(209)

【原 著】 産業動物

国内で初めて分離されたSalmonella Nimaによる 牛サルモネラ症の発生

- 1) 北海道釧路家畜保健衛生所(〒084-0917 釧路市大楽毛127番地の1)
- 2) 北海道石狩家畜保健衛生所(〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘3番地)
- 3) 北海道宗谷家畜保健衛生所(〒098-5738 枝幸郡浜頓別町緑ヶ丘8丁目3番地)
- 4) (国研)農研機構動物衛生研究部門(〒305-8517 茨城県つくば市観音台字3-1-1)

要 約

平成29年5月、釧路管内において国内初となる Salmonella Nima(Nima)による牛サルモネラ症の発生を確認した。防疫対応にあたるとともに、血清型判定の改善策の検討と分離菌の性状解析を実施した。当初、国内市販 O 群免疫血清によるスライド凝集法で群別不能であったため、試験管凝集反応による H 免疫血清判定方法を検討し、判定可能であることを確認した。また、マイクロプレートを活用した H 抗原決定法についても Nima で適用できることを確認した。さらに、サルモネラの病原性を評価するために、Nima と数種の試験対照株を設定し、2 種類の細胞を使用した細胞内侵入性試験を実施した結果、有意差は認められなかった。次に、牛飼養農場で汚染が懸念される飼料(サイレージ)、水および堆肥を環境材料とし、4 $\mathbb C$ と $\mathbb C$ と $\mathbb C$ と $\mathbb C$ における Nima と試験対照株の環境中の生存性を経時的に比較した結果、各材料共に生存性に差は確認されず、同等の生存性を示したことから、Nima は他の血清型と同様の防疫対策が有効と推察した。

キーワード: Salmonella Nima、H免疫血清判定法

-----北獣会誌 64, 209~213 (2020)

はじめに

牛のサルモネラ症は、Salmonella Typhimurium(Typhimurium)、S. Dublin(Dublin)、S. Enteritidisの3血清型が家畜伝染病予防法に基づく届出伝染病に指定されている。この他、S. Infantis、S. Tennessee(Tennessee)など、さまざまな血清型の牛のサルモネラ症が知られており、発熱、下痢、時には敗血症や流産を引き起こし、農業経営に甚大な被害を及ぼす。

S. Nima(Nima)はTyphimuriumなどと同様に、S. enterica subsp. *enterica*に分類され、菌体抗原(O抗原) 28、鞭毛抗原(H抗原)1相y、2相1,5(28:y:1,5)を示す。しかし、国内において本血清型による牛のサルモネラ症は報告されておらず、牛における病原性や細菌

学的性状などが不明な点も多い。今回、国内において、 Nimaによる牛サルモネラ症が発生したことから、釧路 家畜保健衛生所(当所)において防疫対策方法や細菌性 状について調査したので報告する。

発生概要

1. 農場概要

飼養頭数385頭(搾乳牛210頭、育成牛162頭、哺育牛 13頭)の酪農場で、搾乳牛はフリーストール、育成牛は パドック、哺育牛はカーフハッチで飼養されていた。

2. 発生状況

平成29年5月28日、搾乳牛8頭が発熱、泌乳量激減、泥 状下痢を呈したため、臨床獣医師はサルモネラ症を疑い、 発症牛8頭の糞便についてMLCB寒天培地(MLCB:

連絡責任者:山田真喜子 北海道釧路家畜保健衛生所

〒084-0917 釧路市大楽毛127番地の1

 $\texttt{TEL}: 0154-57-8775 \quad \texttt{FAX}: 0154-57-6125 \quad \texttt{E-mail:yamada.makiko@pref.hokkaido.lg.jp}$

日水製薬、東京)による分離培養を実施した。翌日、4 検体から黒色コロニー(分離株)を確認したため、当所 に分離株の菌種同定を依頼した。なお、下痢発症牛は、 5月30日までに合計21頭に上った。

3. 病性鑑定

搬入された分離株4検体について、以下のとおり同定 検査を実施した。

(1) 生化学性状検査

簡易同定キット (ラピッドID 32E: ビオメリュージャパン、東京) による生化学性状検査において、全株を *Salmonella* spp. (コード:66654061721、相同確率99.9%) と判定した。

(2) O抗原検索

国内で市販されるサルモネラ免疫血清のO群血清であるサルモネラ免疫血清「生研」1号セット(O血清、デンカ生研、東京)によるスライド凝集法を実施したが、いずれの分離株も陽性を示すO抗原を確認することはできなかった。

(3) H抗原検索

国内で市販されるサルモネラ免疫血清のH血清であるサルモネラ免疫血清「生研」2号セット(H血清、デンカ生研)を用いて試験管凝集反応検査を実施し、分離株のH抗原は、1相がy、2相が1および5であることを確認した。

