

## 原 著

## 慢性型豚丹毒発症豚から分離された豚丹毒菌の性状解析

大島公子 春田和也 菊地美貴子 高橋理香子 山口健一<sup>†</sup>

秋田市食肉衛生検査所 (〒 019-2631 秋田市河辺神内字堂坂 2-6)

(2018年12月5日受付・2019年6月28日受理)

## 要 約

豚丹毒は豚丹毒菌による豚の感染症で、慢性型の発症に生ワクチンの関与が疑われている。慢性型（関節炎型及び心内膜炎型）あるいは亜急性型（蕁麻疹型）豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌 46 株を解析したところ、32 株がワクチン株、14 株が野外株で、ワクチン株 32 株中 5 株は蕁麻疹型及び心内膜炎型から検出された。ワクチン株識別には SNP 検出 PCR を用いたが、この方法は手技も簡便で判定も容易であった。また、野外株 14 株について、病原因子とされる菌体表面抗原 SpaA 遺伝子の高度可変領域 432bp を解析した結果、国内で流行している Met-203 株が 2 株検出された。さらに、他県での分離株と共通する一塩基多型を持つ株が 9 株検出された。当該領域の遺伝子変異解析は、分離株間の関連性を調査するために重要である。

——キーワード：豚丹毒，ワクチン株，SNP 検出 PCR 法，SpaA 遺伝子高度可変領域

-----日獣会誌 72, 745~749 (2019)

豚丹毒は、グラム染色陽性小桿菌の豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) によって引き起こされる豚の感染症である。その病態は、急性敗血症型、亜急性型（蕁麻疹型）、慢性型（関節炎型、心内膜炎型）に分類され、慢性型の多くはと畜検査時に発見されることが多い。と畜場で発見された場合、と殺禁止もしくは全部廃棄対象となり、経済的損失が大きい。ため、疾病制御が重要である（小川洋介：最新の家畜疾病情報（V）、豚丹毒、日獣会誌、68、277-279（2015））。

豚丹毒の予防には、弱毒豚丹毒菌小金井 65-0.15 株（血清型 1a 型）を製造用株とする生ワクチンが用いられているが、と畜検査で摘発される豚丹毒の中で生ワクチンに起因すると考えられる事例が報告されている [1]。このため、ワクチン株と野外株とを正確に識別する方法が必要とされてきたが、Shiraiwa ら [2] が 2015 年に発表したワクチン株の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism : SNP）5 カ所を特異的に検出する PCR 法（SNP 検出 PCR 法）により、迅速かつ正確にワクチン株を識別することが可能となった。

一方、野外株については、血清型 1a 型、かつ、菌体表面の防御タンパク質 Surface protective antigen A (SpaA) 遺伝子の塩基配列 609 番目が G に変異した、

すなわち 203 番目のアミノ酸がメチオニンである Met-203 タイプ株の流行が報告されている [3, 4]。

本研究では、ワクチン株による豚丹毒の発生状況を把握するため、おもに慢性型豚丹毒発症豚から分離された株について、SNP 検出 PCR 法を行った。また、野外株について Met-203 タイプ株の浸潤状況を調べるため、SpaA 遺伝子高度可変領域のシーケンス解析を行った。

## 材料及び方法

**供試菌株**：平成 15~27 年に、と畜場で分離した豚丹毒菌 46 株を試験に供した。病型の内訳は、関節炎型が 29 株、心内膜炎型が 10 株、蕁麻疹型が 7 株であった。いずれも病変部から分離し、グラム染色による形態及び本菌特異的 PCR 法 [5] で *E. rhusiopathiae* と同定した。

**血清型別試験**：(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門に依頼した。方法は、蒸留水に浮遊させた培養菌を 121℃ 60 分オートクレーブにて加熱後、その遠心上清を寒天ゲル内沈降反応用抗原として使用し、血清型別用の家兎抗血清と反応させた。

**DNA 抽出**：供試菌株 10 白金耳量をかきとり、25mmol/l NaOH 50μl に懸濁し、10 分間煮沸した。その後、1mol/l Tris-HCl (pH8.0) 4μl を添加し溶液を中

<sup>†</sup> 連絡責任者：山口健一（秋田市食肉衛生検査所）

〒 019-2361 秋田市河辺神内字堂坂 2-6

☎ 018-882-2395 FAX 018-882-2126

E-mail : ac050679@city.akita.lg.jp

表1 プライマーの名称及び配列 (Shiraiwa, 2015)

プライマー名称	配列	PCR産物のサイズ
primer 0001	F:5'-CGGTGTTGATTCTCCAGAATAGG-3' R:5'-TAGATGCTGCACGTCCTACAGAGGAC-3'	874bp
primer 0543	F:5'-TTCATAATCAATTTTCATGAAGCGGT-3' R:5'-ATGTGCCAACTATGTCGCGGATGCGAGCAC-5'	757bp
primer 0636	F:5'-GATGATTATCCTTACGGTGGTGCTG-3' R:5'-GCTTCTTTTGGGCTAAGGTTTCTCGC-5'	539bp
primer 1398	F:5'-TCTTGTGCTAACATCTCACGATTAG-3' R:5'-ACGGGGAAGTGGTAAGACGTATTTAT-3'	798bp
primer 1449	F:5'-ATACGATGCATATTCAATTCAATTGCAATA-3' R:5'-ACTTAACGTTTACAGATCGATCATATTT-3'	583bp

