

Brachyspira hyodysentriae の疫学調査と分離方法の検討

茂野 悟¹⁾, 仲村真理¹⁾, 三島章子²⁾, 高木和香子³⁾

1) 家畜衛生試験場 2) 北部家畜保健衛生所 3) 中央家畜保健衛生所

【はじめに】

豚赤痢はグラム陰性らせん形細菌 *Brachyspira hyodysentriae* (Bh) による届出伝染病である。出血性下痢や偽膜様の粘液を含む下痢を呈し、飼料効率・増体率の低下をもたらす。本県では1964年に米国から Bh 保菌豚を導入したことにより、県内全域に蔓延し、ピーク時には年間数千頭の発生が確認された(図 1)。

【目的と背景】

近年の全国調査から、豚赤痢が国内に広く浸潤し、一部の株では従来感受性が高いとされていた抗菌剤に耐性化していることが報告された。北米では豚赤痢治療薬カルバドックスの使用禁止による再流行が確認され、欧州では遺伝学的に近縁な株の流行が報告されている。また、豚赤痢を疑う病性鑑定で、夾雑菌の発育により Bh の分離困難な事例が散見された。今回、疫学調査および分離方法の検討を実施したため、成績を報告する(図 2)。



図 1 豚赤痢

現状の課題

・全国調査: 豚赤痢菌が国内農場に広く浸潤、従来感受性が高い抗菌剤(チアムリン/バルネムリン)への耐性株確認
(*Brachyspira* 2016, 6, 黒田)

・海外

Carbadoxの使用禁止 ⇒ 北米における発生増加(再興感染症)



本県の浸潤状況調査はなく、近年の薬剤感受性状況は不明

・豚赤痢を疑う病性鑑定
→ Bh の分離困難な事例が散見(夾雑菌の発育)

分離方法の検討が必要

図 2 現状の課題

【材料と方法】

①浸潤状況調査: 採材期間は平成 30 年 5 月～平成 31 年 1 月とし、県内 31 戸 320 頭の豚糞便を用いて、Nested PCR 法により Bh 陽性率を調べた。また、糞便の暗視野鏡検法でスピロヘータ様菌が確認された検体については、BJ 培地による菌分離を実施した(図 3)。

②薬剤感受性試験: ①の 7 農場由来 14 株を用いた。寒天平板希釈法により豚赤痢治療薬 4 薬剤(タイロシン, リンコマイシン, チアムリン, バルネムリン)について最小発育阻止濃度(MIC)を測定し、全国調査および過去の県内調査と比較した(図 4)。

③分離株の解析: ①の 7 農場由来 7 株を用いた。分子疫学的解析としてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)にて農場間の株の相同性を比較し、Multilocus Sequence Typing(MLST)を実施した。また、近年チアムリンやバルネムリン等のプロウムチリン系薬剤耐性との関連が強いと報告されている *tvaA* 遺伝子の塩基配列解析を実施した(図 5)。

④ 分離方法の検討: Bh の運動性・溶血性を利用したスライス法について検証した。材料は Bh PCR 陽性糞便 27 検体とし、添加する抗菌剤の量を 1/4 にした 1/4BJ 培地を用い、2 つの方法(直接塗抹法とスライス法)を比較した。(図 6)。

浸潤状況調査:材料と方法

- 材料:豚糞便320検体
(31農場:平成30年5月～平成31年1月)

哺乳豚	育成豚	肥育豚	候補豚	種豚	母豚
24頭	86頭	89頭	30頭	3頭	88頭

- 方法:(1)Nested PCR法
1st PCR(La T, et al. 2003)
2nd PCR(動物研 藤田 未発表)
- (2)暗視野鏡検法
スピロヘータ様菌が確認された検体
→菌分離

図3 浸潤状況調査:材料と方法

薬剤感受性試験:材料と方法

- 材料:Bh分離14株(7農場:平成30年5月～平成31年1月)
- 方法:寒天平板希釈法
→最小発育阻止濃度(MIC)測定
- 供試薬剤

マクロライド系	タイロシン
リンコマイシン系	リンコマイシン
プレウロムチリン系	チアムリン バルネムリン

図4 薬剤感受性試験:材料と方法

分離株の解析:材料と方法

- 材料:Bh7株(7農場:平成30年5月～平成31年1月)
- 方法
 - (1)パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)
⇒農場間の株の相同性を比較
 - (2)Multilocus Sequence Typing法(MLST)
⇒国内・海外株との比較
 - (3)薬剤耐性遺伝子(tvaA)の塩基配列解析
⇒プロウムチリン(*)耐性との関連性
※プロウムチリン系薬剤:チアムリン、バルネムリン

図5 分離株の解析:材料と方法

分離方法の検討:材料と方法

スライス法(OLSON et al.,1996):Bhの運動性・溶血性を利用

材料:Bh PCR陽性糞便27検体

使用培地:1/4B₁培地(TSA培地+20%豚糞便抽出液+5%羊血液)

