

食肉衛生検査で摘発された豚からの抗酸菌分離

家畜衛生試験場 ○太野垣 陽一
 中央家畜保健衛生所 下地 秀作
 北部家畜保健衛生所 高木 和香子

平成 16 年 11 月に「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」が施行され、平成 23 年 4 月には水質汚濁防止法の上乗せ排水基準が強化される等、畜産業にとっても環境対策は欠かせないものとなっている。

一方、沖縄県では粒状～粉状のおが屑(以下「オガコ」)の保水性や悪臭吸着能に着目し、かねてからセルフクリーニング式オガコ養豚の実証試験を行う等、養豚環境対策にオガコの利用を推奨しているが、供給価格の他、豚抗酸菌症の懸念もオガコ利用の妨げ要因の 1 つとなっている。

県内では年間約 30 万頭の豚がと畜されるが、抗酸菌症による廃棄豚が 1 万頭を超えた時期があり、その際には疫学的に感染源と疑われたオガコの使用中止により鎮静化した。依然として年間約 2 千数百頭の豚が抗酸菌症で摘発されており、その内訳はオガコを使っていない農場からの摘発が多いことから、別の感染源があることが示唆されている(図 1)。

背景①

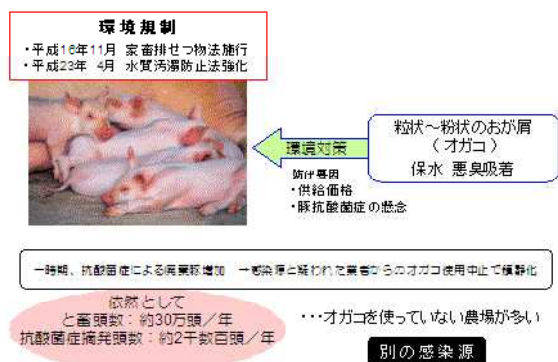


図 1. 背景①

抗酸菌すなわち *Mycobacterium* 属菌は、1986 年の Bergey's Manual of Systematic Bacteriology では 54 菌種に分類されており、また、分類学上確立したものではないが、2006 年の National Center for Biotechnology Information では約 150 菌種が登録されている。

これらは、結核菌に代表される結核菌群と非結核性抗酸菌に分けられるが、非結核性抗酸菌のうち、

M. avium と *M. intracellulare* から構成され *M. avium* complex (MAC) と呼ばれる一群は、ヒト、鳥類及び豚の非結核性抗酸菌症の主要な原因菌であり、自然環境に広く分布している。

豚の抗酸菌症はオガズ、昆虫、ミミズ等から主に経口感染すると考えられているが、ほとんどの豚が臨床症状を示さないため食肉検査時に発見されることが多く、リンパ節に結核様結節病変が形成されたものは部分廃棄に、まれではあるが肝、脾、肺など多臓器に病変が形成されたものは全部廃棄となり、養豚業者に経済的損失を与える。

また、抗酸菌に対して有効な消毒薬はあるが、生体内ではマクロファージに潜むため抗生剤が効きにくく、家畜の治療は不適であり、感染防御と感染豚の淘汰、消毒が防疫対策の基本となる。

しかし、抗酸菌の大半が培養に数週間から数ヶ月を要するうえ、従来の検査法は高度な機器や高額な試薬が必要であることなどから、感染源の特定など疫学調査の支障となっている。

