

豚丹毒検査法に関する検討

愛媛県食肉衛生検査センター ○門多優、彦田夕奈¹⁾、藤田明子
服部昌志

1) 愛媛県家畜病性鑑定所

はじめに

豚丹毒は、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染によって起こる豚の疾病で、と畜場法 (昭和 28 年法律第 114 号) に基づくと殺及び解体禁止、全部廃棄対象疾病に指定されており、人には類丹毒を起こす等、人獣共通感染症としても重要である。

当センターでは、豚丹毒が疑われた場合、ゲンタマイシン (以下、GM) を添加した増菌培地および平板培地により分離培養を行っているが、今回、敗血症疑いで保留された豚の疣贅性心内膜炎から、当センターが常用する検査法では検出できなかった豚丹毒菌が分離された。

当該豚は、と畜当日に心内膜疣贅のスタンプ標本をグラム染色し鏡検したところ、グラム陽性長連鎖桿菌が認められたため、敗血症検査に加えて豚丹毒検査も併せて実施、保留 1 日目に 5% 羊血液加トリプトソイ寒天培地 (以下、血寒) での菌分離で、心内膜疣贅以外の臓器から菌が分離されなかったため、敗血症は否定、3 日目に豚丹毒菌の発育が認められなかったため、豚丹毒も否定し、と畜検査合格と判定した。スタンプ標本から豚丹毒が強く疑われたにもかかわらず、当該コロニーの発育が認められなかったことに疑問を抱き、4 日目に室温放置していた血寒を確認したところ、優勢菌から離れた画線の末端に、判定時にはなかった微小コロニーの発育がわずかに認められた。このコロニーのグラム染色でグラム陽性長連鎖桿菌が観察され、コロニー性状も一致することから豚丹毒菌と考えられた。

この菌株が常用の豚丹毒検査で検出できなかった原因について、検査を進める中で GM に感受性がある、及び発育が他の豚丹毒菌より遅延している可能性が疑われたため、現行の検査法の見直しも視野に入れて検討したので報告する。

材料及び方法

1 敗血症検査及び豚丹毒検査

平成 27 年 6 月 15 日に、健康畜として搬入され、敗血症が疑われた豚の心内膜疣贅及び肝臓、腎臓、脾臓を材料とした。心内膜疣贅のスタンプ標本をグラム染色して鏡検を行い、全採材部位を血寒で 37℃、24 時間の好気及び嫌気培養を行った。また、心内膜疣贅は豚丹毒菌の分離検査も併せて実施し、50µg/ml 力価 GM 加トリプトソイブローズ (以下、TSB) で 37℃、48 時間の好気下にて増菌培養後、50µg/ml 力価 GM 加トリプトソイ寒天培地 (以下、TSA) で 37℃、24 時間の好気下にて分離培養を行った。分離菌は SIM 培地により硫化水素産生能および非運動性を確認した。なお、GM は 10mg/ml 力価の注

射用 GM アンプル剤を使用した。また、今回使用した全ての TSA 及び TSB には、0.1% Tween80 を添加した。

2 豚丹毒菌の同定

1 の血寒において 4 日目に微小コロニーが認められ、グラム染色でグラム陽性長連鎖桿菌が確認された菌株（以下、試験株）、及び当センターにおいて平成 25 年 8 月～平成 28 年 6 月に関節炎型及び皮膚型豚丹毒疑いの豚から分離され、コロニー形態、グラム染色像等から豚丹毒菌と判定した 124 株を材料とし、Takeshi らの報告¹⁾による豚丹毒菌に特異的なプライマーを用いて PCR 法を実施した。

3 薬剤感受性試験

試験株 1 株及び 2 で同定した豚丹毒菌から選抜した 21 株（以下、対象株）を材料とし、GM、カナマイシン（以下、KM）、バンコマイシン（以下、VCM）について、寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。GM は粉末試薬を用いた。

