

牛の心内膜炎から分離された *Streptococcus suis* type 33佐藤友美<sup>1)†</sup> 須藤亜寿佳<sup>1)</sup> 大貫典子<sup>1)</sup> 大倉正稔<sup>2)</sup> 高松大輔<sup>2)</sup>

1) 山形県内陸食肉衛生検査所 (〒990-0892 山形市大字中野字的場827)

2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2012年4月4日受付・2012年11月5日受理)

## 要 約

2011年8月、病畜として搬入された黒毛和牛に、疣贅性心内膜炎、肺血栓、腎の点状出血等の所見が認められた。細菌学的検査で、心内膜炎病変部並びに、肺血栓部から、グラム陽性レンサ球菌が分離された。16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列解析及び共凝集試験により、分離菌株は *Streptococcus suis* の血清型33型であることが判明した。本報告は、*S. suis* 血清型33型を原因とする、世界で初めての牛の心内膜炎事例である。

—キーワード：心内膜炎，黒毛和牛，*Streptococcus suis* 血清型33型。

----- 日獣会誌 66, 195～199 (2013)

*Streptococcus suis* (以下、*S. suis*) は、豚レンサ球菌症の主要な原因菌で、おもに豚に敗血症、髄膜炎、心内膜炎、肺炎、関節炎などさまざまな病態を引き起こすことが知られているが、臨床上健康な豚の上部気道から分離されることも多い。また、*S. suis* は、人に髄膜炎や敗血症を引き起こす人獣共通感染症の起因菌でもある。2005年に中国四川省において、人の集団感染事例が発生して以降、本菌に対する注目度は世界的に高まっている [1]。 *S. suis* は現在までに、35種類の血清型 (1型-34型及び1型と2型の抗血清の両方に反応する1/2型) が知られており、病豚からは2型の分離頻度が最も高い。 *S. suis* による豚のレンサ球菌症は、世界中の主要な養豚国で発生しており、日本でも毎年発生が認められている。一方、牛からの本菌の分離例は、日本で22例 (9型; 8例, 10型; 1例, 15型; 1例, 18型; 5例, 20型; 1例, 不明; 6例), アメリカで2例 (9型, 20型), オーストラリアで1例 (20型), 及びカナダで2例 (2型, 16型) が報告 [2-7] されている。

今回、山形県内陸食肉衛生検査所が所管すると畜場に搬入された廃用牛において、*S. suis* 血清型33型が原因と思われる疣贅性心内膜炎の1症例に遭遇したので、その概要を報告する。

## 材料及び方法

**対象牛の臨床症状・剖検所見：**症例は、黒毛和牛、雌、27カ月齢で、肝炎及び胃腸炎の申告病名で、病畜として搬入された。初診時の所見は、呼吸速迫、黄褐色便、肝打診痛あり、呻吟、並びに起立難渋で、予後不良と診断されと畜場に搬入された。生体検査では特に異常は認められず、起立しており、呼吸数も正常で、下痢の所見も認められなかった。解体後検査で、右房室弁に脆弱、カリフラワー状の疣贅性心内膜炎 (ゴルフボール大) が認められた。その他の所見として、肺血栓、腎臓・膀胱粘膜の点状出血、第四胃炎、並びに肝炎が認められ、敗血症の様相を呈していたことから、即日全部廃棄処分とした。

**分離材料：**当該牛の心疣贅部、肺血栓部、肝、脾、腎、及び骨格筋を検査材料とした。

**細菌学的検査：**材料をスライドガラスに直接スタンプ後、グラム染色し、鏡検した。また、5%馬血液加コロンビア寒天培地 (株)日本バイオテスト研究所、東京) を用い、材料を直接スタンプ後、37℃、48時間好気及びローソク培養した。心疣贅部及び肺血栓部から分離された各1菌株 (以下、それぞれ心由来株、肺由来株) について、一般性状検査及び細菌同定キット (API20Strep,

† 連絡責任者：佐藤友美 (山形県内陸食肉衛生検査所)