そのため、豚抗酸菌症の疫学解明の糸口として、効率的な抗酸菌分離・同定方法の検討と原因菌の確認を試みた(図 2)。

背景②と目的

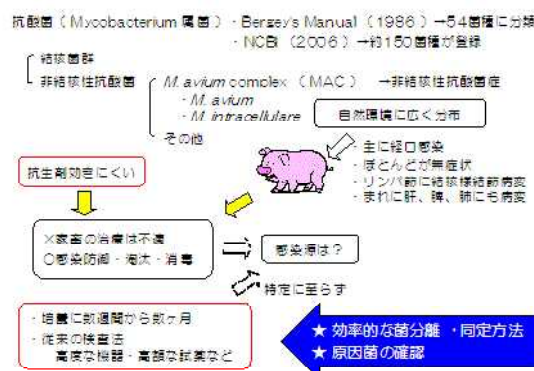


図 2. 背景②と目的

【材料】

平成 22 年 3 月から 23 年 3 月までは本島南部の沖縄県食肉センターに出荷された豚、平成 23 年 4 月から 23 年 10 月までは本島北部の名護食肉センターに出荷された豚で、オガコ使用の有無にかかわらず、抗酸菌症として摘発された豚の腸間膜リンパ節を、食肉衛生検査所から月に 1～2 回、家畜保健衛生所を通じて提供してもらったが、うち 1 頭は臓器も含まれているため、計 17 農場、24 頭、32 検体を検査に供した(図 3)。



図 3. 材料

【方法】

(1) 切り出し～前処理

- ①菌分離率を上げるため、1 検体につき 2 箇所ずつ乾酪結節とその周辺部位を切り出し、
- ②従来使用されている乳鉢、ガラス製ホモジナイザー、バグミキサー等に代えて、フィンガーマッシャー(アシスト社)という内壁がギザギザになっている柔らかいシリコンチューブを用いて乳剤化。
- ③チール・ネールゼン法により乳剤を抗酸菌染色し、
- ④抗酸菌数をガフキー号数に当てはめて記録し、併せて雑菌の有無を確認。
- ⑤抗酸菌以外の細菌や真菌を殺菌し、試料を均質化するため、国立感染症研究所『病原体検出マニュアル』記載の喀痰の前処理に準じて乳剤を N-アセチル-L-システイン-水酸化ナトリウム処理法(以下「NALC-NaOH 法」)により乳剤をアルカリ処理して集菌試料を作成(図 4)。

方法(切り出し～前処理)



図 4. 方法 (切り出し～前処理)

(2) 培養法

- ⑥固形培地は前処理に NALC-NaOH 法を用いるため、リン酸二水素カリウムが 2%、かつ非結核性抗酸菌の発育性能が強化された日水製薬の 2%小川 PS 培地(以下「小川培地」)を用いて集菌試料を 0.1ml 接種し、液体培地は、丸底試験管底部に蛍光性の酸素センサー物質が包埋され、菌の増殖に伴い培地中の溶解酸素量が低下してくると波長 365nm の紫外線の照射により蛍光が観察される MGIT 培地(BBL 社。以下「MGIT」)に集菌試料を 0.5ml 接種して、いずれも 37℃で培養し、週 1～2 回、6 ヶ月間観察した。
- ⑦菌増殖がみられた培地は抗酸菌染色し、
- ⑧小川培地上の抗酸菌単離コロニーは再び小川培地を用いてクローニングし、
- ⑨抗酸菌のみ見られる MGIT は、その 0.1ml を小川培地に接種、雑菌がみられた MGIT 培地はその 0.6ml を再び前処理・培養という操作を繰り返して単離コロニーを純培養し、得られた菌株を菌種同定に用いた(図 5)。

方法(培養)

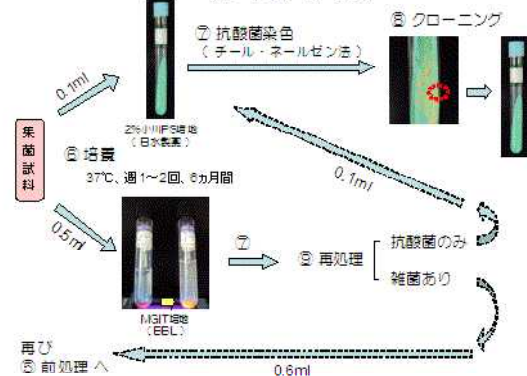


図 5. 方法 (培養)

