

7 管内養豚場における母豚の豚熱免疫付与状況の解析

西部家畜保健衛生所
○竹内 優里、柴田 昌利

要 約

豚熱ワクチン（以下、ワクチン）接種適期推定には母豚群の免疫状況の把握が必要となる。そこで、免疫付与状況調査のデータを用い、管内母豚群の抗体価の推移について解析することで、今後の母豚群の抗体価分布を予測し、子豚の豚熱感染リスク低減に向けた接種方法を検討した。解析では、第2回免疫付与状況調査と、その1年後、2年後である第4回調査・第6回調査について、それぞれ母豚の世代割合、平均S/P値、S/P値のばらつき、及び抗体価の分布を求め、管内全体、同世代内、導入元別の母豚群で比較した。その結果、調査回ごとに母豚群の平均S/P値の低下、S/P値のばらつきの増加が見られ、抗体価の分布は、回次が進んでも収束しなかった。このことから、今後、第二世代以降の母豚がさらに増えても、当面の間は母豚の抗体価の分布が収束しないことが予測され、現時点では、ワクチン2回接種を検討していくことが適当だと考えられた。

はじめに

静岡県で豚熱ワクチン（以下、ワクチン）の予防的接種が開始され約3年が経過した。当所では2022年10月までに6回の豚熱免疫付与状況調査を実施してきたが、直近2回は7割以上の静岡県西部管内の農家で肥育豚の抗体陽性率が80%未満になっている。これは、ワクチンを接種しても抗体価が上昇していない豚が多い可能性を示しているが、この要因として、初回ワクチン接種時の移行抗体の有無で区別した「第一世代」「第二世代」の母豚が混在し農場内で抗体価の分布が大きくばらついている現状において、やむを得ず子豚へのワクチン接種時期を、一定時期に決定していることがあげられる。このような農場では、ワクチン接種前の免疫空白期間や接種後のワクチンブレイクによって、免疫を獲得していない、感染リスクの高い豚が多く存在していると考えられる。

一方、母豚の世代交代が進むと、抗体価の高い第一世代の豚が淘汰され、抗体価の低い第二世代以降の豚が増加すると推測される。これにより、抗体価の分布が収束し、ワクチン接種適期の判定が明確になり、1回のワクチン接種で効率よく免疫付与できるようになるため、ワクチン接種前後の豚熱感染リスクは低くなると想定される。

そこで、第6回免疫付与状況調査までのデータを用い、管内母豚群の抗体価の推移につ

いて解析することにより、今後の抗体価分布を予測し、子豚の豚熱感染リスク低減に向けたワクチン接種方法について検討した。

材料と方法

1) 調査データ

解析には、2019年11月の県内ワクチン一斉接種から6か月経過した第2回調査と、その1年後、2年後である第4回調査、第6回調査の、31農場延べ1,662頭のデータを使用した。

第1回は県内ワクチン一斉接種から1か月程度しか経過しておらず、抗体が上昇する途中である可能性があったため、除外した。また、第2回からの推移を把握しやすくするため、第2回から半年後、1年半後の第3回、第5回を除外した。

2) 調査項目

a. 母豚の世代割合

母豚の世代については農林水産省の分類[1]と同様にした。すなわち、初回ワクチン接種以前に生まれた母豚を第一世代、初回ワクチン接種から30日以上経過してから生まれた母豚を第二世代と分類した。

b. 平均S/P値

ELISA検査のS/P値から算出した。

c. S/P値のばらつき

S/P値の標準偏差を平均値で除して求めた変動係数をS/P値のばらつきとした。

d. 抗体価の分布

S/P 値を本県で作成した推定式[2]により中和抗体価に換算し、その抗体価ごとの度数割合についてグラフ化した。ここで、抗体価が 16 倍以下の豚では豚熱の発症防御がされない[3]ため、抗体価 32 倍未満の豚を低抗体価豚とした。

3) 解析内容

各調査項目について、管内全体の母豚群を調査回次間で比較した。次に、この結果の要因について推定するため、母豚世代、および母豚導入元ごとで、それぞれ同様に調査回次間で比較した。

4) 統計解析

統計解析は HAD17_206[4]及び JUST Calc を用いて行った。

成績

1) 管内全体の母豚群の推移の解析

a. 母豚の世代割合

第二世代以降の豚は第 4 回では 21%、第 6 回では 62%と調査回ごとに増加しており、第 6 回*では、全体と比較して有意に多かった ($p < 0.01$, χ^2 検定) (図 1)。

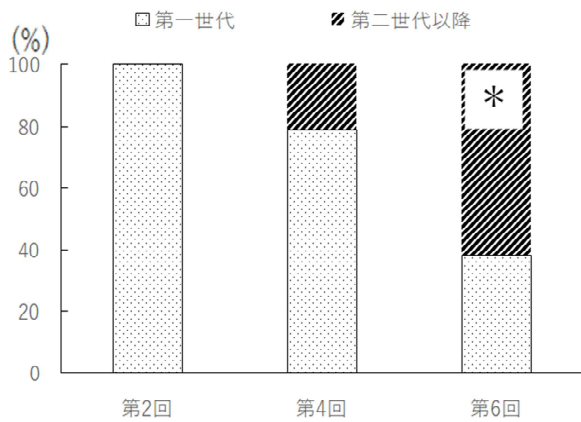


図 1 母豚の世代割合

b. 平均 S/P 値

調査回ごとに、平均 S/P 値は低下していた ($p < 0.01$, Holm による多重比較) (図 2)。

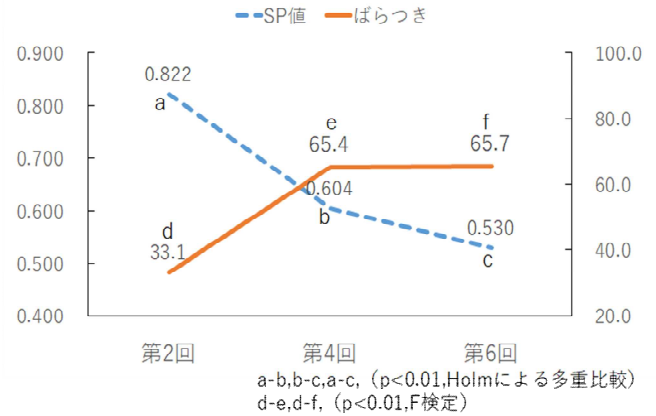


図 2 管内全体の母豚群の平均 S/P 値及び S/P 値のばらつき

c. S/P 値のばらつき

S/P 値のばらつきは、第 2 回から第 4 回にかけては増加し、第 4 回から第 6 回にかけては、ほぼ横ばいで推移した ($p < 0.01$, F 検定) (図 2)。

d. 抗体価の分布

抗体価 32 倍以上の高抗体価豚の割合は、第 2 回: 92%、第 4 回: 67%、第 6 回: 60%と調査回ごとに減少し、逆に、抗体価 32 倍未満の低抗体価豚は、第 2 回: 8%、第 4 回: 33%、第 6 回: 40%と増加していた。一方、第 4 回と第 6 回のみを比較すると、第 4 回から第 6 回にかけて回次が進んでも、抗体価の分布に変化はほとんどなく、分布の収束は見られなかった (図 3)。

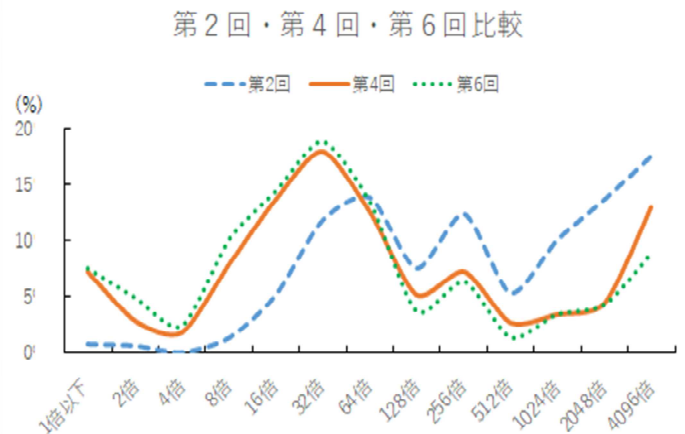


図 3 管内全体の母豚群の抗体価の分布

2) 世代ごとの母豚群の推移の解析

a. 平均 S/P 値

第一世代では、第 2 回と第 4 回及び第 2 回と第 6 回の間で、平均 S/P 値が低下していた。第二世代では、第 4 回、第 6 回とも

に、第一世代に比べて平均 S/P 値が低く、第 4 回から第 6 回にかけて、顕著な変化は見られなかった ($p < 0.01$ 、Holm による多重比較) (図 4)。