〒990-0892 山形市大字中野字的場827

☎023-684-6716 FAX 023-684-6738

E-mail : satotomomi3@pref.yamagata.jp

表1 心由来株及び肺由来株の生化学性状 (一般性状検査)

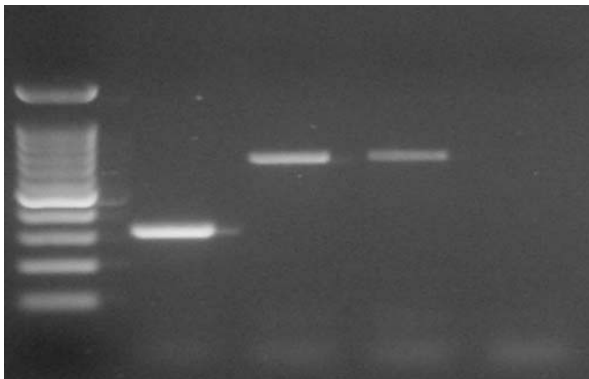
項目	所見	項目	所見
Gram染色	+	ラクトース	+
形態	レンサ球菌	トレハロース	+
溶血性	$\alpha$	ラフィノース	+
カタラーゼ	-	イヌリン	+
オキシダーゼ	-	マンニトール	-
エスクリン	+	ソルビトール	-
アルギニン	+	サリシン	+
VP	-	マルトース	-
グルコース	+	胆汁エスクリン	-

+ : 陽性 - : 陰性

表2 心由来株及び肺由来株のAPI20Strepによる生化学性状

項目	所見	項目	所見
VP	-	アルギニンジヒドロラーゼ	-
馬尿酸分解	-	リボース	-
エスクリン	+	アラビノース	-
ピロリドニルアリルアミダーゼ	+	マンニトール	-
$\alpha$ -ガラクトシダーゼ	+	ソルビトール	-
$\beta$ -グルクロニダーゼ	+	ラクトース	+
$\beta$ -ガラクトシダーゼ	-	トレハロース	+
アルカリフォスファターゼ	-	イヌリン	+
ロイシンアミノペプチダーゼ	+	ラフィノース	+
		アミドン	+
		グリコーゲン	+
		$\beta$ 溶血	-

+ : 陽性 - : 陰性



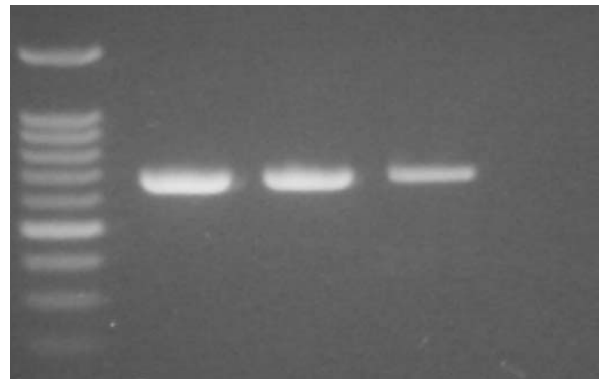
M 1 2 3 4

図1 16S rRNA 遺伝子を標的とした *S. suis* 特異的 PCR 法で得られた増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

M : 分子量サイズマーカー (100bp DNA Ladder, 株)バイオメディカルサイエンス)

- 1 : 陽性コントロール (*S. suis* DAT246 株)
- 2 : 心由来株
- 3 : 肺由来株
- 4 : 陰性コントロール (DW)

心由来株及び肺由来株では、約700bpの非特異的増幅産物が見られた。



M 1 2 3 4

図2 *gdh* 遺伝子を標的とした *S. suis* 特異的 PCR 法で得られた増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

M : 分子量サイズマーカー (100bp DNA Ladder, 株)バイオメディカルサイエンス)

- 1 : 陽性コントロール (*S. suis* DAT246 株)
- 2 : 心由来株
- 3 : 肺由来株
- 4 : 陰性コントロール (DW)

