

8 県内家畜より分離した *Trueperella pyogenes* の性状調査

家畜保健衛生所 武野侍那子 葛城肅仁

はじめに

Trueperella pyogenes (Tp) は、グラム陽性、非運動性、無芽胞の短桿菌で、主に反芻獣や豚などの家畜で肺炎、関節炎、乳房炎、肝膿瘍や子宮内膜炎などの生産性を低下させる疾病に関与する日和見感染症の病原体である。Tp は、動物の上部気道や泌尿生殖器、消化管粘膜に常在しており、物理的な傷害や他の微生物の感染後に二次的に感染し、化膿性病巣を形成する [1]。

近年、海外では獣医領域で分離された様々な株について、Tp の病原性因子として既知の、あるいは推定される因子である溶血性外毒素 pyolysin や宿主細胞への付着を促進する因子 (ノイラミニダーゼ、コラーゲン結合蛋白および線毛) の保有状況などが調査されている [2-9]。Tp は家畜衛生分野において比較的分離される頻度の高い細菌であるものの、わが国の家畜由来株に関する報告はほとんどない [10]。そこで今回、本県の家畜由来株についてその性状を調査した。

材料

平成 22 年 3 月から 29 年 11 月までに、病性鑑定依頼のあった県内飼養家畜より分離した Tp 52 株を用いた。内訳は、乳用牛飼養農家 16 戸 39 株 (肺炎 5 株、乳房炎 10 株、疣贅性心内膜炎 2 株、化膿性関節炎 3 株、膿瘍 8 株、子宮内膜炎 4 株、子宮蓄膿症 2 株、感染性死産 5 株)、肉用牛飼養農家 5 戸 6 株 (肺炎 4 株、化膿性関節炎 1 株、膿瘍 1 株)、豚飼養農家 4 戸 7 株 (肺炎 1 株、疣贅性心内膜炎 1 株、化膿性関節炎 3 株、膿瘍 2 株) で、様々な疾病の病変部位から Tp が分離された (図 1)。

供試菌株は、5%羊血液加トリプチケースソイ寒天培地で 37℃、5%CO₂ 条件下にて 48 時間まで培養した後、コロニー形態や溶血性、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、簡易生化学性状検査 (Api Coryne) により Tp と同定した。

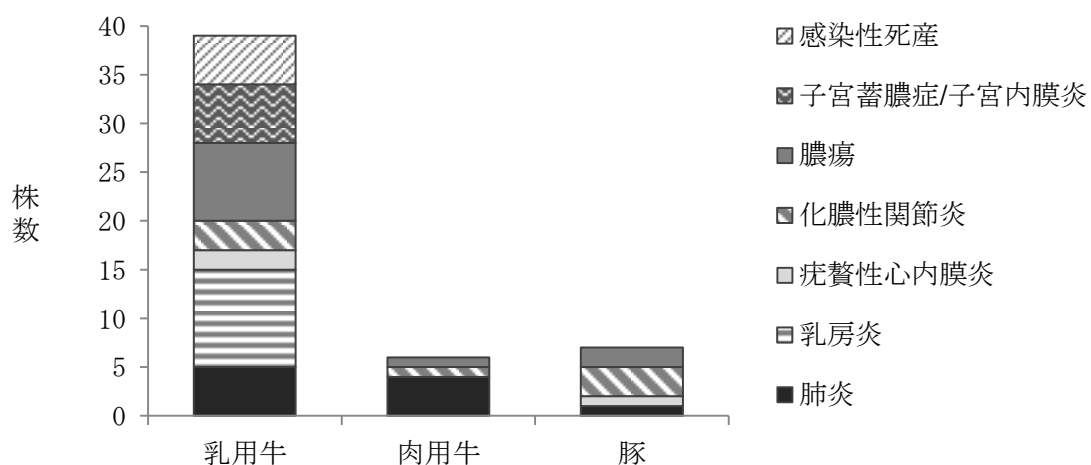


図 1 飼養家畜別の供試菌株数

方法

1) 病原性因子

簡易 DNA 抽出キット (InstaGene マトリックス) を用いてコロニーから DNA を抽出し、PCR 法で 4 つの病原性因子をコードする病原性関連遺伝子 (*plo*、*cbpA*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimC*、*fimE* および *fimG*) の検出を試みた (表 1) [1, 7]。