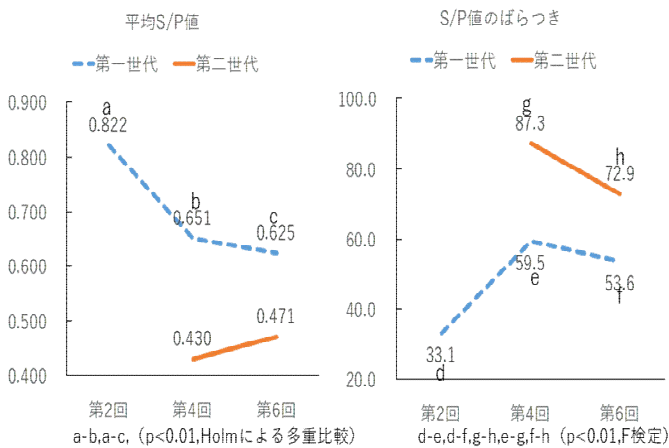


図 4 世代ごとの母豚群の平均 S/P 値及び S/P 値のばらつき

b. S/P 値のばらつき

第一世代の S/P 値のばらつきは第 2 回から第 4 回にかけては増加し、第 4 回から第 6 回にかけては顕著な変化は見られなかった。第二世代は、第 4 回から第 6 回にかけて低下していたが、第 4 回、第 6 回ともに第一世代に比べて S/P 値のばらつきが大きかった ($p < 0.01$ 、F 検定) (図 4)。

c. 抗体価の分布

第一世代の抗体価分布では、第 2 回から第 4 回にかけて、抗体価 32 倍以上の高抗体価豚の割合が 92% から 71% に減り、抗体価 32 倍未満の低抗体価豚は 8% から 29% に増加していた。第 4 回と第 6 回では、顕著な変化は見られなかった。第二世代の抗体価分布では、3 回の検査に渡り第一世代に比べて顕著な変化は見られなかった (図 5)。

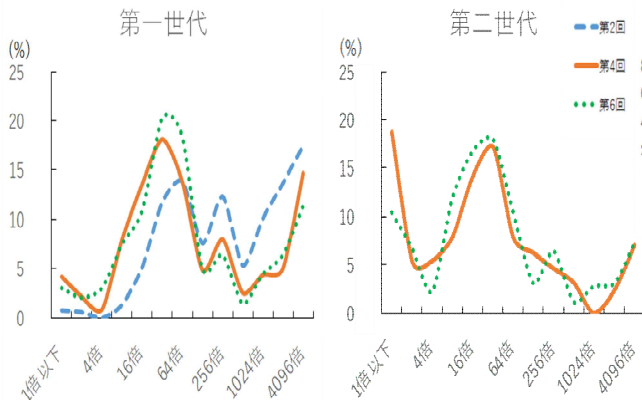


図 5 世代ごとの母豚群の抗体価の分布

3) 導入元別の母豚群の推移の解析

a. 母豚の導入元

県内からの導入 (42%) が最も多く、次いで自家生産 (29%)、県外 (接種地域)、県外 (後発接種地域) の順であった。

b. 平均 S/P 値

母豚の導入元がどの区分でも、平均 S/P 値は第 2 回と第 6 回の間で低下した ($p < 0.01$ 、Holm による多重比較) (図 6)。

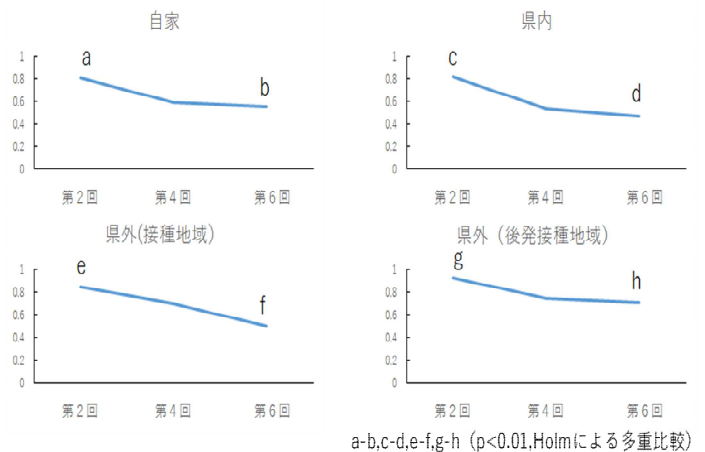


図 6 導入元別の母豚群の平均 S/P 値

c. S/P 値のばらつき

母豚の導入元が県内の母豚において、第 2 回と第 4 回及び第 2 回と第 6 回の間で、S/P 値のばらつきが増加していた。他の導入元区分においては、第 2 回から第 6 回にかけて S/P 値のばらつきに変化はなかった ($p < 0.01$ 、F 検定) (図 7)。

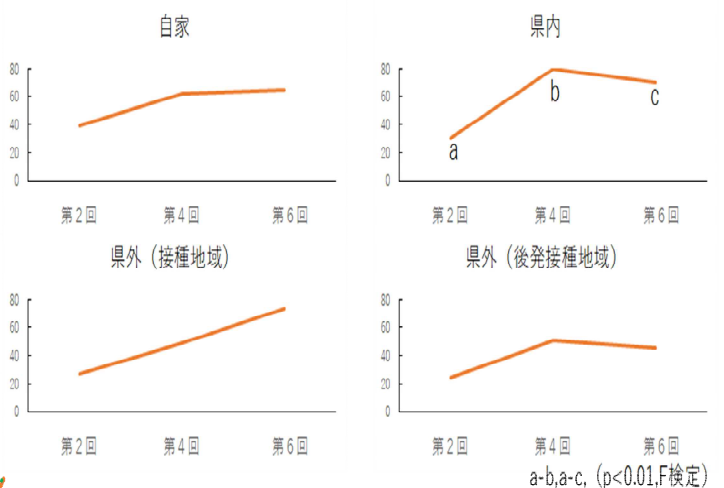


図 7 導入元別の母豚群の S/P 値のばらつき

d. 抗体価の分布

母豚の導入元による、抗体価の分布には一定の傾向は見られなかった。

考 察

母豚の世代割合の推移を見ると、第二世代は第4回から出現し、第6回ではその割合が増加していた。このことから、母豚の抗体価分布は低い方向へ収束し、ばらつきは収まっていくと想定された。

しかし、今回の解析では、管内全体における第4回から第6回にかけての抗体価の分布には顕著な変化がなく、S/P値のばらつきの収束傾向が見られなかった。

この要因について解析するため、世代ごと及び母豚の導入元による比較を行った。

世代ごとの比較において、第一世代では、管内全体と同様に、抗体価の分布に顕著な変化や収束傾向が見られなかった。

第二世代では、S/P値のばらつきの収束傾向が見られたが、S/P値のばらつきは第一世代に比べて大きかった。これは、第一世代で第2回と第4回及び第6回の間で平均S/P値の低下やS/P値のばらつきの増加が起きていたことから、第一世代の母豚の平均S/P値の低下には個体差があり、第一世代の子である第二世代には、出生時から大きなS/P値のばらつきがあったためと考えられた。

導入元による比較では、平均S/P値やS/P値のばらつき及び抗体価の分布に導入元地域やワクチン接種状況との関連は認められなかった。

以上から、第二世代以降の豚のS/P値のばらつきが想定よりも大きく、管内全体で第二世代の割合が増加した第4回、第6回で抗体価の分布に顕著な変化とS/P値のばらつきの収束傾向が見られなかったと考えられた。このことから、今後、第二世代以降の母豚が増えても、当面の間は母豚の抗体価の分布が収束しないことが予測された。

以上に述べた今後の母豚抗体価分布の推移の予測から、子豚の豚熱感染リスクを減らすためのワクチン接種方法を検討すると、子豚へのワクチンの2回接種が考えられる。

子豚へのワクチンの2回接種は、ワクチン接種前後の免疫空白期間の短縮が期待で

きる。

感染リスクを減らすためには、引き続き農場ごとの母豚の抗体価推移を把握するとともに、子豚のワクチン接種適期推定の際に、世代間での子豚の接種適齢期の差異や免疫付与状況を考慮しつつ、子豚へのワクチン2回接種の実施とその効果について検証していくことが適当だと考えられた。

参考文献

- [1] 農林水産省 食料・農業・農村政策審議会 第88回牛豚等疾病小委員会：資料1-1 飼養豚等への豚熱ワクチン接種後の免疫付与状況, 1 (2022.7.11), (<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/#usibuta>)
- [2] 西島典子：第63回静岡県家畜保健衛生業績発表会集録, 40-43, (2021)
- [3] 農林水産省 食料・農業・農村政策審議会 第88回牛豚等疾病小委員会：資料1-2 接種適齢期確認のための調査について, 1-2 (2022.7.11), (<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/#usibuta>)
- [4] 清水祐士：フリーの統計分析ソフトHAD：機能の紹介と統計学習・教育, 研究実践における利用方法の提案, 1, 59-73, (2016)

8 D型インフルエンザウイルスが関与した乳牛の病性鑑定事例

中部家畜保健衛生所
○西島 典子

要 約

D型インフルエンザウイルス(IDV)は牛呼吸器病への関与が示唆されているウイルスで、国内では2016年に初めて検出された。国内に広く浸潤していると報告されているが、IDVが関与した牛呼吸器病の事例報告は少なく、未だ不明な点が多い。2022年3月、県内の一酪農場にて1~2ヶ月齢の子牛で発咳、鼻汁漏出、発熱及び元気消失を示す個体が散見されたため、発症牛及び同居牛各5頭、計10頭の鼻腔スワブ及び前後血清を用いて病性鑑定を実施した。全てのプール検体からIDV特異遺伝子が検出され、同居牛1頭からIDVが分離された。発症牛5頭中3頭でIDV抗体の有意な上昇が認められたことから、本事例の呼吸器病発生にIDVが関与したと考えられた。また、IDVの抗体検査は一般的にHI試験により実施するが、専用の試薬が必要であり手技も煩雑であるため、牛呼吸器病発生時に実施している中和試験での代替を検討した。各試験の判定結果は全て一致し、各試験の抗体価には強い正の相関が認められた。IDVの抗体検査は中和試験で代替可能であり、牛呼吸器病発生時に行う検査項目に容易に組み込むことができ、検査の省力化が可能だと考えられた。