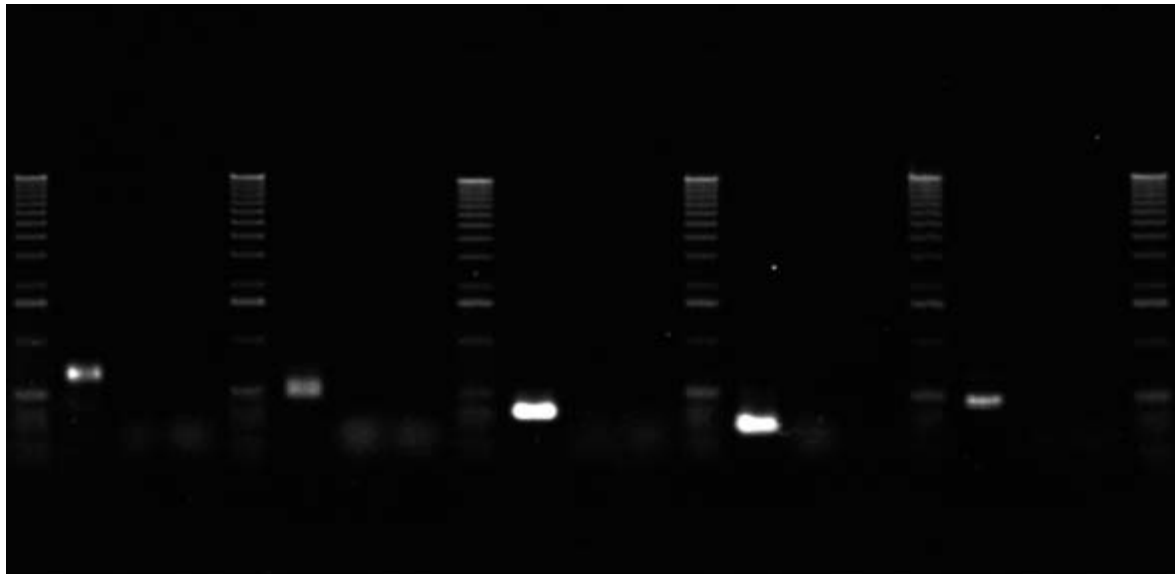
シスメックス・ビオメリユール(株, 東京)により生化学的性状検査を実施した。

**遺伝学的検査:** 心由来株及び肺由来株からそれぞれ熱抽出でDNAを抽出し, Maroisら [8] の16S rRNA遺伝子を標的とした *S. suis* 特異的 PCR 法, 及び Okwumabuaら [9] の *gdh* 遺伝子を標的とした *S. suis* 特異的 PCR 法を実施した。また, Silvaら [10] 及び Wangら [11] の莢膜合成遺伝子を標的とした血清型1型 (及び14型), 2型 (及び1/2型), 7型, 9型, 並びに16型特異的 PCR 法を実施した。さらに, 16S rRNA 遺伝子及びハウスキーピング遺伝子であるシャペロニン60遺伝子 (以下, *cpn60* 遺伝子) の部分塩基配列を, それぞれ Dorschら [12] 及び Brousseauら [13] の方法に準拠して決定し, Blast 及び MEGA version 5 [14] による相同性解析を行った。なお, *cpn60* 遺伝子は, *S. suis* において, 16S rRNA 遺伝子よりも識別能が高い解析法として報告 [13] されている。

**血清型別検査:** 血清型特異的抗血清を用いた共凝集試験を実施した [5, 15]。

### 成 績

**細菌学的検査結果:** 心疣贅部の直接スタンプのグラム



M 1 2 3 M 4 5 6 M 7 8 9 M 10 11 12 M 13 14 15 M  
 血清型1型 血清型2型 血清型7型 血清型9型 血清型16型  
 特異的PCR 特異的PCR 特異的PCR 特異的PCR 特異的PCR

図3 血清型特異的PCR法で得られた増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

M：分子量サイズマーカー（1 Kb PLUS DNA Ladder，インビトロジェン株）

1：血清型1型参照株 4：血清型2型参照株 7：血清型7型参照株 10：血清型9型参照株 13：血清型16型参照株  
 2, 5, 8, 11, 14：肺由来株 3, 6, 9, 12, 15：心由来株