表 1 Tp の病原性因子

病原性因子 (病原性関連遺伝子)	
外毒素	pyolysin (<i>plo</i>)
細胞外マトリックス結合蛋白	コラーゲン結合蛋白 (<i>cbpA</i>)
	フィブリノゲン結合蛋白
	フィブロネクチン結合蛋白
細胞外酵素	Dnase
	ノイラミニダーゼ (<i>nanH</i> 、 <i>nanP</i>)
	プロテアーゼ
その他	上皮細胞への侵襲性
	マクロファージ内生存性
	バイオフィルム形成能
	線毛 (<i>fimA</i> 、 <i>fimC</i> 、 <i>fimE</i> 、 <i>fimG</i>)

2) 薬剤感受性

微量液体希釈法 [11, 12] でアンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトオフル (CTF)、カナマイシン (KM)、タイロシン (TS)、チルミコシン (TMS)、オキシテトラサイクリン (OTC)、チアンフェニコール (TP)、エンロフロキサシン (ERFX) およびマルボフロキサシン (MBFX) の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

3) 分子疫学解析

県内に分布する Tp の多様性を調査するため、BOX-PCR 法 [7, 9] による分子疫学解析を行った。

結果

1) 病原性因子

病原性関連遺伝子 *plo*、*cbpA*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimC*、*fimE* および *fimG* の保有率は、それぞれ 100%、13.5%、63.5%、50%、100%、75%、88.5% および 19.2% であった。

同じ農家で分離された株であっても、保有する病原性関連遺伝子のパターンは様々であった (表 2)。また、由来となった疾病別の病原性関連遺伝子保有率には明確な差が認められなかった (表 3)。

表 2 農家別の病原性関連遺伝子保有パターン

保有する病原性関連遺伝子	農家別の分離株数													
	A	B	C	E	H	I	J	K	M	P	R	W*	X*	
<i>plo</i> / <i>cbpA</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>					1				1					
<i>plo</i> / <i>cbpA</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>			1											
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>	2	1						1						
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>				1	1	1	1			1			2	
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>	3													
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i>						1								
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i>				1					1					
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>							2							
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>			1					1		2				
<i>plo</i> / <i>nanH</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i>		1											3	
<i>plo</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>	1					2								
<i>plo</i> / <i>nanP</i> / <i>fimA</i> / <i>fimE</i> / <i>fimG</i>	1													
<i>plo</i> / <i>fimA</i> / <i>fimC</i> / <i>fimE</i>				2	1	1	1	1		1				

*: 豚飼養農家

表 3 疾病別の病原性関連遺伝子保有率

疾病	株数	病原性関連遺伝子 (単位: %)							
		<i>plo</i>	<i>cbpA</i>	<i>nanH</i>	<i>nanP</i>	<i>fimA</i>	<i>fimC</i>	<i>fimE</i>	<i>fimG</i>
肺炎	10	100	30	80	50	100	90	100	10
乳房炎	10	100	10	70	60	100	80	90	40
疣贅性心内膜炎	3	100	33.3	66.7	66.7	100	66.7	100	33.3
化膿性関節炎	7	100	14.3	71.4	42.9	100	71.4	100	14.3
膿瘍	11	100	9.1	81.8	54.5	100	81.8	81.8	18.2
子宮蓄膿症/ 子宮内膜炎	6	100	0	33.3	66.7	100	100	100	0
感染性死産	5	100	0	60	60	100	60	100	20