(4) 遺伝子検査

TAKARA *Salmonella* serovar Typhimurium Identification Kit (タカラバイオ、東京)を用いた遺伝子検査を実施し、分離株すべてにサルモネラ特異遺伝子*invA* 陽性を確認した。

上記の検査結果より、分離株をサルモネラ属菌と同定 し、自衛防疫組合は速やかに清浄化対策を開始した。

なお、(国研) 農研機構動物衛生研究部門に分離株の 血清型別を依頼したところ、海外市販のSalmonella O Antiserum Group M (DIFCO、アメリカ) を用いた凝 集反応により、O抗原が28と判明し、分離株の血清型は Nima (28: y:1,5) と決定した。

(5) 薬剤感受性試験

1濃度ディスク法により薬剤感受性試験を実施した。

供試薬剤はアンピシリン、セファゾリン、セフチオフル、ナリジスク酸、エンロフロキサシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、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、ST合剤、コリスチンの12薬剤で、全て感受性であった。

4. 農場での防疫対策の概要

地域の自衛防疫組合が中心となり、畜舎および環境の 一斉清掃・消毒を実施した。また、飼養牛全頭へ生菌剤 を給与した。発生時とその後2週間間隔で飼養牛全頭の 同居牛検査と飼養環境の検査(清浄性確認検査)を実施 し、発症牛および同居牛検査において摘発された保菌牛 を隔離飼養して抗生剤により治療した。清浄性確認検査 において汚染が確認された飼養環境については、重点的 な清掃・消毒を実施した。

5. 清浄性確認検査

清浄性確認検査におけるサルモネラの検出は、糞便をハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地(栄研化学、東京)で一晩増菌培養後、MLCBとESサルモネラ寒天培地Ⅱ(ESⅡ:栄研化学)の2種類の選択分離培地を使用し、37℃で18時間好気培養して、各培地に発育したサルモネラ様コロニーがNimaであるか次のように判定した。

当所では、通常、清浄性確認検査におけるサルモネラ様コロニーは、国内市販の血清によるスライド凝集法での抗原の判定を行っている。本事例においては、国内市販の血清によるの抗原の同定ができなかったことから、Nimaに対するH血清(y、1および5)による試験管凝集反応法で判定することとし、対策期間中、延べ309頭分のH抗原検査を実施した。なお、各培地に発育したサルモネラ様コロニーがNima以外の血清型である可能性があるため、Nimaに対するH血清による試験管凝集法の実施の有無に関わらず、全てのサルモネラ様コロニーについての群多価およびO1多価免疫血清等によるスライド凝集反応法を併せて実施した。

清浄性確認検査結果の推移は、**表1**に示したとおりで、5月31日に対策を開始し、計6回の検査を実施した。5回目と6回目の検査において、糞便と環境からサルモネラ属菌が分離されなかったことから、7月31日に防疫対策を終了した(表1)。自衛防疫組合の的確な対策によ

表 1. 清浄性確認検査結果の推移(陽性数/検体数)

検査 回数	1回目 (5月31日)	2回目 (6月12日)	3回目 (6月26日)	4回目 (7月3日)	5回目 (7月18日)	6回目 (7月25日)
糞便	4/362	0 /381	0 / 385	2/388	0 / 390	0 / 395
環境	6/28	3/39	0 / 40	0 / 40	0 / 47	0 / 47

(211)

り、他農場における発生は認めなかった。

マイクロプレートを活用したH抗原決定法

本事例では、清浄性確認検査で分離したサルモネラ様コロニーの判定は、H血清による試験管凝集反応法で実施したが、マイクロプレートを活用したH抗原決定法[1]の報告もある。そのため、マイクロプレートを活用したH抗原決定法[1]を改変し、Nimaでも適用が可能か試験、検討を行った。

1. 材料および方法

ハートインフュージョンブイヨン (日水製薬) にNima を平板培地から1コロニー釣菌して接種して菌液を作成し、96穴マイクロプレート (U底) の各ウェルに菌液を100 μ I ずつ分注し、1時間毎に1分間震盪しながら37℃で4~5時間培養した。培養後、100 μ I の1%ホルマリン加生理食塩水とH血清y、1および5を10 μ I ずつ各ウェルに分注し、50℃で1時間反応後、凝集の有無を確認した。また、常法の試験管凝集反応法による凝集と比較した。

2. 結果

マイクロプレートを活用した方法では、NimaのH抗原y、1 および5 に対する明瞭な凝集反応が確認され、試験管凝集反応法による判定結果と一致し、マイクロプレートを活用した方法の適用が可能であると考えられた(図1、2)。