はじめに

D型インフルエンザウイルス(IDV)は、2011年に米国で呼吸器症状を呈した豚からC型インフルエンザウイルス(ICV)と類似したウイルスとして初めて分離された[1]。その後の調査により、ICVとはウイルス内部蛋白質の抗原性が異なることが判明したため[2]、2016年に国際ウイルス分類委員会(ICTV)により、正式に「D型インフルエンザウイルス」として分類された。IDV抗体陽性率は豚よりも牛で有意に高く、主に牛の間で流行していると考えられている[2]。また、健常牛よりも呼吸器症状を呈した牛からのIDV特異遺伝子の検出率が有意に高く、牛呼吸器病への関与が示唆されている[3, 4]。

国内では、2016年に呼吸器症状を呈した牛から初めてIDV特異遺伝子が検出された[5]。飼養牛の抗体保有状況調査により、IDVは国内に広く浸潤していると考えられているが[6]、IDVが関与した牛呼吸器病の事例報告は少なく、未だ不明な点が多い。今回、県内の一酪農場においてIDVが主体的に関与した牛呼吸器病が発生し、県内で初めてIDVが分離されたため、概要を報告する。

また、IDVの抗体検査は一般的にHI試験により実施される[5, 6]が、血清の前処理に専用

の試薬が必要であり、手技も非常に煩雑である。当所では、牛の急性呼吸器病発生時に、呼吸器病関連ウイルスについて前後血清の中和抗体価を確認している。他のウイルスと同様に、IDVの抗体検査を中和試験により実施することで作業効率の向上を図るため、HI試験と中和試験の結果を比較した。

材料と方法

1) 農場概要及び発生概要

発生農場は成牛377頭、育成牛25頭、子牛46頭を飼養する酪農場で、成牛はフリーバーン、子牛は1ヶ月齢程度まではカーフハッチ、以降は月齢ごとに3つの牛房に分けて群飼していた。外部から牛の導入は行っておらず、県内公共育成牧場及び北海道に子牛を預託していた。ワクチン接種は呼吸器5種混合ワクチン及び呼吸器6種混合ワクチンを預託場で接種しており、その他のワクチンについては未接種だった。

2022年3月30日から哺乳牛舎牛房1の1~2ヶ月齢の子牛で発咳、鼻汁漏出、発熱、元気消失を示す個体が散見された。抗生剤及び抗炎症剤による治療を行ったが改善されず、哺乳牛舎内全ての牛房に症状が拡大したことから、同年4月4日に病性鑑定を実施した。

農場立入時、哺乳牛舎はやや過密状態であり、特に収容頭数が多かった牛房1で元気消失を示す個体が多く認められた。

2) 病性鑑定事例

臨床症状が認められた牛及び無症状の同居牛各5頭、計10頭から鼻腔スワブ及び前後血清を採材し、ウイルス学的検査及び細菌学的検査を実施した(表1)。

表1 検体詳細

No.	日齢	症状	牛房
1	53	鼻汁、元気消失	1
2	53	発熱	
3	47	発熱	
4	46	元気消失	
5	41	—	
6	29	—	2
7	31	—	
8	26	—	
9	56	—	3
10	34	発熱、元気消失	

a. ウイルス学的検査

a) 遺伝子検査

鼻腔スワブ乳剤を牛房ごとにNo.1~5、No.6~8、No.9、10の3検体にプールし、牛RSウイルス(BRSV)、牛パラインフルエンザウイルス3型(BPIV3)、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)、牛コロナウイルス(BCV)、牛伝染性鼻気管炎ウイルス(IBRV)、牛アデノウイルス、IDVについて遺伝子検査を実施した[7-11]。

b) ウイルス分離検査

No.1~6及びNo.8の鼻腔スワブ乳剤をMDBK-SY細胞、Vero細胞、HRT-18G細胞に接種し、7日間間隔で継代した。3代目培養上清について上記2)のa)と同様の遺伝子検査を実施した。MDBK-SY細胞及びVero細胞の維持培地には5%牛胎子血清、HRT-18G細胞の維持培地には0.5µg/mlトリプシンを添加した。なお、No.7、9、10については、鼻腔スワブ乳剤の液量が少なかったため、ウイルス分離検査を実施できなかった。

c) 抗体検査

No.1~10の前後血清を用いて、BRSV、BPIV3、BVDV1型、BVDV2型、BCV、IBRVについては血

清希釈法による中和試験、IDVではHI試験により抗体検査を実施した。中和試験に用いる血清は56℃30分の加温処理後に試験に供した。IDVのHI試験では、分離されたIDVを限界希釈法で3代クローニング後に指示ウイルスとして用いた。また、国立感染症研究所のインフルエンザ診断マニュアルに基づき[12]、血清はRDE処理(RDE(Ⅱ)「生研」、デンカ株式会社)及び鶏血球吸着処理を行い、非特異的血球凝集因子が除去されていることを確認後に試験に供した。

d) 分離株の遺伝子解析

分離されたIDVのHemagglutinin Esterase Fusion (HEF) 蛋白質遺伝子について、ダイレクトシーケンス解析及び系統樹解析を実施した。

b. 細菌学的検査

No.1~10の鼻腔スワブを用いて定法により実施した。

3) IDV抗体検査方法の比較

発生農場において2022年1月に採材された成牛及び育成牛の残余血清105検体、2022年度に呼吸器病の病性鑑定を実施した牛17頭の前後血清34検体、計139検体を用いてHI試験及び中和試験を実施し、各試験結果を比較した。血清処理及びHI試験は上記2)のa)のc)と同様の方法で行い、中和試験はHRT-18G細胞を用いて血清希釈法により実施した。HI試験では10倍以上、中和試験では2倍以上の抗体価を陽性と判定した。

成績

1) 病性鑑定事例

a. ウイルス学的検査

a) 遺伝子検査

プールした3検体全てからIDV特異遺伝子が検出され、他の特異遺伝子は検出されなかった。

b) ウイルス分離検査

同居牛のNo.6及びNo.8の鼻腔スワブ乳剤を接種したHRT-18G細胞で円形化を示す細胞変性効果(CPE)が認められ、遺伝子検査によりNo.6はIDV、No.8はBCVと判定した。他の細胞ではCPEは認められず、特異遺伝子も検出されなかった。

c) 抗体検査

発症牛5頭中3頭(No.1~3)でIDV、発症

牛 5 頭中 2 頭 (No. 1 及び No. 3) で BCV、発症牛及び同居牛各 1 頭 (No. 9 及び No. 10) で BVDV2 型に対する抗体価の有意な上昇が認められた。他のウイルスでは有意な上昇は認められなかった。

d) 分離株の遺伝子解析

現在 IDV は、HEF 遺伝子配列に基づいて OK 系統、660 系統、CA19 系統、Yama16 系統、Yama19 系統の 5 つに分類されており、国内の分離株は全て Yama16 系統または Yama19 系統に属している。本事例の分離株は国内特有の系統である Yama19 系統に分類された (図 1)。

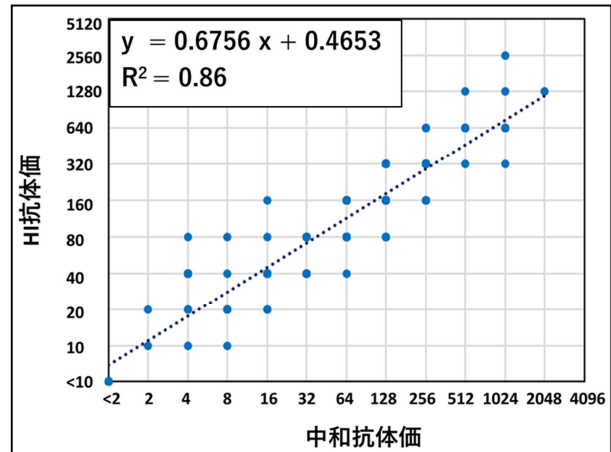


図 2 IDV 抗体検査結果

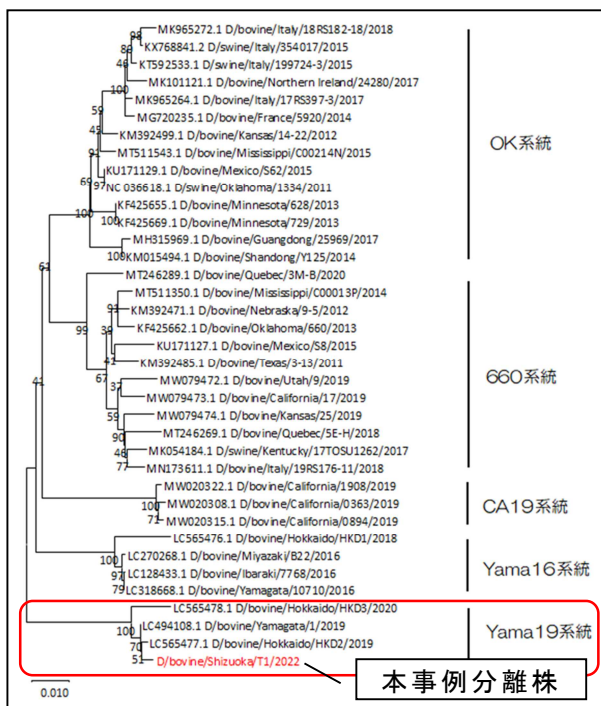


図 1 分離株の HEF 遺伝子の分子系統樹

b. 細菌学的検査

発症牛及び同居牛から複数の細菌が分離された。No. 3~5 から *Mannheimia haemolytica*、No. 4 から *Pasteurella multocida*、No. 6 から *Mycoplasma bovis* が分離された。