2) 薬剤感受性

各薬剤の 50%の菌株の発育を阻止した MIC (MIC_{50}) および 90%の菌株の発育を阻止した MIC (MIC_{90}) は、ABPC でともに $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 、CEZ で $0.25\mu\text{g/mL}$ および $0.5\mu\text{g/mL}$ 、CTF でともに $1\mu\text{g/mL}$ 、KM でともに $2\mu\text{g/mL}$ 、TS でともに $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 、TMS でともに $\leq 0.125\mu\text{g/mL}$ 、OTC で $8\mu\text{g/mL}$ および $16\mu\text{g/mL}$ 、TP でともに $1\mu\text{g/mL}$ 、ERFX でともに $1\mu\text{g/mL}$ 、MBFX でともに $1\mu\text{g/mL}$ であった。ほとんどの薬剤で MIC が低濃度に分布していたが、OTC の MIC は高濃度に分布し、大きく二峰性を示していた。また、1 株で KM の MIC が $64\mu\text{g/mL}$ 、別の 1 株で TS および TMS の MIC が $>128\mu\text{g/mL}$ であり、他の分離株に比べて高い値を示した (表 4)。

表 4 薬剤感受性試験の結果

薬剤	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											MIC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MIC_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>128		
ABPC	52											≤ 0.125	≤ 0.125
CEZ	4	34	14									0.25	0.5
CTF			15	37								1	1
KM					48	2	1			1		2	2
TS	51										1	≤ 0.125	≤ 0.125
TMS	51										1	≤ 0.125	≤ 0.125
OTC	1	16	2			2	6	24	1			8	16
TP			2	49		1						1	1
ERFX			20	32								1	1
MBFX				47	5							1	1

灰色:Tp 基準株 ATCC19411 の MIC [12]

ABPC:アンピシリン、CEZ:セファゾリン、CTF:セフトオフル、KM:カナマイシン、TS:タイロシン、TMS:チルミコシン、OTC:オキシテトラサイクリン、TP:チアンフェニコール、ERFX:エンロフロキサシン、MBFX:マルボフロキサシン

3) 分子疫学解析

電気泳動後のバンドパターンにより、38 タイプに分類した。このうち、2 株以上で一致していたバンドパターンは 10 タイプ (タイプ 1~10) であった (図 2)。

タイプ 2 の株が分離された農家 A と農家 C は地理的に距離が離れており、互いの交流はなかったが、その他のタイプはすべて同一農家内あるいは近隣の農家間で分離された株によって構成されていた (図 3)。

各タイプを構成する分離株の由来となった疾病は様々であったが、病原性関連遺伝子では、同じタイプ内に 1 つあるいは 2 つの差を認めたものの概ね一致していた。薬剤感受性では、ABPC、KM、TS および TMS の MIC はすべて一致しており、CEZ、CTF、TP、ERFX および MBFX の MIC は同一タイプ内で認められる差が 2 倍までであった。OTC の MIC は異なる農家に由来するタイプ 4 で 64 倍、同じ農家に由来するタイプ 10 で 32 倍の差を認めた (表 5)。