図 1. マイクロプレート (U底) の凝集反応 (Nima、H抗原y)

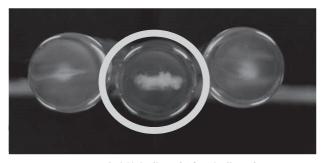


図2. 試験管凝集反応法の凝集反応 (Nima、H抗原y)

Nimaの牛に対する病原性状解析

1. 細胞内侵入性試験

本事例では、多数の牛に発熱、泌乳量激減、泥状下痢などの臨床症状が強く発現しており、Nimaの牛への病原性が強いことが示唆された。そこで、Nimaの病原性を評価するため、釧路管内(管内)で分離された菌株を中心に数種のサルモネラを試験対照株として設定し、2種類の培養細胞への細胞内侵入性について試験、比較した。

(1) 材料および方法

試験対照株と試験に使用した培養細胞には、サルモネラ組織内侵入経路の一つとして腸管上皮細胞等が報告[2]されていることから、ヒト結腸由来細胞と牛に対する病原性を評価するために牛腎由来細胞の2種類を使用した(表2)。

試験対照株として、ヒト結腸由来細胞への細胞侵入性 試験には、多くの哺乳類に病原性を示す Typhimurium の高病原性株(U1株)と低病原性株(LT2株)、哺乳 類への病原性は低いとされている S. bongori を使用した。 牛腎由来細胞への細胞侵入性試験には、牛への病原性が あるサルモネラとして、管内で分離された Typhimurium (4:i:-)、Dublin、Tennessee および牛への病原性 がない株として、S. Abortusequi(Abortusequi)を使 用し、Nimaと比較検討した(表 2)。

試験方法は、抗生物質無添加ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM:日水製薬)で10°個/m/に調整した培養細胞を24穴マイクロプレート(平底)に100 μ/接種し、37℃5%炭酸ガス条件化で1時間静置培養を行った。上清を除去後、PBSを各ウェルへ100 μ/分注し、37℃18時間LB培地(自作)で培養した各試験対照株の菌液を10μ/ずつ接種した後、37℃5%炭酸ガス条件化で1時間培養して菌を感作させた。感作後PBSで2回洗浄し、100 mg/lのゲンタマイシンを含むDMEMにより1時間

表 2. 細胞内侵入性の結果

	Nima	$\begin{array}{c} \text{Typhimurium} \\ (\text{U1}) \end{array}$	Typhimurium (LT2)	S. bongori
ヒト結腸 由来細胞	0.03	0. 01	0.02	0. 03

	Nima	Typhimurium $(4:i:-)$	Dublin	Tennessee	Abortusequi
牛腎由来 細胞	9. 67	5. 58	3. 42	3. 67	0.74

侵入率 (%)

4 (212)

感作を実施した。さらに、PBSで2回洗浄後に1%トライトンX添加PBS $100 \mu l$ を分注して細胞を破壊し、培養細胞内の菌数を測定した。

細胞内への侵入率は、培養細胞内菌数/細胞接種時菌数×100=侵入率(%)として算出した。

(2) 結果

細胞内への侵入率はNimaでは、ヒト結腸由来細胞で0.03%、牛腎由来細胞で9.67%であった。各種細胞における、各試験対照株間で侵入率に有意差は認められなかった(Kruskal-Wallis検定)(表 2)。

2. 環境中の生存性試験

畜舎の消毒、また、同居牛検査の実施間隔など、今後の防疫対策の一助とするため、環境中のNimaの生存性について、他の血清型と比較検討した。

(1) 材料および方法

サルモネラの汚染が特に懸念されるサイレージ、水、 堆肥を環境材料とし、試験菌は、Nima、管内で分離されたTyphimurium(4:i:-)およびTennesseeを使用した。滅菌ストマック袋に入れた材料にLB培地で一晩培養した試験菌液を、環境材料と菌液が9:1となるよう接種した。菌液を接種した環境材料は4 \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{C} \mathbb{C} の条件下におき、材料中の菌数を、菌液接種後 $1\sim60$ 日まで経時的に測定した。

(2) 結果

Nima において、4 ℃条件では、各材料とも緩やかに 菌数が減少し、接種後60日では $10^5 \sim 10^6$ CFU/g程度で あった。20 ℃条件では、サイレージと水において、接種 後60日では 10^7 CFU/g以上、堆肥において、接種後21日 までは 10^6 CFU/g程度、60日で検出限界以下まで減少し た(図 3)。