2) IDV 抗体検査方法の比較

血清 139 検体のうち、HI 試験及び中和試験ともに抗体陽性は 133 検体、陰性は 6 検体で、各試験の判定結果は全て一致した。また、各試験の抗体価の相関係数は 0.93 で、強い正の相関が認められた (図 2)。

考 察

病性鑑定の結果、プールした 3 検体全てから IDV 特異遺伝子が検出され、同居牛 1 頭から IDV が分離された。さらに、発症牛 5 頭中 3 頭で IDV 抗体の有意な上昇が認められたことから、IDV が呼吸器病発生に関与したと考えられた。

他の病原体の関与については、BCV 及び BVDV2 型において 10 頭中 2 頭で抗体価の有意な上昇が認められ、BCV では同居牛 1 頭からウイルスが分離された。しかし、ともに遺伝子検査ではプールした全ての検体で陰性であったことから、農場内でウイルスの動きはあったものの、今回の呼吸器症状への影響は少なかったと考えられた。なお、BCV が分離されたにも関わらず、特異遺伝子が検出されなかった原因は不明であった。細菌検査では、発症牛及び同居牛の複数頭から呼吸器病に関連した細菌が分離された。今回検出された細菌は健康牛でも分離されることがあり、健康牛の鼻腔から *M. haemolytica* が 18.3%、*P. multocida* が 49.4%、健康子牛の鼻腔から *M. bovis* が 8% 分離されたと報告されている [13, 14]。また、細菌が分離された個体と分離されなかった個体で臨床症状に差が認められなかったことから、IDV 感染等のストレスにより病原細菌が二次的に増殖したと考えられた。以上のことから、本農場で認められた呼吸器症状に IDV 以外の病原体の影響は少なかった可能性が高く、IDV が主体となって呼吸器病が発生したと考えられた。

本事例を含む国内発生事例を比較すると、発症年齢や分離株の HEF 遺伝子系統は様々であるが、発熱や呼吸器症状が共通して認めら

れた(表2)[15-17]。本事例では子牛のみで発症し、発熱と呼吸器症状が認められ、分離株はYama19系統に分類された。本事例と北海道の事例とは、分離株の遺伝子系統は異なっていたが、発症年齢及び症状等の発生状況は類似していた。

表2 国内発生事例との比較

		静岡県	山形県	北海道	北海道	青森県	青森県
		2022	2019	2019	2018	2016	2012
発症年齢	子牛	○		○	○	不明	○
	成牛		○				○
症状	発熱	○		○	○	○	○
	呼吸器症状	○	○	○	○		○
HEF系統	Yama19	○	○				
	Yama16			不明	○	○	○

また、IDVの牛への感染実験では、単独感染による病原性は低いと報告されているが[18]、本事例のように過密に飼養され、子牛に対するストレスが高い状態では、IDVが主体となって呼吸器症状を引き起こす可能性があると考えられた。現在、IDVのワクチンは市販されていないため、予防対策としては基本的な飼養衛生管理の徹底が重要である。

IDVの抗体検査方法については、HI試験と中和試験で同等の結果が得られたことから、中和試験での代替が可能だと考えられた。中和試験では、血清の前処理方法がHI試験と比較して簡便かつ他のウイルスと共通であり、使用細胞はBCVと共通であるため、牛呼吸器病発生時に行う検査項目に容易に追加することができ、抗体検査の省力化が可能だと考えられた。今後もIDVの検査を継続し、牛呼吸器病の原因究明に活用していきたい。

謝 辞

IDVのダイレクトシーケンス解析及び分子系統樹解析を実施していただいた東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医微生物学研究室の堀本泰介先生に深謝いたします。

参考文献

[1] Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z,

Liu R, Sheng Z, Armien A, Kaplan B, Chakravarty S, Hoppe AD, Webby RJ, Simonson RR, Li F: Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses, PLoS Pathog, 9, e1003176 (2013)

[2] Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Li F: Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family, MBio, 5, e00031-14 (2014)

[3] Ng TF, Kondov NO, Deng X, Van Eenennaam A, Neiberghs HL, Delwart E: A Metagenomics and Case-Control Study to Identify Viruses Associated with Bovine Respiratory Disease, J Virol, 89(10), 5340-5349 (2015)

[4] Mitra N, Cernicchiaro N, Torres S, Li F, Hause BM: Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus, J Gen Virol, 97, 1771-1784 (2016)

[5] Murakami S, Endoh M, Kobayashi T, Takenaka-Uema A, Chambers JK, Uchida K, Nishihara M, Hause B, Horimoto T: Influenza D Virus Infection in Herd of Cattle, Japan, Emerg Infect Dis, 22(8), 1517-1519 (2016)

[6] Horimoto T, Hiono T, Mekata H, Odagiri T, Lei Z, Kobayashi T, Norimine J, Inoshima Y, Hikono H, Murakami K, Sato R, Murakami H, Sakaguchi M, Ishii K, Ando T, Otomaru K, Ozawa M, Sakoda Y, Murakami S: Nationwide Distribution of Bovine Influenza D Virus Infection in Japan, PLoS One, 11(9), e0163828 (2016)

[7] Zulauf BJ: Multiplex Real-time PCR in the Detection and Differentiation of Bovine Respiratory Disease Pathogens, Masters Thesis, 1-59, (2007)

[8] Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ:

- Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR, *Arch Virol*, 144, 167-175 (1999)
- [9] Rana SK, Kota SN, Samayam PN, Rajan S, Srinivasan VA: Use of real-time polymerase chain reaction to detect bovine herpesvirus 1 in frozen cattle and buffalo semen in India, *Vet Ital*, 47(3), 313-322 (2011)
- [10] Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R: Detection of Bovine and Porcine Adenoviruses for Tracing the Source of Fecal Contamination, : *Appl Environ Microbiol*, 70, 1448-1454 (2004)
- [11] Faccini S, Mattia AD, Chiapponi C, Barbieri I, Boniotti MB, Rosignoli C, Franzini G, Moreno A, Foni E, Nigrelli AD: Development and evaluation of a new Real-Time RT-PCR assay for detection of proposed influenza D virus, *J Virol Methods*, 243, 31-34 (2017)
- [12] 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター: インフルエンザ診断マニュアル (第4版) (2019)
- [13] 勝田賢: 牛のパスツレラ症, 牛病学, 明石博臣編, 第三版, 267-270, 近代出版, 東京 (2013)
- [14] 樋口豪紀, 鈴木一由, 加藤敏英: 呼吸器疾患の臨床微生物学 6 マイコプラズマの発症機序, *臨床獣医*, 35, 51-53 (2017)
- [15] 早川潤, 上垣華穂, 増子朋美, 小林和美, 高橋弘康: 北海道内で初めて呼吸器病発症牛から分離された D 型インフルエンザウイルス, 令和元年度北海道家畜保健衛生業績発表会集録 (2019)
- [16] 齋藤豪, 佐藤宏樹, 林敏展, 佐藤尚人, 阿部知行, 金野加奈, 須藤隆史, 渡部巖: 県内牛飼養農家で初めて分離された D 型インフルエンザウイルスと県内浸潤状況調査, 令和元年度青森県家畜保健衛生業績発表会集録 (2019)
- [17] Murakami S, Sato R, Ishida H, Katayama M, Takenaka-Uema A, Horimoto T: Influenza D Virus of New Phylogenetic Lineage, Japan, *Emerg Infect Dis*, 26(1), 168-171 (2020)
- [18] Ferguson L, Olivier AK, Genova S, Epperson WB, Smith DR, Schneider L, Barton K, McCuan K, Webby RJ, Wan XF: Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle, *J Virol*, 90, 5636-5642 (2016)

