚から分離された8株

材料2 2005年9月から11月にかけて豚丹毒の敗血症型が確認された県下の1農場の出荷豚から分離された19株

【方法】

- (1) *Erysipelothrix*属の特定：PCR，牧野らの方法³⁾
- (2) Er,Etを含む4つの種の特定：PCR，北海道衛研の武史の方法⁵⁾
- (3) 血清型別：ゲル内沈降反応(独立行政法人 動物衛生研究所に依頼)
- (4) 1a型菌と生菌ワクチン株の識別：

Randomly Amplified Polymorphic DNA(以下RAPD法)

今田らの報告²⁾のD9355プライマーを用い、Akopyanzらの方法¹⁾で実施

アクリフラビン耐性試験

【成績】

材料1(平成18年度上半期分)

8株の病型は5株が関節炎型、3株が蕁麻疹型であった。血清型別は、関節炎型がすべて1a、蕁麻疹型が1b、2b、11であった(表1)。PCRでは8株すべてがErの特異プライマーのみに増幅産物を認めた。血清型1a型菌と生菌ワクチン株の識別では、関節炎型で血清型1aの5株すべてが、生菌ワクチン株と同じアクリフラビン濃度0.005%まで発育(アクリフラビン耐性)し、生菌ワクチン株と同じRAPDパターン(RAPD1-2型：約2.5,1.5,0.9,0.5Kbの4本のバンド、約400bpのバンド、および253bpの主要なバンドを有する)であった(図1)。また、生菌ワクチン株との識別に供した5株は4農場の出荷豚からの分離株であった。

表1 材料1:平成18年度上半期の検査成績

由来病型	菌数	PCR		血清型別			
		陽+	陰(Er)+	1a	1b	2b	11
麻疹型	3	3	3	0	1	1	1
関節炎型	5	5	5	5	0	0	0
市販ワケン	1	1	1	1			

由来病型	アクリフラビン耐性	RAPD (1-2型)
麻疹型	0	0
関節炎型	5	5
市販ワケン	1	1

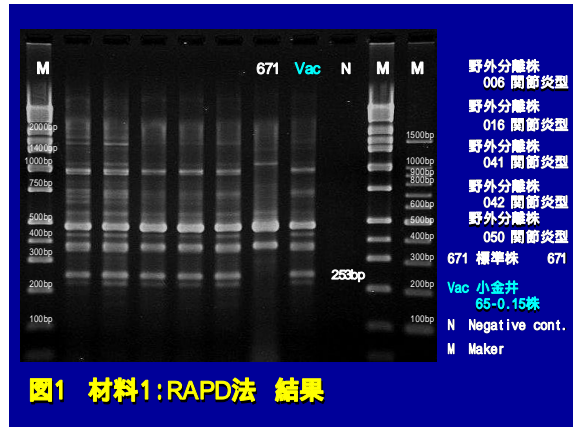


図1 材料1:RAPD法 結果

材料2(平成17年度発生農場分離株)

豚丹毒発生農場の規模は母豚310頭の一貫経営で、発生の時期は、家保の立入りによる敗血症(2頭)の確認および食肉衛生検査所でのと殺禁止(2頭)・摘発(麻疹型8頭、関節炎型11頭)状況等より、9月下旬から11月中旬にかけて発生があったと推定された。食肉衛生検査所での出荷豚からの菌分離は、発生があった9月下旬から11月中旬にかけての時期は主に麻疹型から8株、それ以降は関節炎型から11株が分離された(図2)。終息のために11月中旬から生ワクチン(90日齢)を不活化ワクチン(60日齢,90日齢)に変更したが、終息後も食肉衛生検査所での摘発・届出は、生ワクチンを接種した出荷豚がいなくなるまで散発的に認められた。血清型は19株すべて1a型で、PCRはすべてがErの特異プライマーのみに増幅産物を認めた。生菌ワクチン株との識別では、19株すべてアクリフラビン感受性で、生菌ワクチン株と異なるRAPDパターンを示した(表2)。