表3 分離株と *S. suis* 血清型参照株間の 16S rRNA 及び *cpn60* 遺伝子の塩基配列相同性 (%)

遺伝子	比較参照株の血清型*																	
	1	1/2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
16S rRNA**	95.3	95.3	95.5	95.5	95.4	95.4	95.5	96.2	95.3	95.7	95.4	95.4	95.3	95.5	95.3	95.3	95.5	95.5
<i>cpn60</i>	83.3	81.2	81.7	81.4	82.6	82.8	83.3	81.4	81.9	81.4	81.9	82.6	81.7	82.2	81.7	81.7	83.3	82.8

遺伝子	比較参照株の血清型*																
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
16S rRNA**	95.5	95.5	96.8	95.5	96.7	95.5	95.6	95.6	96.8	95.5	95.4	95.5	95.7	95.5	94.9	99.0	95.4
<i>cpn60</i>	81.6	82.8	83.7	82.9	83.7	81.6	82.1	82.1	83.7	81.8	82.2	81.4	82.8	81.1	73.8	99.3	74.1

\* 比較した配列のアクセッション番号：16S rRNA; AF009475-AF009509, *cpn60*; AF237423-AF237457

\*\* 16S rRNA 遺伝子に関しては参照株によりデータベースに登録されている配列の長さが異なるため、解析は最短の配列に合わせ、両末端を除いた塩基配列（1,461bp）を比較した。

染色標本の鏡検で、グラム陽性レンサ球菌が検出された。37℃、48時間のローソク培養により、心疣贅部及び肺血栓部から、グラム陽性レンサ球菌が分離された。純培養した心由来株及び肺由来株は、同一の一般性状及び生化学的性状を示し、*S. suis* に類似していた（表1）。API20Strepでも、両株とも *S. suis* (% ID : 99.2%) と同定された（表2）。

**遺伝学的検査結果：**Maroisらのプライマーを用いた *S. suis* 特異的PCR法では、標的とする294bpの位置にバンドは認められなかったが（図1）、Okwumabuaらのプライマーを用いた *S. suis* 特異的PCR法では、標的

とする688bpの位置にバンドが認められた（図2）。Silvaら及びWangらのプライマーを用いた血清型特異的PCR法では、すべて陰性であった（図3）。そこで、心由来株及び肺由来株の16S rRNA 遺伝子塩基配列のほぼ全長（1,514bp）を決定したところ、両株の配列は互いに100%一致し、両末端の一部を除いた塩基配列（1,461bp）の相同性解析の結果、*S. suis* EA1832.92株（*S. suis* 血清型33型参照株）の塩基配列と最も高い相同性を示した（99.0%）（表3）。一方、33型を除く他のすべての血清型の *S. suis* 参照株の塩基配列との相同性は、いずれも97%以下であった。

*cpn60* 遺伝子の部分塩基配列 (552bp) の相同性解析の結果、心由来株及び肺由来株の塩基配列は互いに100%一致し、血清型33型参照株の塩基配列と最も相同性が高かった (99.3%) (表3)。一方、他のすべての血清型の *S. suis* 参照株の配列とは、いずれも84%以下の相同性であった。

なお、決定した本症例分離株の16S rRNA 遺伝子及び *cpn60* 遺伝子の塩基配列は、日本DNAデータベースに登録した (アクセッション番号, 16S rRNA: AB689682, *cpn60*; AB689683)。

**血清型別試験:** 血清型特異的抗血清を用いた共凝集試験では、心由来株、肺由来株とも、抗33型血清に最も強く凝集した。

以上の結果から、当該症例の心疣贅部及び肺血栓部からの分離菌株は、血清型33型の *S. suis* と考えられた。

## 考 察

牛の細菌性心内膜炎からは、*Streptococcus* 属菌や *Arcanobacterium pyogenes* などが分離されることが多い [16]。当所では、*Streptococcus* 属菌の中でも、*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* による牛の心内膜炎の症例が多く検出される傾向にある。牛の心内膜炎から *S. suis* が分離された事例は、国内では血清型18型株の1例のみで [3]、血清型33型株が分離されたのは、海外を含め、本事例が初めてと考えられる。