9 牛伝染性リンパ腫ウイルス抵抗性遺伝子保有状況と体内プロウイルス量の変動に関する調査

中部家畜保健衛生所
○二階堂 紗恵

要 約

牛伝染性リンパ腫は、発症報告数が増加している届出伝染病である。原因ウイルスである牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)は県内牛飼養農家にも広く浸潤し、各農場に合わせた対策を実施している。他県では抵抗性遺伝子による対策が実施され成果をあげているため、県内でも取り組めるよう、抵抗性遺伝子保有状況を調査した。また、伝播リスク評価は体内プロウイルス量(PVL)を指標としているが、中長期的なPVLの推移は県内で未調査であったため、今回調査を実施した。抵抗性遺伝子保有状況調査では、県内酪農家6戸のEDTA血224検体で抵抗性遺伝子BoLA-DRB3 0902を検索し、3戸16頭で確認でき、農場内親子関係は4組確認された。また、抵抗性遺伝子保有牛(以下、保有牛)のうち、4頭はBLV陽性だったが、PVLはいずれも0.8copies/10ngDNA以下だった。PVLの変動調査では、同6戸で2018年5月～2022年5月にBLV陽性確認後3回以上検査した65頭の経時的变化を確認した。PVL変動に伴う伝播リスク評価が変化なし46.2%、変化あり53.8%だった。これらことから、保有牛は県内で確認され、生物的防壁としての利用による水平伝播対策として活用可能である。また、PVL変動に伴い伝播リスク評価が変化したことから、淘汰順位決定には複数回の検査を行い、PVLが高リスクを維持する個体の優先的淘汰が望ましい。

はじめに

地方病性牛伝染性リンパ種は牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)を原因とし、血液または乳汁を介して水平伝播や垂直伝播する。感染後、BLVはプロウイルスとして宿主DNAに組み込まれ、生涯感染が続き生産性に大きな影響を及ぼすが、ワクチンや治療薬はない。

非感染牛への伝播リスクはBLV感染牛の体内プロウイルス量(PVL)に比例するといわれており、県内ではPVLを指標にした目堅らの表[1]を用いて伝播リスクを評価し、分離飼育や淘汰順位の決定といったBLV対策を行っている。また、他県ではPVLと合わせて牛主要組織適合抗原(BoLA-DRB3)の遺伝子型によってPVLの増加を抑える抵抗性遺伝子を検索し、当該遺伝子保有牛(以下、保有牛)を分離飼育の際に生物的な防壁として利用した水平伝播対策で成果をあげている[2,3]。抵抗性遺伝子は、ホルスタイン種で複数の種類の報告があり[4]、今回県内BLV対策農家でも保有牛を活用した水平伝播対策を実施することを目的として、当所で検出可能な抵抗性遺伝子BoLA-DRB3 0902(0902)を検索し、保有状況を

調査した。

また、現在のBLV対策では分離飼育や淘汰順位の決定に伝播リスク評価が活用され、PVLが大きな指標となっているが、県内での中長期的なPVLの動態は不明だった。そこで、PVLの変動傾向を把握し今後のBLV対策の一助とするために、当所で実施したこれまでの検査結果からPVLの経時的な変動を調査した。

材料と方法

1) 抵抗性遺伝子保有状況調査

2022年5月に県内でBLV対策中の自家産酪農家6戸の飼養牛308頭(A農場57頭、B農場50頭、C農場53頭、D農場45頭、E農場68頭及びF農場35頭)から採材したEDTA血を用いた。EDTA血からの核酸抽出は、市販キット(QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen)を用いて定法の通り実施した。得られた核酸抽出物は、超微量分光高度計(Nano Drop Lite, Thermo Fisher scientific)で核酸濃度を測定した。濃度測定後、*pol*遺伝子を標的にした市販キット(牛白血病ウイルス検出キット, TaKaRa)でBLV遺伝子を検出した。BLVのコピー数は、

PVLを10ngDNAあたりに換算し定量値とした。定量したPVLは、目堅らの報告に基づき伝播リスク評価(低:<100copies/10ngDNA、中:100-400copies/10ngDNA、高:>400copies/10ngDNA)を行った。BLV遺伝子陰性及び低リスクと評価した個体に対して、林らの方法[5]に準じてnested-PCR実施後、制限酵素*BstYI*で切断し、その切断断片パターンから標的の0902を検出した。

2) PVLの変動に関する調査

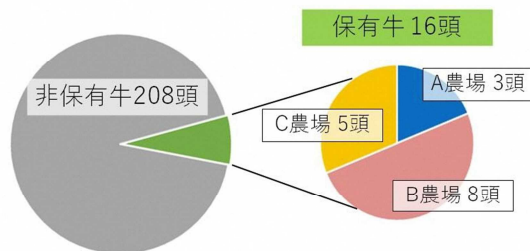
本調査には、2018年5月～2022年5月の期間、BLV対策中の自家産酪農家6農場において、5ヶ月から12ヶ月の間隔で採材した437頭延べ1336検体を対象とし、核酸抽出及びPVLの測定、伝播リスク評価を1)と同様の方法で行い、2021年以前は過去の、2022年は1)の検査データを用いた。このPVL検査データから、BLV遺伝子が初めて検出された時を含め3回以上検査を実施している個体を選抜し、経時的に個体のPVLと伝播リスク評価の変化、1)の抵抗性遺伝子の保有状況を確認した。さらに、PVLは感染後6ヶ月程度で安定するという報告[1]を基に、伝播リスク評価に変化のあった個体に対して、BLV遺伝子陽性を確認した検査から6ヶ月以上経過した個体を抽出した。

成 績

1) 抵抗性遺伝子保有状況調査

検査対象のBLV遺伝子陰性及び低リスクと評価した個体は224頭だった。このうち、抵抗性遺伝子非保有牛は208頭、保有牛は16頭だった。保有牛は3農場で見られ、それぞれA農場3頭、B農場8頭、C農場5頭だった。D、E、F農場では保有牛は確認できなかった(図1)。

【検査対象：6農場224頭】



※D・E・F農場は抵抗性遺伝子保有牛0頭

図1 検査対象牛224頭の内訳

農場ベースの保有牛の割合は、A農場5%(3/57頭)、B農場16%(8/50頭)、C農場9%(5/53頭)だった。農場内の親子関係は、A農場1組、B農場2組、C農場1組見られ、合計4組だった。また、保有牛16頭のうち、BLV陽性牛は3農場で4頭確認されたが、PVLは全て0.8copies/10ngDNA以下の低値だった(表1)。

表1 保有牛のPVL

No.	農場	PVL
1	A	0.3copies/10ngDNA
2	B	0.1copies/10ngDNA
3	C	0.4copies/10ngDNA
4	C	0.8copies/10ngDNA

2) PVLの変動に関する調査

対象になった個体は65頭だった。このうち、PVL変動に伴う伝播リスク評価の変化がなかった牛が46.2%(30/65頭)、変化のあった牛が53.8%(35/65頭)だった。

伝播リスク評価に変化のなかった30頭は、高リスクが16頭(53.3%)、中程度が2頭(6.7%)、低リスクが12頭(40.0%)だった。低リスクを維持する牛の中には、保有牛が3頭確認された。保有牛のPVLの経時的変化を見ると、全て0.8copies/10ngDNA以下であり、検査のタイミングによっては検出限界以下だった(表2)。

表2 保有牛のPVL経時的変化

No.	農場	1回目	2回目	3回目
1	A	0.1	検出限界以下	0.3
4	C	0.4	0.1	0.8
5	A	0.2	0.1	検出限界以下

※全て単位は copy/10ngDNA

変化のあった35頭は、伝播リスク評価が上昇するパターンa、上下するパターンb、下がるパターンcの3つに分けることができた(図2)。パターンaが21頭、パターンbが12頭、パターンcが2頭だった。

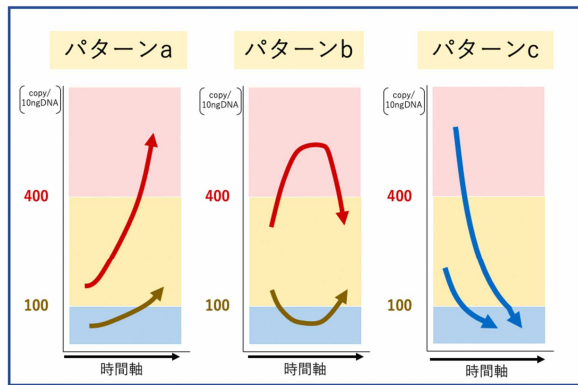


図2 PVL変動のパターン

BLV 遺伝子陽性確認後、6ヶ月以上経過している個体は20頭抽出された(表3)。パターンaは、伝播リスク評価が低リスクから中程度が1頭、中程度から高リスクが3頭、高リスク維持が6頭だった。パターンbは、伝播リスク評価の範囲を超えるPVLの増減が9頭で確認された。パターンbの中でPVLの変動が最も大きかった個体は、高リスクと判定された後、PVLが1661.7copies/10ngDNA減少したことで評価は中程度になり、その後2783.9copies/10ngDNA上昇し、評価が高リスクになったことが確認された(図3)。パターンcは、中程度から低リスクが1頭だった。

表3 伝播リスク評価変化ありの内訳

パターン	抽出前 (頭)	抽出後	
		計	内訳(頭)
a	21	10	低→中 1
			中→高 3
			高→高 6
b	12	9	中→低→中 2
			中→高→中 1
			高→中→高 5
			中→低→高 1
c	2	1	中→低 1
計	35	20	