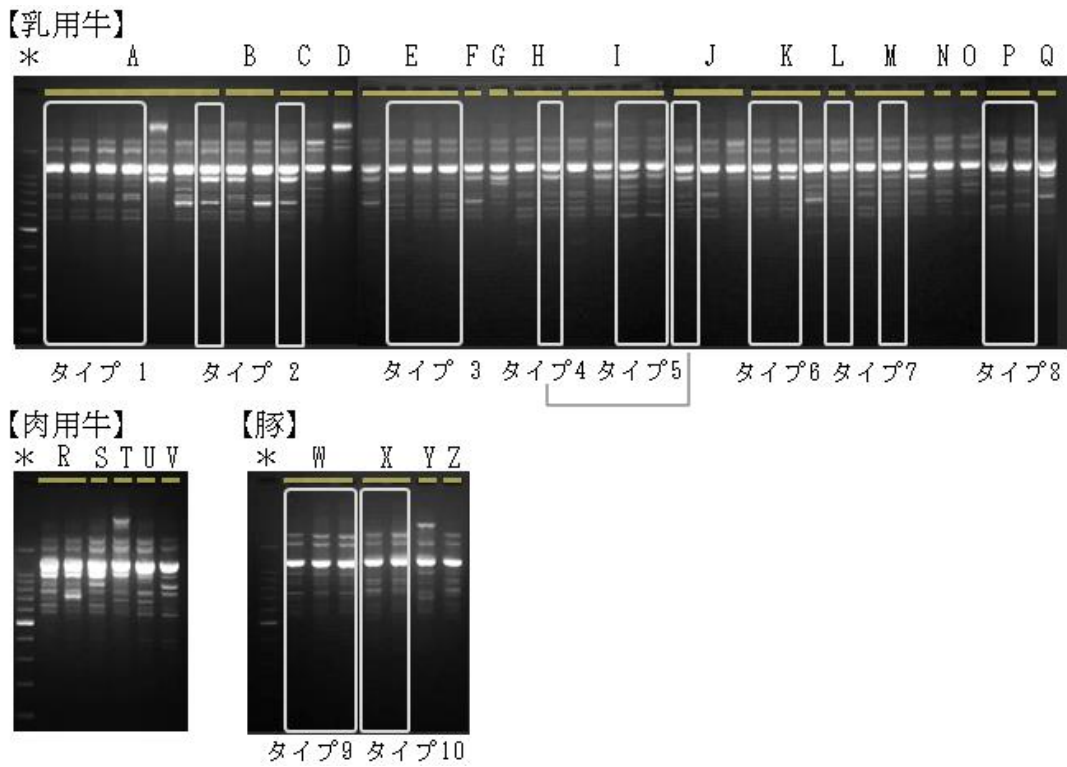


図2 BOX-PCR 増幅産物の電気泳動写真
*:100bp DNA Ladder

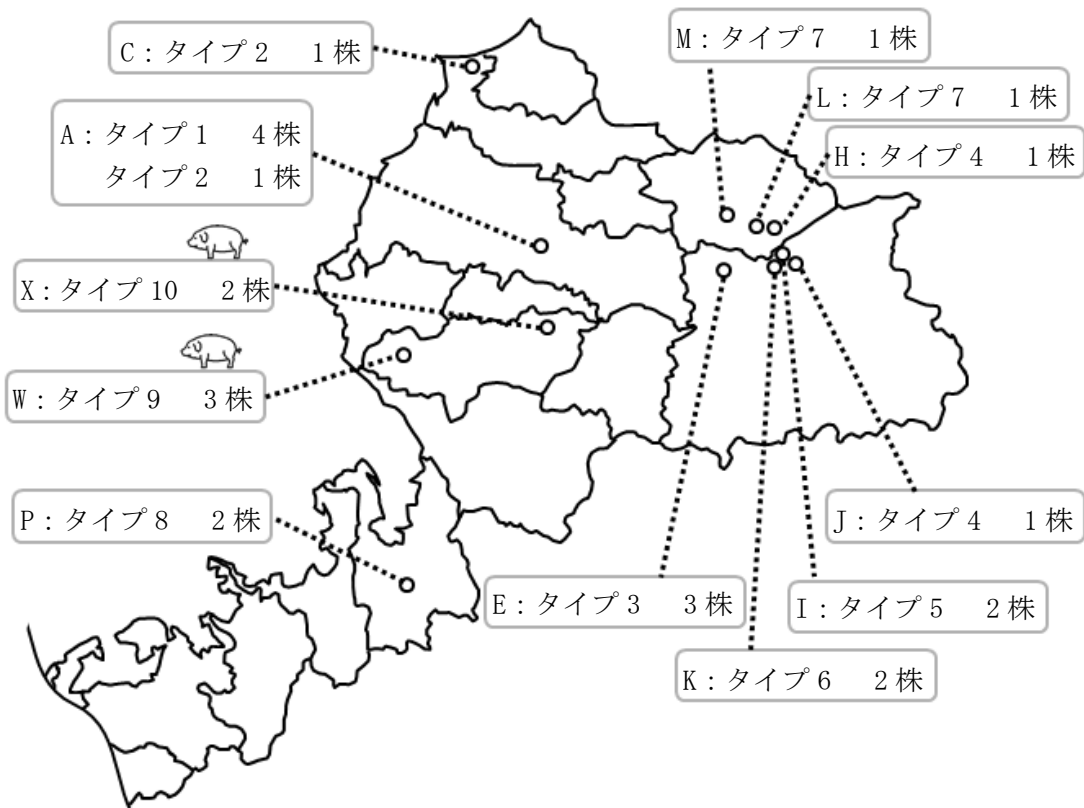


図3 県内における各タイプの分布状況
🐷:豚飼養農家

表 5 タイプ別の病原性関連遺伝子保有状況および薬剤感受性

タイプ	分離年	農家	病原性関連遺伝子	薬剤感受性 (µg/mL)					
				OTC	CEZ	CTF	TP	ERFX	MBFX
1	H22	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimC/fimE/fimG</i>	16	0.5	1	2	0.5	1
	H23	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE/fimG</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H23	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE/fimG</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H23	A	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE/fimG</i>	16	0.25	1	2	1	1
2	H29	A	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.5	1	2	0.5	1
	H29	C	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
3	H27	E	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H28	E	<i>plo/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	1	2	1	1
	H29	E	<i>plo/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
4	H25	H	<i>plo/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
	H29	J	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE/fimG</i>	0.25	0.5	0.5	2	1	1
5	H29	I	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	2	1	1
	H29	I	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.5	1	2	1	1
6	H29	K	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	16	0.25	0.5	2	1	1
	H29	K	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	16	≤0.125	0.5	2	0.5	1