(3) 抗酸菌の同定法

抗酸菌の同定法には図 6 に示したような方法があるが、生化学的試験法は再培養を要し、試薬が高額であり、免疫クロマトグラフィー法、脂肪酸分析法、塩基配列決定法は、ともに高度な機器を要する。これらに対し、核酸同定法(PCR)は検査系により対象に限られる反面、広く普及しているサーマルサイクラーで実施可能なことから、分離菌の発育過程のコロニー性状と選別した核酸同定法を組み合わせた同定を試みた。

⑩クローニングした菌株は発育速度、色、形態等のコロニー性状を記録し、

⑪ BIO-RAD 社の InstaGene Matrix を用いて DNA を抽出

⑫ *Mycobacterium* 属特異的 PCR により抗酸菌であることを確認し、

⑬ その産物を用いて主な抗酸菌 34 種が型別できる PCR-RFLP、

⑭⑮ 抗酸菌症の主要原因菌である *M. avium* と *M. intracellulare* については種特異的 PCR を、

⑯ 更に、*M. avium* については亜種型別の PCR を行った(図 6)。

方法(抗酸菌の同定)

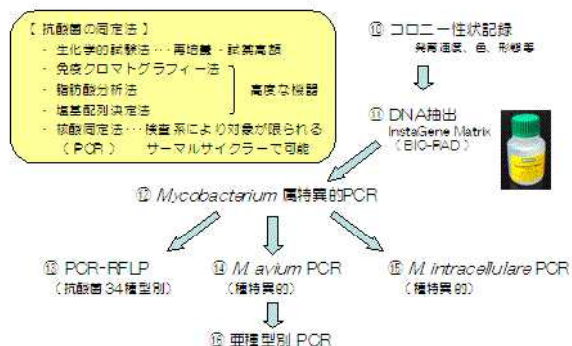


図 6. 方法 (抗酸菌の同定)

⑫⑬ *Mycobacterium* 属特異的 PCR は heat shock protein 65 遺伝子を標的とし、その 439bp の PCR 産物を制限酵素 BstE II で切断してできるフラグメントパターンと、制限酵素 Hae III で切断してできるフラグメントパターンの組み合わせにより抗酸菌 34 種が型別できるもので、図 7 に示した文献により行った(図 7)。

方法(各PCRの説明①)

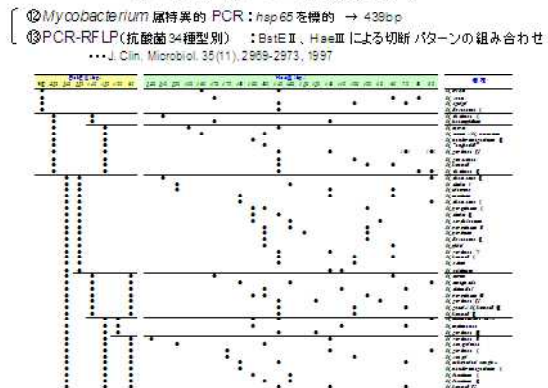


図 7. 方法 (各 PCR の説明①)

⑭ *M. avium* 種特異 PCR は 16S rDNA を標的としたものを用いた。

⑮ この *M. avium* は 4 つの亜種に分類されているが、表に示したとおり IS900、901、902 及び 1245 の保有により型別できるとされている。

⑯ また *M. intracellulare* 種特異 PCR は IS901 を標的にしたものを、それぞれ図 8 に示した文献により行った(図 8)。

方法(各PCRの説明②)

⑭ *M. avium* 種特異 PCR : 16S rDNA を標的
...Moll. Cell. Probes 14(3), 153-161, 2000

⑮ *M. avium* 亜種型別 ...野生菌定マニユアル3版

菌株	IS900	IS901	IS902	IS1245
<i>avium</i>	+	+	-	+
<i>hominissuis</i>	-	-	-	+
<i>cosmopolitanus</i>	+	+	-	+
<i>silvaticum</i>	-	-	+	+

IS900 ...Vet. Microbiol. 35, 289-299, 1993
IS901 ...Moll. Cell. Probes, 14(3), 153-161, 2000
IS902 ...Gut. 33, 1209-1213, 1992
IS1245 ...Moll. Cell. Probes, 13(2), 115-125, 1999