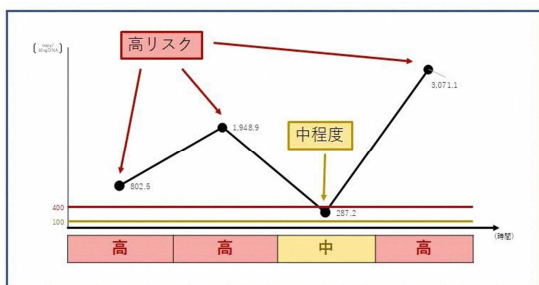


図3 パターンbのPVLの増減

考察

保有牛は、県内農家でも複数頭確認された。保有牛のPVLは、Hayashiらの報告[5]では2.76(±3.86)copies/10ngDNAとされ、今回確認した県内の保有牛でもPVLは0.8copies/10ngDNA以下で、経時的にも低値のまま推移していた。このことから、保有牛が確認された農場では、これまで牛舎の構造や飼養頭数の状況で分離飼育の際に空房が設けられなかった場合でも、保有牛を間に置くことで分離飼育の試みが可能となる。このように、保有牛を活用すれば新たな水平伝播対策を取り入れることができると考えられた。また、農場内の保有牛間で親子関係が確認されたことや、ヘテロ接合体でも抵抗性能を持つこと[6]から、保有牛から後継牛を取ることで、抵抗性遺伝子を持つ牛の確保につながり、長期的なBLV対策につながると考えられた。また、抵抗性遺伝子はPVLと同じ全血で検査可能であり、生涯1回の検査で保有牛の確定ができるため、家保と農家にとって労力とコスト負担が少ないBLV対策である。これらのことから、保有牛の活用のために、今後も検査を継続して実施することが有用である。

次に、PVLの変動に関する調査では、PVL変動に伴う伝播リスク評価の変化がないもの、あるものなど、様々なパターンが認められた。低PVLで推移する牛の中には抵抗性遺伝子非保有牛がおり、今回検索した0902の遺伝子以外にも抵抗性遺伝子は複数存在するとされることから、これらの牛は他の抵抗性遺伝子を持つ可能性も考えられた。また、伝播リスク評価が変化した個体のうち、BLV感染後、一定期間を経た群の中にPVLが増減し伝播リスク評価が変化した個体が確認された。このことから、BLV対策時には複数回の検査で高リスクを維持する牛から優先的に淘汰していくことが必要と考えられた。今後もより効果的なBLV対策のために、定期的なPVL検査が必要である。

参考文献

- [1] 目堅博久：プロウイルス量に基づいた牛白血病対策ノススめ，家畜感染症学会誌，7巻4号(2018)
- [2] 米山州二，齊藤かおり，小笠原悠，山口修：つなぎ飼い酪農家における牛伝染性リンパ腫ウイルスの清浄化事例，栃木県

研究部年報, 17-24(2021)

- [3] 高安真理子, 大矢祥子, 赤上正貴, 都筑知子: 黒毛和種における牛白血病発症抵抗性遺伝子の保有状況と清浄化対策, 茨城県家畜保健衛生業績発表会集録, 109-115(2017)
- [4] Carignano HA, Beribe MJ, Caffaro ME, Amadio A, Nani JP, Gutierrez G, Alvarez I, Trono K, Miretti MM, Poli A: BOLA-DRB3 gene polymorphisms influence bovine leukemia virus infection levels in Holstein and Holstein×Jersey crossbreed dairy cattle, *Animal Genetics*, 48, 420-430 (2017)
- [5] Hayashi T, Mekata H, Sekiguchi S, Kirino Y, Mitoma S, Honkawa K, Horii Y, Norimine J: Cattle with the BoLA class II DRB3 0902 allele have significantly lower bovine leukemia proviral loads, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79, 1552-1555(2017)
- [6] Juliarena MA, Barrios CN, Ceriani MC, Esteban EM: Bovine leukemia virus (BLV) infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle, *American Dairy Science*, 99, 4586-4589(2016)

10 県内で分離された豚由来大腸菌の薬剤耐性獲得状況調査

中部家畜保健衛生所

○杉本 郁子

要 約

腸内細菌の薬剤耐性化は主に、プラスミド等を介した薬剤耐性遺伝子の伝達に起因するとされ、薬剤耐性形質の拡散が問題となる。国内では特に豚及び鶏における薬剤耐性率が高い傾向にあり、疾病発生時には適切な治療薬の選択が求められる。そこで今回、豚大腸菌症の治療薬の選択や薬剤耐性菌対策に活用するため、健康豚及び病豚由来大腸菌における薬剤耐性菌の動向調査及び薬剤耐性遺伝子の保有状況の調査を実施した。

材料は2018～2021年に分離された健康豚由来大腸菌60株、2012～2021年に分離された病豚由来大腸菌23株を用い、薬剤感受性を調査した。薬剤感受性試験は11薬剤について寒天平板希釈法を用いて、最小発育阻止濃度を測定した。さらに主要な薬剤耐性遺伝子の保有状況を調査した。

健康豚由来株（健康豚）及び病豚由来株（病豚）ともにOTC、ABPC、SM、CPの耐性率は40%以上で、全国調査と比較し健康豚のクロラムフェニコール及び病豚のキノロン系薬剤の耐性率は全国調査の2倍以上であった。また病豚は健康豚に比較して薬剤耐性率及び薬剤耐性遺伝子保有率が高かった。特に下痢症例の主要血清型であるO149については、エンロフロキサシンの耐性率が81.3%と非常に高く、多剤耐性傾向であることを確認した。このことから、治療薬選択時には薬剤感受性試験が必須であり、二次選択薬であるフルオロキノロン系薬剤について適正使用・慎重使用の啓発が求められる。また薬剤耐性遺伝子の有無は薬剤感受性試験の結果と概ね一致し、薬剤耐性遺伝子が耐性化の要因となっていると考えられた。

はじめに

近年、薬剤耐性菌は増加傾向にあり、世界的にも大きな課題となっている。国内では2016年に薬剤耐性対策アクションプランが公表され、畜産分野では大腸菌のテトラサイクリン、第3世代セファロスポリン及びフルオロキノロン耐性率の数値目標が設定された[1]。動物分野では薬剤耐性菌の全国的なモニタリング調査である動物由来薬剤耐性菌モニタリング(JVARM)が実施されており、大腸菌などの薬剤耐性菌の動向調査が行われている。国内では特に豚及び鶏における薬剤耐性率が高い傾向にあり、2019年のJVARMによる調査では健康な豚及び鶏において複数の薬剤で耐性率が30%以上を示したと報告されている[2]。静岡県では畜産物安全性確保の一環として、1988年から健康家畜由来大腸菌を対象に薬剤耐性状況を調査してきたが、近年アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)の耐性率が上昇傾向にあり、変化が認められている。

細菌の薬剤耐性化は内因性と外因性に大別される。腸内細菌の薬剤耐性化は、外因性の薬剤耐性化であるプラスミドを介した接合伝達が最も頻繁に生じていると考えられており、多くの薬剤耐性遺伝子がプラスミドによって媒介されている[3]。このような機構を介して薬剤耐性遺伝子が拡散することで薬剤耐性菌が増加することが問題となる。

疾病発生時には適切な治療薬の選択が求められ、薬剤耐性菌の動向調査は治療薬の選択や耐性菌対策に有用である。そこで、治療薬の選択や薬剤耐性菌対策の一助とするため、近年県内で分離された健康豚及び病豚由来大腸菌について薬剤感受性試験を実施した。さらに主要な薬剤耐性遺伝子の保有状況を明らかにし、薬剤耐性遺伝子と薬剤耐性発現の関連性を解析した。

材料と方法

材料として、2018年～2021年に分離された健康豚由来大腸菌60株及び2012年～2021年

に病性鑑定事例で分離された病豚由来大腸菌 23 株を用いた。病豚由来株は 1 症例につき 1 株を選定した。

1) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は臨床・検査標準協会 (CLSI) に準拠した寒天平板希釈法を用い、ABPC、セファゾリン (CEZ)、セフトキシム (CTX)、CP、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、アプラマイシン (APM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、ナリジクス酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX) 及びコリスチン (CL) について最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。精度管理株として *Escherichia coli* ATCC 25922 を用いた。ブレイクポイント (BP) は主に JVARM で得られている値 [2] を用い、APM については Yang らにより報告されている値 [4] を用いた。MIC が BP 以上 (中等度耐性を含む) の株を耐性株と判定した。

また、健康豚由来株 (以下、健康豚) と病豚由来株 (以下、病豚) の薬剤耐性率について Fisher の正確確率検定を用いて有意差検定を実施した。また、健康豚と病豚について平均耐性薬剤数を算出した。

2) O 群血清型別の耐性状況

病豚由来大腸菌 23 株を用いて、抗血清 (デンカ生研 (株) 及び Statents Serum Institut) を用いたスライド凝集反応試験を実施した。

さらに主要な血清型別に薬剤耐性率及び平均耐性薬剤数を算出した。

3) 病原関連遺伝子の検索

病豚由来大腸菌 23 株を用いて、Vu-Khac らの方法 [5] に基づき LT、STa、STb、Stx2e、F4、F5、F6、F18 及び *eae* 特異遺伝子を検出する Multiplex PCR を実施した。