4 発育確認検査

試験株 1 株及び対照株 21 株を血寒、GM 非添加 TSA、25 μ g/ml 力価 GM 加 TSA（以下、25-TSA）、50 μ g/ml 力価 GM 加 TSA（以下、50-TSA）に接種し、24、48、72 時間での発育確認を行った。GM は 1 と同様のアンプル剤、および 3 と同様の粉末試薬を使用した。

5 増殖性の比較試験

GM 非添加 TSB（以下、非添加 TSB）、及び注射用 GM アンプル剤と GM 粉末試薬を 25 μ g/ml 及び 50 μ g/ml 添加した TSB（以下、A25-TSB、粉末 25-TSB、A50-TSB、粉末 50-TSB）に、試験株 1 株及び対照株 21 株のうち分離農場および関節炎型と皮膚型の病型の異なる 4 株を選抜して接種し、12、24、36、48 時間後の菌の増殖性について、Kamaluddin らの方法²⁾を用いて 1 株を 2 本の液体培地で培養し、吸光度計により培養液の OD 値を測定して、比較した。有意差検定には $p < 0.05$ の t 検定を用いた。

成績

1 敗血症検査及び豚丹毒検査

敗血症検査において、心内膜疣贅のスタンプ標本をグラム染色し鏡検したところ、グラム陽性長連鎖桿菌が認められた。また、心内膜疣贅からは灰白色のコロニーを形成するグラム陽性球桿菌、及びグラム陰性桿菌が認められたが、その他の臓器から菌は分離されなかった。豚丹毒菌分離検査では、菌の発育は認められなかった。

2 豚丹毒菌の同定

供試菌株 125 株全てで、豚丹毒菌に特異的な遺伝子の増幅が確認された。

3 薬剤感受性試験

試験株の MIC は、GM は $> 512 \mu\text{g/ml}$ 、KM は $> 512 \mu\text{g/ml}$ 、VCM で $256 \mu\text{g/ml}$ であった。対照株の MIC は、GM で $> 512 \mu\text{g/ml}$ が 15 株、 $256 \mu\text{g/ml}$ が 6 株、KM ですべて

の株が >512 μ g/ml、VCM で 256 μ g/ml が 19 株、128 μ g/ml が 2 株であった。

4 発育確認検査

試験株は、血寒と GM 非添加 TSA では 24 時間で微小コロニーが認められた。25-TSA では 24 時間で靄状の微細な菌発育が、48 時間で微小コロニーが認められた。50-TSA では、24、48、72 時間いずれも菌の発育を認めなかった。

対照株はすべて、24 時間で微小コロニーが認められた。

アンプル剤と粉末試薬で作成した培地での菌発育は、目視では差異を認めなかった。

5 増殖性の比較試験

試験株及び対照株の時間毎の OD 値を図に示した(試験株のアンプル剤添加培地: 図 1、試験株の粉末試薬添加培地: 図 2、対照株のアンプル剤添加培地: 図 3、対照株の粉末試薬添加培地: 図 4)。

試験株はアンプル剤添加培地、粉末試薬添加培地ともに、12 時間では非添加 TSB > 25-TSB > 50-TSB の順に高値を示し、それぞれの間には有意差が認められた。24 時間では非添加 TSB に比べ 25-TSB と 50-TSB が有意に低値を示した。