⑯ *M. intracellulare* 種特異 PCR : IS901 を標的
...J. Clin. Microbiol. 33(8), 2102-2106, 1995

図 8. 方法 (各 PCR の説明②)

【成績】

抗酸菌が分離できたものは、24 頭 32 検体中、13 頭 20 検体で、図 9 では観察されたコロニーの色に近い色で示した。

また、乳剤または培養中に雑菌がみられたが、前処理により雑菌の発育を抑制し抗酸菌が分離できたものが 5 検体、特異的 PCR により *M. avium* 亜種 *avium* と同定されたものが 12 検体、亜種 *hominissuis* と同定されたものが 1 検体、

M. intracellulare はなく、PCR-RFLP により *M. flavescens* と思われるものが 1 検体、

*M. kansasii*と思われるものが2検体、*M. phlei*と思われるものが1検体、該当なしが4検体4種類であった。

菌種同定は、後日シーケンスにより確認する予定だが、以上の成績から少なくとも性状や塩基配列の異なる9種類が識別された(図9)。

抗酸菌分離成績一覧

検体	性状	菌種	検査	検出	コロニー	菌種
H22-3	肉片	豚	培養	+	0	陰性
H22-4	肉片	豚	培養	-	0	陰性
H22-5	肉片	豚	培養	+	1	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H22-6	肉片	豚	培養	-	0	陰性
H22-7	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H22-8	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>Mycobacterium</i> sp.
H22-9	肉片	豚	培養	-	0	黄色 <i>M. phlei</i>
H22-10	肉片	豚	培養	+	1	黄色 <i>Mycobacterium</i> sp.
H22-11	肉片	豚	培養	-	0	陰性
H22-12	肉片	豚	培養	-	1	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H23-1	肉片	豚	培養	-	0	陰性
H23-2	肉片	豚	培養	-	0	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H23-3	肉片	豚	培養	+	1	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H23-4	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>M. kansasii</i>
H23-4	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>M. kansasii</i>
H23-5	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>Mycobacterium</i> sp.
H23-6	肉片	豚	培養	+	2	黄色 <i>Mycobacterium</i> sp.
H23-7	肉片	豚	培養	+	2	黄色 <i>Mycobacterium</i> sp.
H23-8	肉片	豚	培養	+	1	黄色 <i>Mycobacterium</i> sp.
H23-9	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H23-10	肉片	豚	培養	+	5	黄色 <i>M. phlei</i>
H23-11	肉片	豚	培養	+	1	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>
H23-12	肉片	豚	培養	+	1	黄色 <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>

図9. 抗酸菌分離成績一覧

【まとめ】

検体の乳剤化に使用したフィンガーマッシャーは、従来使用されている方法に比べ、検体を密閉して処理できるため、試料の飛散や移し替えが必要なく、安全かつ効率的な処理が可能であった。

NALC-NaOH 処理と2%小川 PS 培地及び MGIT 培地の組み合わせは、雑菌が優勢に発育している検体や培地からの抗酸菌分離に有効であった。

コロニー性状、PCR 及び PCR-RFLP の組み合わせは、特別な器具・器材を必要とせず、分離抗酸菌を比較的迅速、低コストかつ簡便に識別できた。

また、抗酸菌症として摘発された豚から複数種の抗酸菌が確認されたことにより、感染源が複数存在することが示唆されたが、今回試みた方法は環境材料からの抗酸菌分離に応用可能であり、豚抗酸菌症の疫学解明の一助になると考えられた(図10)。

まとめ

- ★フィンガーマッシャー
→検体の乳剤化が安全・効率的
- ★NALC-NaOH処理 + 2%小川PS培地 + MGIT
→雑菌混入検体・培地からの抗酸菌分離に有効
- ★コロニー性状 + PCR + PCR-RFLP
→分離抗酸菌を比較的迅速・低コスト・簡便に識別可能

環境材料からの抗酸菌分離・識別に適用可能

- ★抗酸菌症の摘発豚から複数種の抗酸菌
→感染源が複数存在

図10. まとめ