4) 薬剤耐性遺伝子の保有状況

-80℃ 保存していた大腸菌を普通寒天培地で一晚培養し、アルカリボイル法にて DNA 抽出を行った。薬剤耐性遺伝子は、フロルフェニコール (FFC) 耐性遺伝子として *flo* 遺伝子、CP 耐性遺伝子として *cmIA* 遺伝子、SM 耐性遺伝子として *strA*、*strB*、*aadA* 遺伝子、APM 耐性遺伝子として *aac(3)IV* 遺伝子、テトラサイクリン (TC) 耐性遺伝子として *tetA*、*tetB* 遺伝子、CL 耐性遺伝子として *mcr-1* 遺伝子を検出する PCR を実施した (表 1)。PCR 試薬は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を用い、PCR 機器は Veriti 200 (Applied Biosystems) を使用した。

得られた健康豚と病豚の薬剤耐性遺伝子保有率について Fisher の正確確率検定を用いて有意差検定を実施した。

さらに薬剤耐性遺伝子検索の結果を遺伝子型とし、薬剤感受性試験の結果を表現型として、これらの関連性を解析するため、耐性遺伝子保有株中の耐性株の割合を算出するとともに、「一致率 (%) = (耐性遺伝子陽性かつ耐性株 + 耐性遺伝子陰性かつ感受性株) / 全検体数 × 100」の計算式の通り一致率を算出した。なお、1 薬剤に対して複数の薬剤耐性遺伝子検索を実施した場合は、いずれかの薬剤耐性遺伝子を保有していれば陽性とした。

また各薬剤耐性遺伝子間の関連性を調べるため、 χ^2 値から Cramer の連関係数 (V) を算出した。

表 1 薬剤耐性遺伝子

薬剤	耐性遺伝子	所在	出典
FFC	<i>flo</i>	プラスミド等	[6]
CP	<i>cmIA</i>	プラスミド	[6]
SM	<i>strA</i>	プラスミド	[7]
	<i>strB</i>	プラスミド	[7]
	<i>aadA</i>	インテグロン	[7]
APM	<i>aac(3)IV</i>	プラスミド	[7]
TC	<i>tetA</i>	プラスミド等	[7]
	<i>tetB</i>	プラスミド等	[7]
CL	<i>mcr-1</i>	プラスミド	[8]

成績

1) 薬剤感受性試験

健康豚の耐性率は高い順に、OTC (56.7%)、CP (50.0%)、SM (46.7%)、ABPC (45.0%) であった (表 2)。特に OTC は MIC₅₀ が 128 μ g/ml と BP を越え、多くの株が耐性化していた。JVARM の結果と比較すると、CP の耐性率は約 2 倍であることが分かった [2]。

病豚の耐性率は高い順に OTC (82.6%)、SM (73.9%)、ABPC (69.6%)、NA (65.2%)、ERFX (43.5%)、CP (43.5%) であった (表 3)。このうち ABPC、NA、OTC、SM は MIC₅₀ が 64 ~ 512 μ g/ml であり、多くの株が耐性化していた。また APM の耐性率はやや高く 21.7% であった。JVARM の結果と比較すると、NA 及び ERFX の耐性率が 2 倍以上であった [9]。

健康豚と病豚の結果を比較すると、CP 及び CTX を除き、病豚で耐性率が高く、多くの薬剤で耐性率に有意差が認められた ($p < 0.05$)

(図1)。

平均耐性薬剤数は健康豚で2.3薬剤、病豚で4.9薬剤であった。3剤以上に耐性を示した株は、健康豚で25/60株(41.7%)、病豚で21/23株(91.3%)で、このうち6剤以上に耐性を示した株は、健康豚で2/60株(3.3%)、病豚で7/23株(30.4%)であった。

表2 健康豚の薬剤感受性試験結果

薬剤名	MIC 範囲 (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	耐性率 (%)
ABPC	1~>512	2	>512	45.0
CEZ	0.5~>512	2	4	3.3
CTX	≤0.125~16	≤0.125	≤0.125	1.7
CP	2~>512	16	256	50.0
SM	2~>512	16	>512	46.7
KM	1~>512	2	8	8.3
APM	4~>512	8	8	1.7
OTC	0.25~512	128	256	56.7
NA	1~>512	4	16	10.0
ERFX	0.25~16	≤0.125	0.5	5.0
CL	0.5~8	1	1	3.3

表3 病豚の薬剤感受性試験結果

薬剤名	MIC 範囲 (µg/ml)	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)	耐性率 (%)
ABPC	1~>512	512	>512	69.6
CEZ	1~32	4	16	34.8
CTX	≤0.125	≤0.125	≤0.125	0.0
CP	2~256	16	256	43.5
SM	1~>512	64	>512	73.9
KM	1~>512	2	>512	17.4
APM	2~16	4	>512	21.7
OTC	4~512	256	512	82.6
NA	2~>512	512	>512	65.2
ERFX	≤0.125~>32	1	16	43.5
CL	1~16	2	8	39.1

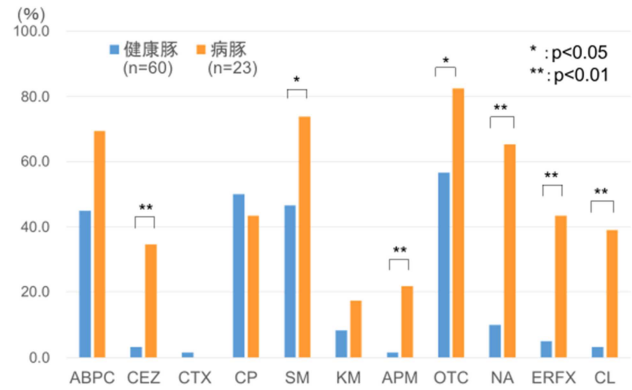


図1 健康豚と病豚の薬剤耐性率

2) O群血清型別の耐性状況

病豚は型別不能1株を除き、7種の血清型に型別された。最も多く認められた血清型は0149で11/23株(47.8%)で、次いで0139が4/23株(17.4%)、020が2/23株(8.7%)、0147、08、0119、06及び0151が1/23株(4.3%)であった。下痢症例では0149が60%以上、浮腫病症例では0139が約80%を占め、これらが本県の主要血清型であることが分かった。

血清型別に耐性率をみると、0149のNA及びERFXの耐性率が80%以上であることが判明した(図2)。また血清型別の平均耐性薬剤数は、0149が6.2薬剤、0139が3.0薬剤、その他血清型が4.1薬剤であった。

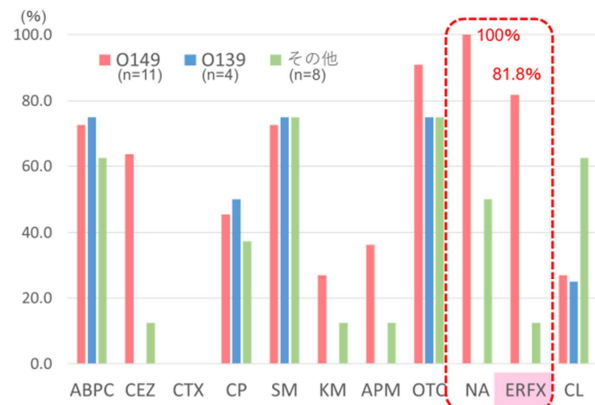


図2 主要血清型別の耐性率

3) 病原関連遺伝子の検索

血清型別にみると、0149は10/11株が全てLT、STb及びF4を保有しており、0139は3/4株が全てStx2e及びF18を保有していた。それぞれ主要な毒素遺伝子及び定着因子を保有していた。その他血清型では、LT、STa、STb、Stx2e及びF18のいずれか又は複数保有していた。

4) 薬剤耐性遺伝子の保有状況

薬剤耐性遺伝子の保有率は高い順に、健康豚では *strB*、*strA*、*aadA*、*tetA* 及び *flo* 遺伝子で、病豚では *tetA*、*strA*、*strB*、*aadA*、*cmlA* 及び *mcr-1* 遺伝子であった (図 3)。

健康豚と病豚を比較すると、*flo* 遺伝子を除き、薬剤耐性遺伝子の保有率は健康豚由来株に対し病豚由来株で高く、*aac(3)IV*、*tetA* 及び *mcr-1* 遺伝子の保有率について有意差が認められた ($p < 0.05$)。

各薬剤耐性遺伝子保有株の関連する薬剤の MIC は、それぞれ、*flo* 遺伝子が $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ 、*cmlA* 遺伝子が $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ 、*strA* 遺伝子が $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (2 株を除き $\geq 32 \mu\text{g/ml}$)、*strB* 遺伝子が $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ (3 株を除き $\geq 32 \mu\text{g/ml}$)、*aadA* 遺伝子が $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ 、*aac(3)IV* 遺伝子が $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ (1 株を除き $> 512 \mu\text{g/ml}$)、*tetA* 遺伝子が $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ 、*tetB* 遺伝子が $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ 、*mcr-1* 遺伝子が $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ であった。

遺伝子型と表現型の関連性の解析では、薬剤耐性遺伝子保有株中の耐性株の割合は、71.1~100.0% となり (表 4)、一致率は CP で 97.6%、SM で 88.0%、APM で 98.8%、TC で 98.8%、CL で 98.8% であった。