病豚から血清型33型が分離される例は少ないが、日本で1例 (心内膜炎)、韓国で2例 (多発性漿膜炎)、カナダで4例 (病豚1,597例中) が報告 [17-21] されている。一方、*S. suis* 血清型33型の参照株は、子羊の関節炎から分離された株であり [22]、また、本事例が牛に敗血症を起こしていたことを考慮すると、本血清型は、豚だけでなく牛や羊などの反芻獣に対しても病原性を有している可能性が示唆される。

本症例分離株は、16S rRNA 遺伝子を標的とした Marois らのPCR法による遺伝学的検査では、*S. suis* とは同定されなかった。また、血清型33型の参照株と今回分離された株は、*S. suis* の分類学的基準株や他の血清型参照株との16S rRNA 遺伝子の相同性が97%以下と低かった。細菌分類学では、DNA-DNAハイブリダイゼーション法のDNA相同値が70%以上であれば同種とする基準が用いられているが、16S rRNA 遺伝子の相同性が97%以下の場合、通常DNA-DNAハイブリダイゼーション法のDNA相同値は70%以下となる [23]。このため、分類学上は、本事例から分離された株を含む *S. suis* の血清型33型は、他菌種とした方が適切であると考えられる。したがって、今後、*S. suis* を含む、牛における *Streptococcus* 属菌の分類学的な再検討を行う必要があると考えられる。

*S. suis* は、人にも感染して髄膜炎や敗血症を引き起こすことがある。特に養豚業や食肉処理業など生豚や生の豚肉を扱う職業に就く人は、本菌の感染リスクが高いことから、*S. suis* は、豚肉産業に関連した人獣共通感染症の重要な病原体であると考えられる [1]。また、国内では、2007年に、牛からの感染が示唆された血清型2型による人の症例も報告 [24] されており、豚のみならず牛も *S. suis* の感染源として注意する必要がある。これまで、血清型33型による人の感染例は報告されていないが、牛から人への *S. suis* 感染リスクを低減化するためにも、今後、血清型33型を含む *S. suis* の牛における保菌状況を明らかにしていく必要があると思われる。

## 引 用 文 献

- [1] 高松大輔: *Streptococcus suis* の多様性と病原因子, 日本細菌学雑誌, 66, 7-21 (2011)
- [2] 青野逸志, 大沢輝城, 家久秀海: *Streptococcus suis* が分離された乳用雄子牛の化膿性髄膜炎の1症例, 日獣会誌, 44, 802-805 (1991)
- [3] Kataoka Y, Sugimoto C, Nakazawa M, Morozumi T, Kashiwazaki M: The Epidemiological Studies of *Streptococcus suis* Infections in Japan from 1987 to 1991, J Vet Med Sci. 55, 623-626 (1993)
- [4] 萩野博明, 樋口良平, 阿部隆司, 渡辺大成, 鍋谷政弘, 加藤和夫: *Streptococcus suis* type 15 が分離された乳用牛の流産例, 日獣会誌, 47, 737-740 (1994)
- [5] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, Mittal KR, Henrichsen J: Description of 14 New Capsular Types of *Streptococcus suis*, J Clin Microbiol, 27, 2633-2636 (1989)
- [6] Hampson DJ, Trott DJ, Clarke IL, Mwaniki CG, Robertson ID: Population Structure of Australian Isolates of *Streptococcus suis*, J Clin Microbiol, 31, 2895-2900 (1993)
- [7] Higgins R, Gottschalk M, Fecteau G, Sauvageau R, Guise S, Tremblay D: CROSS-CANADA DISEASE REPORT, Can Vet J, 31, 529 (1990)
- [8] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, Kobish M: Multiplex PCR Assay for Detection of *Streptococcus suis* Species and Serotypes 2 and 1/2 in Tonsils of Live and Dead Pigs, J Clin Microbiol 42, 3169-3175 (2004)
- [9] Okwumabua O, O'Connor M, Shull E: A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase, FEMS Microbiol Letters, 218, 79-84 (2003)
- [10] Silva LM, Baums CG, Rehm T, Wisselink HJ, Goethe R, Valentin-Weigand P: Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR, Vet Microbiol, 115, 117-127 (2006)
- [11] Wang K, Fan W, Wisselink H, Lu C: The *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 16: development of a serotype-specific PCR assay, Vet Microbiol, 153, 403-406 (2011)