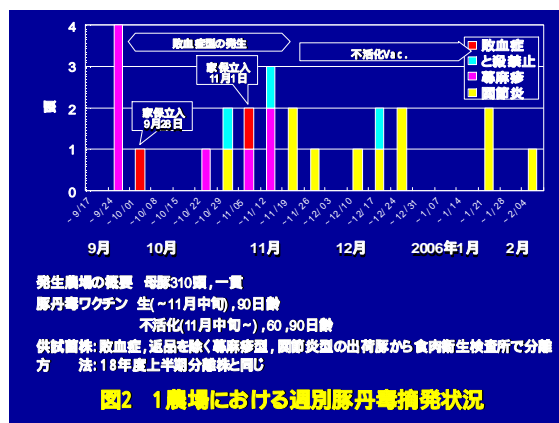


図2 1農場における週別豚丹毒摘発状況

表2 材料2:平成17年度 発生農場の検査結果

検体番号	解体年月日	由来病型	PCR	血清型別	アクリフラビン耐性	RAPDパターン
1(105) - 4(108)	2005, 9.20	麻疹型	Er	1a	-	(1)
5(109)	2005, 10.21	麻疹型	Er	1a	-	(1)
6(110)	2005, 10.28	関節炎型	Er	1a	-	(1)
7(111)	2005, 11.4	麻疹型	Er	1a	-	(1)
8(112) - 9(113)	2005, 11.10	麻疹型	Er	1a	-	(1)
10(114) - 11(115)	2005, 11.18	関節炎型	Er	1a	-	(1)
12(116)	2005, 11.22	関節炎型	Er	1a	-	(1)
13(117)	2005, 12.13	関節炎型	Er	1a	-	(1)
14(118)	2005, 12.6	関節炎型	Er	1a	-	(1)
15(119) - 16(120)	2005, 12.21	関節炎型	Er	1a	-	(1)
17(121) - 18(122)	2006, 1.17	関節炎型	Er	1a	-	(1)
19(12)	2006, 1.31	関節炎型	Er	1a	-	(1)
参照株(20)		市販ワケン	Er	1a	+	1-2

【まとめおよび考察】

豚丹毒生菌ワクチン株(小金井65-0.15)のマーカーはアクリフラビン耐性とマウスの病原性であるが、本報告では、マウスの病原性の検査は実施していないので、生菌ワクチン類似株という言葉を使用する。材料1(平成18年度上半期分)の8株および材料2(平成17年度発生農場分離株)の19株を用いたPCRによる同定では、分離株はすべてErと同定することができた。血清型別、アクリフラビン耐性試験およびRAPD法を併用した生菌ワクチン株との識別では、材料1の分離株8株のうち、慢性関節炎型からの分離された5株はすべて生菌ワクチン類似株と判定された。生菌ワクチン類似株が分離された関節炎の摘発率は、この調査期間で0.006%(と殺検査82,954頭中5頭)であった。材料2は発生農場で経時的に豚丹毒で摘発・届出られた

出荷豚からの分離菌であるが、豚丹毒が発生した農場では、終息後、食肉衛生検査所において関節炎型で摘発・届出られた出荷豚からの分離菌は、すべて血清型1aの強毒株であった。

今回の調査では、散発的に生菌ワクチン類似株が関節炎から分離されるものの、豚丹毒発生農場では終息後、本症の後遺症として認められる関節炎から生菌ワクチン類似株は分離されるものではなかった。

【文献】

- 1) Akopyanz, N. *et al.*: DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 20, 5137-5142
- 2) Imada, Y. *et al.* (2004): Serotyping of 800 Strains of *Erysipelothrix* Isolated from Pigs Affected with Erysipelas and Discrimination of Attenuated Live Vaccine Strain by Genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 2121-2126.
- 3) Makino, S. *et al.* (1994): Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 1526-1531.
- 4) Takahashi, T., Sawada T.: 豚丹毒, 豚病学第4版, 342-352, 近代出版, 東京 (1999)
- 5) Takeshi, K. *et al.* (1999): Direct and rapid detection by PCR of *Erysipelothrix* sp. DNAs prepared from bacterial strains and animal tissues. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 4093-4098.