薬剤耐性遺伝子間の関連性の解析では、*cmlA* 遺伝子と *aadA* 遺伝子間 ($V=0.63$) で強い関連性が認められた。なお *cmlA* 遺伝子保有株は全て *aadA* 遺伝子を保有していた。また *strA* 遺伝子と *strB* 遺伝子はペアとして存在することが知られており [10]、これらの遺伝子間にも強い関連性が認められた ($V=0.90$)。

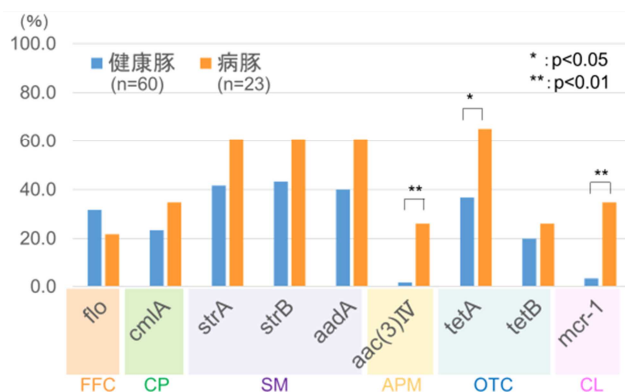


図 3 薬剤耐性遺伝子保有率

表 4 耐性遺伝子保有株中の耐性株の割合

薬剤	耐性遺伝子	耐性株/耐性遺伝子保有株	
		株数	割合 (%)
FFC	<i>flo</i>	24/24	100.0
CP	<i>cmlA</i>	22/22	100.0
SM	<i>strA</i>	37/39	94.9
	<i>strB</i>	37/40	92.5
	<i>aadA</i>	27/38	71.1
APM	<i>aac(3)IV</i>	6/7	85.7
TC	<i>tetA</i>	37/37	100.0
	<i>tetB</i>	18/18	100.0
CL	<i>mcr-1</i>	10/10	100.0

考 察

近年分離された豚由来大腸菌の薬剤感受性を調査したところ、健康豚、病豚ともに OTC、SM、ABPC、CP の耐性率が高く、健康豚と比較して病豚で薬剤耐性率が高いことが分かった。耐性率は概ね JVARM と同様の傾向となったが [2, 9]、本県の特徴として病豚ではキノロン系薬剤の耐性率が高いことが判明した。これは下痢症例の主要血清型である 0149 において NA 及び ERFX の耐性率が非常に高いことが原因と推察された。また 0149 は多剤耐性化傾向にあり、特に下痢症例に対しては現状治療薬の選択肢が限られてしまうことから、治療薬を選定する際には薬剤感受性試験が必須となり、特に ERFX などの二次選択薬の適正使用・慎重使用がより一層求められると考えられた。

次に薬剤耐性遺伝子の保有状況を調査したところ、多くの薬剤耐性遺伝子で健康豚と比較し病豚で耐性遺伝子保有率が高く、耐性率が高い薬剤に関連する耐性遺伝子の保有率が高い傾向にあった。そこで、遺伝子型と表現型の関連性について検討したところ、薬剤耐性遺伝子保有株のうち耐性株の割合は 71.1%~100% となり、遺伝子型と表現型の一致率は 88.0%~98.8% となった。このことから、調査した薬剤耐性遺伝子を保有すると関連する薬剤に耐性を示すことが示唆され、薬剤耐性遺伝子が耐性化の要因となっていることが確認できた。さらに今回調査した薬剤耐性遺伝子を検索すれば、大腸菌について薬剤耐性の有無を概ね判断できると考えられ、今後活用していくことも可能である。一例として、APM は豚の細菌性下痢症を適応症として

承認されており、他県の報告では大腸菌の一部の血清型を除き耐性菌の出現はあまり確認されていないが[11-13]、今回の調査ではAPMの耐性率は21.7%と他県の報告よりもやや高いことが分かった。APMの薬剤感受性ディスクは市販されておらず、薬剤感受性試験を実施する場合には薬剤感受性ディスクの製造販売業者に問い合わせる必要があるが、CLSIでは判定基準が規定されていない。そこで、APM耐性遺伝子の遺伝子型と表現型の一致率が高いことから、薬剤耐性遺伝子の検索が治療薬の選択に活用できると考えられた。

最後に、本県では健康豚におけるCPの耐性率が高いことが判明した。CPは現在家畜での使用が中止されているが、FFCに交差耐性を示すことが知られており[14]、FFC投薬の影響が推察された。CP耐性40株の内訳は、FFC耐性遺伝子のみを保有する株が16株(40.0%)、CP耐性遺伝子のみを保有する株が14株(35.0%)、FFCとCP両方の耐性遺伝子を保有する株が8株(20.0%)、耐性遺伝子を保有しない株が2株(5.0%)であり、CP耐性の要因にはFFC耐性遺伝子とCP耐性遺伝子の両方が関与していることが確認できた。次にCP耐性遺伝子である*cmIA*遺伝子保有株は全てSM耐性遺伝子である*aadA*遺伝子を保有しており、これらの遺伝子間には統計学的にも強い関連性があることが判明した。既報でも、豚の大腸菌について、HaradaらによりCP耐性遺伝子保有株はクラス1インテグロンを多く保有し、インテグロン内の薬剤耐性遺伝子カセットは*aadA*遺伝子等のジヒドロストレプトマイシン耐性遺伝子やトリメトプリム耐性遺伝子であったことが報告されており[15]、Travisらにより*cmIA*遺伝子を保有するプラスミドが*aadA*遺伝子及び*su13*遺伝子を保有していたことが報告されている[16]。*aadA*遺伝子は可動性遺伝因子であるインテグロンの薬剤耐性遺伝子カセットの1つであり、*cmIA*遺伝子と*aadA*遺伝子がプラスミド上で共存することで、共耐性が生じている可能性が考えられた。以上のことからCPの使用が中止された現在でも、CPの耐性率が高い理由は、家畜で使用されているFFC投薬の影響に加えて、SM耐性により共選択され現在まで維持・保存されているCP耐性遺伝子の保有によるものと考えられた。

今回の調査では、病豚由来大腸菌の薬剤耐性化が疾病対策の大きな課題であることが明らかとなった。薬剤耐性菌の対策としては抗菌薬の慎重使用が最も重要と考えられ、今後も動向を注視していく必要がある。

参考文献

- [1] 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議：薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016－2020
- [2] 農林水産省動物医薬品検査所：令和元年度と畜場及び食鳥処理場における家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング結果
- [3] 和知野純一：薬剤耐性獲得機構～グラム陰性菌を中心に～，日本臨床微生物学会雑誌，30，1-12（2020）
- [4] Yang Y, Xiao T, Li J, Cheng P, Li F, Yu H, Liu R, Muhammad I, Zhang X: Wild-type cutoff for Apramycin against *Escherichia coli*, *BMC Vet Res*, 16, 309 (2020)
- [5] Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J: Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia, 174, 176-187 (2007)
- [6] Keyes K, Hudson C, Maurer JJ, Thayer S, White DG, Lee MD: Detection of Florfenicol Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Sick Chickens, *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 421-424 (2000)
- [7] Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Janecko N, Lim H, Nicholson V, McEwen SA, Friendship R, Archambault M: Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario, *Appl Environ Microbiol*, 71, 6753-6761 (2005)
- [8] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A,

- Granier SA, Frutos Escobar C, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS: Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes, *Euro Surveill*, 23, 17-00672 (2018)
- [9] 農林水産省動物医薬品検査所：令和元年度の動物用医薬品の事故防止・被害対応業務において収集した病性鑑定由来細菌の性状及び薬剤感受性調査の概要
- [10] Sunde M, Norström M: The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs, *J Antimicrob Chemother*, 56, 87-90 (2005)
- [11] 山本栄子：県内で分離された豚由来病原性大腸菌の細菌学的解析，令和3年度埼玉県家畜保健衛生業績発表会集録，49-55 (2021)
- [12] 佐藤圭介，羽入さち子，小野里洋行，桐生直哉，福留静，會田恒彦，樋口良平：新潟県内で分離された豚由来病原性大腸菌の細菌学的解析，令和元年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録，25-29 (2019)
- [13] 下條憲吾，高山裕介：県下で分離された豚由来 *Stx2e* 産生大腸菌の血清型と性状，平成28年度長崎県家畜保健衛生業績発表会集録，57-60 (2016)
- [14] White DG, Hudson C, Maurer JJ, Ayers S, Zhao S, Lee MD, Bolton L, Foley T, Sherwood J: Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea, *J Clin Microbiol*, 38, 4593-4598 (2000)
- [15] Harada K, Asai T, DVM, Kojima A, Ishihara K, Takahashi T: Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs, *Am J Vet Res*, 67, 230-235 (2005)
- [16] Travis RM, Gyles CL, Reid-Smith R, Poppe C, McEwen SA, Friendship R, Janecko N, Boerlin P: Chloramphenicol and kanamycin resistance among porcine *Escherichia coli* in Ontario, *J Antimicrob Chemother*, 58, 101-107 (2006)