試験株と対照株を比較すると、粉末 25-TSB は 12 時間で、その他の GM 添加培地では 12 時間以降すべてで試験株が有意に低値を示した。

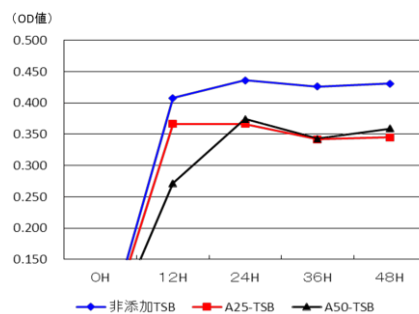


図1 アンプル剤添加培地での試験株のOD値

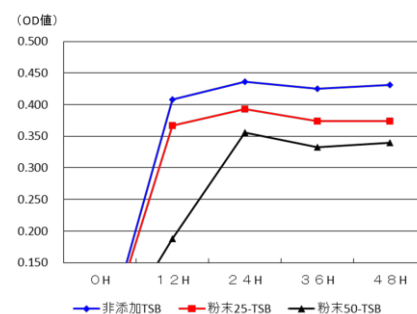


図2 粉末試薬添加培地での試験株のOD値

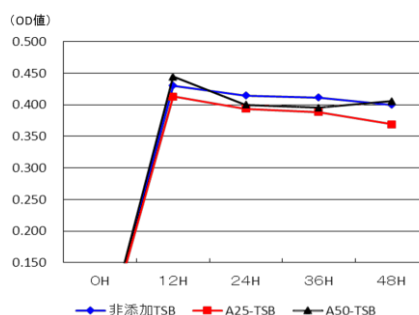


図3 アンプル剤添加培地での対照株のOD値

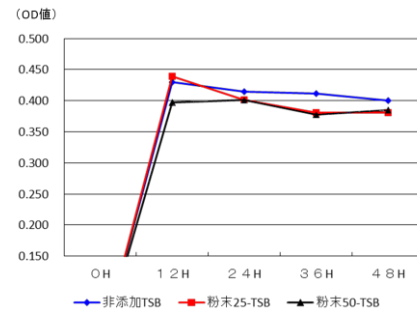


図4 粉末試薬添加培地での対照株のOD値

考察

試験株は当初 50-TSA での発育が認められなかったことから、既報で報告があるように³⁾、GM に感受性であることが推測されたが、試験株と対照株ともに GM に耐性であった。また、薬剤感受性試験の結果から、KM、VCM も GM と同様に選択薬として使用できることが分かった。

豚丹毒菌の増菌培地として、25 μ g/ml 力価の GM 添加培地が使用される報告もあるため⁴⁾、GM 非添加 TSA、25-TSA、50-TSA で改めて試験株の発育を確認したところ、50 μ g/ml では力価が高すぎたために発育しづらかった可能性が疑われた。さらに、非添加 TSB、25-TSB、50-TSB の比較を行った結果から、試験株は GM 存在下で発育が遅延すること、GM 力価が高くなるとその影響が大きくなることが示唆された。そのため、このような菌株も検出できる豚丹毒検査方法を構築するには、培地に添加する GM の力価を 25 μ g/ml に下げること

も検討する必要があるものと考えられた。

また、当センターでは粉末試薬に比べて安価で扱いやすい注射用 GM アンプル剤を使用しているが、添加されている亜硫酸ナトリウム等の添加物には殺菌効果があるとの報告もある⁵⁾。今回、供試菌株において、GM 力価 25 μ g/ml では、アンプル剤は粉末試薬より菌発育が遅延することが示唆されたが、平板培地における菌発育はアンプル剤と粉末試薬で差異は認められず、今後もアンプル剤を使用することは可能と考えられた。

今回、常用の豚丹毒検査法で豚丹毒菌が検出できなかった原因については明らかにすることが出来なかったが、豚丹毒菌の検出は食の安全を確保する上で重要であり、今後も検出方法の検討を続けることとしている。

- 1) Kouichi Takeshi 他 : Journal of Clinical Microbiology, 37, 4093–4098 (1999)
- 2) Kamaluddin ZARKASIE 他 : Journal of Veterinary Medical Science, 58, 87–90 (1996)
- 3) 村北佳史 他 : 京都市衛生環境研究所年報, 78, 105–107 (2012)
- 4) 岡谷友三アレシャンドレ 他 : モダンメディア, 53, 231–237 (2007)
- 5) 藤田昌彦 ; 食品衛生学雑誌, 4, 163–171 (1963)