添加剤:コロスチン、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
培養条件:37℃ 嫌気/3~7日

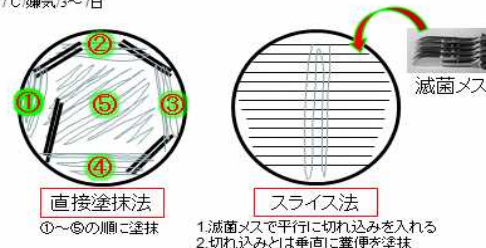


図6 分離方法の検討:材料と方法

【結果】

①31農場中13農場で陽性個体が確認され、農場陽性率は42%だった。発育ステージ別では、種豚以外の全ステージで陽性個体が確認され、特に肥育豚で陽性率が高い傾向がみられた。地域別には北部地域の中～大規模農場で陽性率が高い傾向がみられた(図7)。

②薬剤感受性は全国調査と比較すると、いずれの薬剤でもMICが高値を示した。また、過去の県内調査との比較では、いずれの薬剤でもMIC上昇がみられ、特にチアムリン、バルネムリンで耐性化が顕著であった(図8, 図9)。

③PFGEでは、同一農場および疫学関連農場間で類似又は同一パターンを示した。MLSTでは、新しいST型とST129型の2グループに分類された。tvaA遺伝子はいずれの株でも保有が確認された(図10)。

④直接塗抹法では、夾雑菌の発育が旺盛で純培養が困難であるのに対し、スライス法では、夾雑菌は主に塗抹面で発育し、Bhは切れ込みに沿って発育するため、Bhのみ発育している部分を選択し、継代を繰り返すことにより純培養が容易になった。分離率を比較すると、直接塗抹法単独の29.6%と比較して、スライス法を用いた場合、55.5%と大きく分離率が向上した(図11)。

浸潤状況調査:結果

農場陽性率:42%(13/31)

哺乳豚	育成豚	肥育豚	候補豚	種豚	母豚
21% (5/24)	2% (2/86)	46% (41/89)	10% (3/30)	0% (0/3)	7% (6/88)

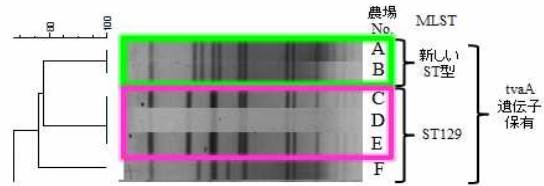
➡肥育豚で陽性率高い

地理的關係

➡北部地域の中～大規模農場が多い

図7 浸潤状況調査:結果

分離株の解析:結果



- (1) PFGE:疫学関連農場で類似パターン
- (2) MLST:2グループに分類
- (3) tvaA遺伝子:すべて保有

図10 分離株の解析:結果

薬剤感受性試験:結果

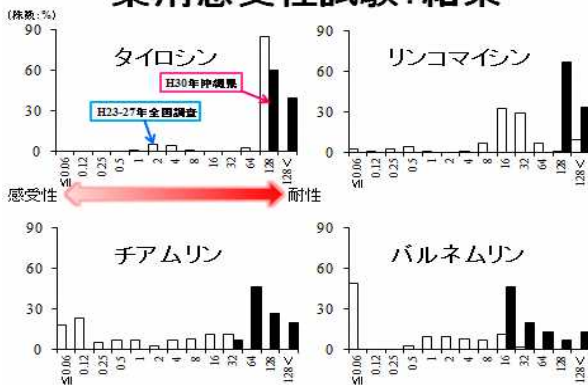


図8 薬剤感受性試験:結果

分離方法の検討:結果

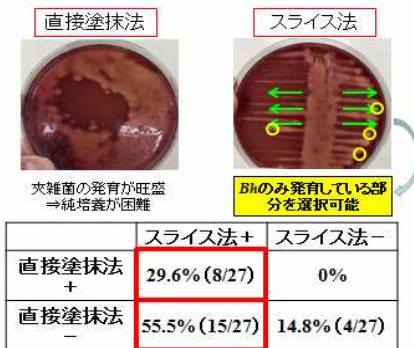


図11 分離方法の検討:結果

過去の県内調査との比較 (MIC90)

※MIC90: 90%の菌株の発育を阻止するMIC値

分離年 (平成)	14 (UEZATO's)	19 (又吉ら)	30 (今年度)
地域	沖縄県	沖縄県	沖縄県
タイロシン	100 ≤	NT	128 <
リンコマイシン	50	64	128 <
チアムリン	0.4	0.25	128
バルネムリン	<0.1	NT	64

図9 薬剤感受性試験:結果

【まとめ】

Bh農場陽性率(47%)は全国調査(20%)と比較して高値であった。薬剤感受性調査から、全国・過去の県内調査と比較して、MICは高値であったため、今後、特にBh陽性農場を中心に薬剤感受性状況を注視し、抗菌剤の慎重使用に努める必要があると考えられる。また、分離株の解析からBhの農場間伝搬が示唆された。豚赤痢は従来、保菌豚の導入により伝搬するとされていたが、近年、輸送車両や野生動物、衛生害虫を介して伝搬することが報告されているため、これらを含めた侵入防止対策を実施する必要がある。また、豚赤痢の発症には、輸送、群編成、飼料変更、天候が関与しており、特に沖縄では湿度・気温の上昇する梅雨の時期から流行する傾向がある。これらのストレス軽減による発症防止対策は農場内・農場間伝搬を防止する上で重要と考えられる。Bhの運動性を利用したスライス法は、Bhの分離に適していることがわかった。

【謝辞】薬剤感受性試験および分離株の解析を実施頂きました、動物衛生研究部門・腸管病原菌ユニット 岩田剛敏研究員に深謝いたします。