- [12] Dorsch M, Stackebrandt E : Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16S rDNA, *J Microbiol Methods*, 16, 271-279 (1992)
- [13] Brousseau R, Hill JE, Préfontaine G, Goh SH, Harel J, Hemmingsen SM : *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences, *Appl Environ Microbiol*, 67, 4828-4833 (2001)
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S : MEGA 5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol Biol Evol*, 28, 2731-2739 (2011)
- [15] Han DU, Choi C, Ham HJ, Jung JH, Cho WS, Kim J, Higgins R, Chae C : Prevalence, capsular type and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughter pigs in Korea, *Can J Vet Res*, 65, 151-155 (2001)
- [16] 荳村明彦 : 敗血症, 新・食肉衛生検査マニュアル, 全国食肉衛生検査所協議会編, 265-271, 中央法規, 東京 (2011)
- [17] 地紙順子, 富樫直子, 小川順子, 岩本百合子, 水谷浩志, 倉石 瞳 : 豚における *Streptococcus suis* の分離状況および血清型別, *獣医公衆衛生研究*, 13-1, 24-25 (2010)
- [18] Kim D, Han K, Oh Y, HyunKim C, Kang I, Lee J, Gottschalk M, Chae C : Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea, *Can J Vet Res*, 74, 314-316 (2010)
- [19] Higgins R, Gottschalk M : CROSS-CANADA DISEASE REPORT, *Can Vet J*, 36, 320 (1995)
- [20] Higgins R, Gottschalk M : CROSS-CANADA DISEASE REPORT, *Can Vet J*, 42, 223 (2001)
- [21] Messier S, Lacouture S, Gottschalk M : CROSS-CANADA DISEASE REPORT, *Can Vet J*, 49, 461-462 (2008)
- [22] Higgins R, Gottschalk M, Boudreau M, Lebrun A, Henrichsen J : Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*, *J Vet Diagn Invest*, 7, 405-406 (1995)
- [23] Stackebrandt E, Ebers J : Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards, *Microbiol Today*, 33, 152-155 (2006)
- [24] 石垣和慶, 中村 朗, 岩淵千太郎, 小寺 聡, 大江健二, 片岡 康, 會田裕香 : 牛の飼育からの感染が示唆された肺塞栓, 脊椎炎を合併した *Streptococcus suis* type 2 による感染性心内膜炎の1例, *感染症学雑誌*, 83, 544-548 (2009)

---

### *Streptococcus suis* Serotype 33 Isolates from a Case of Bovine Endocarditis

Tomomi SATO\*<sup>†</sup>, Asuka SUTO, Noriko ONUKI, Masatoshi OKURA  
and Daisuke TAKAMATSU

\* *Nairiku Meat Inspection Center, 827 Matoba, Nakano, Yamagata, 990-0892, Japan*

#### SUMMARY

A diseased Japanese Black Cow was carried into our laboratory in August 2011. The cow had developed verrucous endocarditis, pulmonary thrombosis, petechial hemorrhage in the kidney. Gram-positive streptococci were isolated from lesions of the verrucous endocarditis and pulmonary thrombosis. The 16S rRNA gene sequence analysis and coagglutination tests with sera for serotyping showed that these isolates were *Streptococcus suis* serotype 33. The present case was the first report of bovine endocarditis caused by *S. suis* serotype 33 in the world. — Key words : endocarditis, Japanese Black Cattle, *Streptococcus suis* serotype 33.

<sup>†</sup> *Correspondence to : Tomomi SATO (Nairiku Meat Inspection Center)*

*827 Matoba, Nakano, Yamagata, 990-0892, Japan*

*TEL 023-684-6716 FAX 023-684-6738 E-mail : satotomomi3@pref.yamagata.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 195 ~ 199 (2013)*