7	H28	M	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimE</i>	0.25	0.5	1	2	1	1
	H29	L	<i>plo/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	2	1	2
8	H29	P	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	1	0.5	1
	H29	P	<i>plo/nanH/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	1	2	0.5	1
9	H29	W*	<i>plo/nanH/fimA/fimE</i>	8	0.25	1	2	0.5	1
	H29	W*	<i>plo/nanH/fimA/fimE</i>	8	0.25	1	2	0.5	1
	H29	W*	<i>plo/nanH/fimA/fimE</i>	8	0.25	1	2	0.5	1
10	H27	X*	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	8	0.25	0.5	2	0.5	1
	H27	X*	<i>plo/nanH/nanP/fimA/fimC/fimE</i>	0.25	0.25	0.5	2	0.5	1

*:豚飼養農家

OTC:オキシテトラサイクリン、CEZ:セファゾリン、CTF:セフトリオラム、TP:チアンフェニコール、ERFX:エンロフロキサシン、MBFX:マルボフロキサシン

まとめおよび考察

県内ではこれまで肺炎、関節炎、乳房炎、肝膿瘍や子宮内膜炎など様々な疾病から Tp を分離している。今回、県内家畜由来の 52 株についてその性状を調査した。

既報では Tp の病原性関連遺伝子保有率は、*plo* が 100%、*cbpA* が 6.8~100%、*nanH* が 15.2~100%、*nanP* が 43.8~100%、*fimA* が 76.4~100%、*fimC* が 58.3~88%、*fimE* が 72.2~98%、*fimG* が 5.6~75%である [2-9]。県内家畜由来株では、既報と同様にすべての株で *plo* と *fimA* が検出され、これらが病原性の発揮に重要な因子であると考えられた。供試菌株の由来となった疾病は様々であったが、それぞれに株数が少なかったことから、現段階では特定の疾病に関与する病原性関連遺伝子を明らかにすることはできなかった。

薬剤感受性試験では、ほとんどの薬剤の MIC が低濃度に分布し、感受性を維持していると考えられた。しかし、Tp は膿瘍形成の進行やバイオフィルムの形成によって抗菌剤を用いた治療に反応しなくなるため、早期の治療が重要となる [1, 13-16]。また、多くの薬剤に感受性である一方、1 株で KM、別の 1 株で TS および TMS の MIC が高い値を示し、これらは耐性株であると考えられた。さらに、OTC に至っては半数以上の株で MIC が高濃度に分布し、耐性化が進んでいるものと考えられる。Tp の TS や OTC 耐性に関しては、耐性遺伝子の関与が報告されており [17-20]、常在菌である Tp が他の細菌へ耐性遺伝子の供給源となる可能性もあることから、今後さらなる調査が必要である。