NimaとTyphimurium (4:i:-) における菌数を 比較したところ、各温度条件および各材料共にNimaと 同様の推移を確認した(図4)。

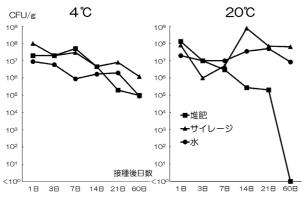


図3. Nimaの環境中での経時的菌数推移

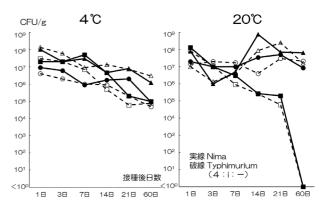


図 4. NimaとTyphimurium (4:i:-) の環境中での 経時的菌数推移

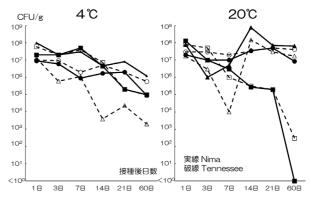


図 5. Nima と Tennessee の環境中での経時的菌数推移

Nima と Tennessee との菌数比較では、4 ℃条件のサイレージにおいて Tennessee が低値で推移する傾向が見られたが、その他の条件および材料では同様に推移した(図 5)。

考 察

本事例は、国内の牛飼養農場において初報告となる Nimaによる牛サルモネラ症の発生であった。Nimaは、 海外において小児や爬虫類からの分離報告[3]があるが、 当該農場では、海外からの牛の導入歴や、農場関係者に 海外渡航歴はなく、爬虫類などの飼養もない。野生動物 からの感染は考えられるものの、侵入経路の特定には至 らなかった。

本事例では、分離株が国内市販O血清でO抗原型別不能であったことから、H血清による試験管凝集反応法で同居牛検査に対応した。また、マイクロプレートを活用したH抗原決定法[1]を改変し、Nimaでも応用可能か検討し、改変したマイクロプレートを活用した方法は試験管凝集反応法と同様にH抗原を決定できることを確認した。このことから、今回と同様にO抗原型別不能、もしくは判明したO血清が用意できるまでの間、資材や状況に応じH血清による試験管凝集反応法またはマイクロ

プレートを活用した方法で清浄性確認検査が対応可能で あることが示唆された。

性状解析では、細胞内侵入性試験結果より、Nimaは細胞内に侵入することを確認し、各試験対照株と同様の侵入率であった。他の血清型間で有意差は認められなかったことから、Nimaの病原性の評価には至らなかった。

サルモネラのマウスへの感染実験では、サルモネラの感染により炎症性サイトカインが発現し、腸管内への好中球浸潤が促進され、好中球の活性酸素が腸管組織を障害し、下痢を誘発されることが報告[2]されている。また、ヒト結腸上皮細胞へのTyphimuriumおよびDublinの感染実験では、好中球に作用する多くのサイトカインのmRNAを増加させることが報告[4]されており、細胞内侵入性のみならず、侵入後のサイトカインの誘導がサルモネラの病原性因子の一つである考えられている。さらに、サルモネラには、侵入細胞内の生存性に関わる遺伝子や補体抵抗性に関わる遺伝子などがある[5]ことから、サルモネラの病原性については、様々な要因を複合的に評価する必要がある。

環境中の生存性試験ではNimaはTyphimurium(4:i:-)およびTennesseeと同等の菌数の推移を示したことから、Nimaの生存性は他の血清型と同等であると推察された。この結果と、本事例における対策が、2 カ 月で終了していることを合わせて考えると、清掃・消毒

や定期的な2週間おきの同居牛検査間隔など、Nimaも 他の血清型と同様の防疫対策が有効であると考えられた。

稿を終えるにあたり、資料の提供などご協力頂きました北海道ひがし農業共済組合 竹内靖志先生をはじめ、 関係者に深謝いたします。

引用文献

- [1] 富永 潔:マイクロプレートを用いたSalmonella のH抗原検査の方法の検討、山口獣医誌、30、69-74 (2003)
- [2] Broz P, Ohlson M B, Monack D M: Innate immune response to Salmonella typhimurium, a model enteric pathogen, Gut Microbes, 3, 62-70 (2012)
- [3] Centers for Disease Control and Prevention: Reptile-associated Salmonellosis Selected States, 1998-2002, Morb Mortal Wkly Rep, 52, 1206-1209 (2003)
- [4] 水野由美: サルモネラ感染症に対する初期感染防御機構、日臨免誌、27、367-372 (2004)
- [5] Mokracka J, Krzyminska S, Danil Altunin D, Wasyl D, Koczura R, Dudek K, Dudek M, Chylenska ZA, Ekner-Grzyb A: In vitro virulence characteristics of rare serovars of Salmonella enterica isolated from sand lizards (Lacertaagilis L), Antonie van Leeuwenhoek, 111, 1863-1870 (2018)