分子疫学解析では、県内家畜由来株は 38 のタイプに分類され、遺伝的に多様な株が分布していることが明らかとなった。なかでも、2 株以上でバンドパターンが一致したタイプは、同一農家内あるいは近隣の農家間で分離された株によって構成されており、遺伝的に近縁な株が地域ごとに分布していた。さらに、これらのタイプは由来となった疾病が様々であったが、保有する病原性関連遺伝子および薬剤感受性が概ね一致していた。このことから、特定の病原性関連遺伝子の有無によって特定の疾病を発症するのではなく、農場内に常在している Tp が様々な疾病を引き起こし得るものと考えられた。

日和見感染症である Tp 感染症の予防には、宿主の健康状態を良好に維持すること、先行する病原体の感染および物理的な傷害（乳頭損傷、尾かじり）を防ぐことなど、日頃の飼養衛生管理が重要となる。今後、引続き農家巡回時の飼養衛生管理指導を徹底していくとともに、農場や疾病ごとにまとまった株を収集できるよう採材し、治療や予防の一助となるよう調査を継続したい。

引用文献

- [1] Jost, B. H. & Billington, S. J. (2005): *Antonie Van Leeuwenhoek*. 88, 87-102.
- [2] Ozturk, D., Turutoglu, H., Pehlivanoglu, F. et al. (2016): *Israel J. Vet. Med.* 71(3), 36-42.
- [3] Riseti, R. M., Zastempowska, E., Twaruzek, M. et al. (2017): *Lett. Appl. Microbiol.* 65(2), 125-132.
- [4] Rzewuska, M., Stefańska, I., Osińska, B. et al. (2012): *Vet. Microbiol.* 160, 69-76.
- [5] Rzewuska, M., Czopowicz, M., Gawryś, M. et al. (2016): *Microb. pathog.* 96, 35-41.
- [6] Santos, T. M. A., Caixeta, L. S., Machado, V. S. et al. (2010): *Vet. Microbiol.* 145, 84-89.
- [7] Silva, E., GaiVão, M., Leitão, S. et al. (2003): *Vet. Microbiol.* 21(7), 20-24.
- [8] Zastempowska, E. & Lassa, E. (2010): *Vet. Microbiol.* 161, 153-158.
- [9] Zhao, K., Tian, Y., Yue, B. et al. (2013): *Arch. Microbiol.* 60(2), 113-114.
- [10] 大石大樹. (2014): 第 56 回山口県家畜衛生業績発表会集録. 48-50.
- [11] 動物用抗菌剤研究会薬剤感受性試験法検討会. (2014): 動物抗菌会報. 36, 129-144.
- [12] de Boer, M., Heuer, C., Hussein, H. et al. (2015): *J. Dairy Sci.* 98, 4427-4438.
- [13] 東量三および竹内正太郎. (1977): 豚病学:365-375.
- [14] Shalm, O. W., Carroll, E. J., Jain, N. C. et al. (1972): 牛の乳房炎. 275-277.
- [15] 十勝乳房炎協議会. (2014): MASTITIS CONTROL II, 29.
- [16] 農林水産省経営局. (2014): 家畜共済における抗菌性物質の使用指針.
- [17] Billington, S. J., Songer, J. G., Jost, H. B. (2013): *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(5), 1281-1287.
- [18] Billington, S. J. & Jost, H. B. (2006): *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(11), 3580-3587.
- [19] Jost, H. B., Field, A. C., Trinh, H. T. et al. (2003): *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(11), 3519-3524.
- [20] Jost, H. B., Trinh, H. T., Songer, J. G. et al. (2003): *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(3), 721-727.