和後, 15,000rpmで2分間遠心分離して得られた上清を鋳型DNAとした。

**SNP検出PCR:** 抽出した鋳型DNAについて Shiraiwaら [2] の方法に基づき実施した。PCR反応はDNAポリメラーゼ (KOD FX, 東洋紡(株), 大阪) を用い, 最終濃度  $0.3\mu\text{mol/l}$  のプライマーと鋳型DNA  $50\text{ng}$  を加えた合計  $25\mu\text{l}$  の反応系とした。陽性コントロールとして小金井65-0.15株のゲノムDNAを, 陰性コントロールとして蒸留水を使用した。反応条件は,  $95^\circ\text{C}$  5分, その後  $95^\circ\text{C}$  30秒,  $67^\circ\text{C}$  30秒,  $72^\circ\text{C}$  30秒の3ステップを35サイクル繰り返し,  $72^\circ\text{C}$  2分とした。プライマーは表1に示す5組を使用した。増幅産物を1.5%アガロースを用いて電気泳動し, 5組のプライマーすべてと陽性コントロールでバンドが確認され陰性コントロールが不検出であった株をワクチン株, それ以外の株を野外株と判定した。

**シークエンス解析:** SNP検出PCRで野外株と判定した株について, SpaA遺伝子高度可変領域432bpのシークエンス解析を行った。PCR反応はKOD FXを用い, 最終濃度  $0.3\mu\text{mol/l}$  のプライマーと上記で抽出した鋳型DNA  $5\mu\text{l}$  を加えた合計  $50\mu\text{l}$  の反応系とした。PCR反応条件, プライマーは, Toら [4] の報告に基づいた。得られたPCR産物を精製キット (GenElute PCR Clean-Up Kit, シグマアルドリッチ ジャパン(株), 東京) で精製後, 検査機関 (株)ファスマック, 神奈川) で塩基配列を解析した。塩基配列は, 解析ソフト (CLC Sequence viewer 7, (株)CLC バイオジャパン, 東京) を用い, 血清型1 (1a及び1b) 型株はFujisawa株 (Accession no: AP012027), 2型株についてはATCC19414基準株 (Accession no: AB024083) の配列と比較した。

### 成 績

SPF農場とコンベンショナル農場に分け, 血清型別, SNP検出PCR, シークエンス解析の結果を(表2)に

表2 血清型別, SNP検出PCR, SpaA高度可変領域シークエンス解析の結果

	血清型別	頭数	SNP検出PCR ワクチン株(+)	SpaA変異部位 及び検体数
SPF農場	1a	10	10	-
	1b	0	0	-
	2	0	0	-
計		10	10	
コンベンショナル農場	1a	24	22	I (Met-203) : 2検体
	1b	1	0	II : 1検体
	2	11	0	III : 9検体 IV : 1検体 V : 1検体
計		36	22	

\* SpaA変異部位について: I~Vは図1に示す配列と対応する。

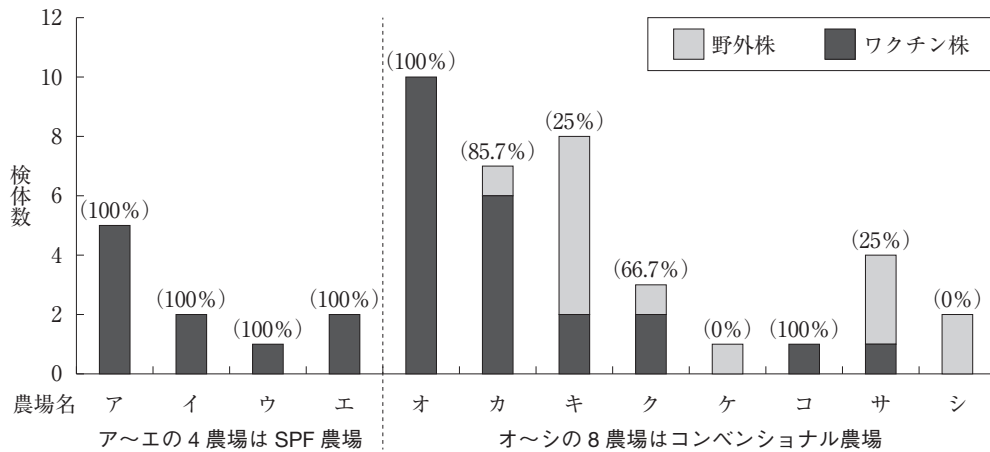
-は未解析であることを示す。

示す。また, 農場別のワクチン株検出数及び割合を図1に示す。農場ア~エの4農場はSPF農場, オ~シの8農場はコンベンショナル農場である。

血清型別の結果, SPF農場由来の10株はすべて1a型であり, コンベンショナル農場由来では1a型が24株, 1b型が1株, 2型が11株であった。

SNP検出PCRの結果, SPF農場由来のワクチン株の比率は10株中10株(100%), コンベンショナル農場由来は36株中22株(61.1%)であり, 供試菌全体におけるワクチン株の割合は69.6%であった。農場へ聞き取り調査を行ったところ, ワクチン株が検出されたすべての農場で生ワクチンが使用されていた。ワクチン株32株の病型内訳は, 関節炎型27株, 心内膜炎型4株, 蕁麻疹型1株であった(図2)。

野外株14株のSpaA遺伝子高度可変領域シークエンス解析結果を図3に示す。血清型1a株の2株は現在国内で流行しているMet-203タイプ株(図3(I))であっ



( ) 内はワクチン株の検出割合を示す

図1 農場別の豚丹毒菌ワクチン検出数及び割合

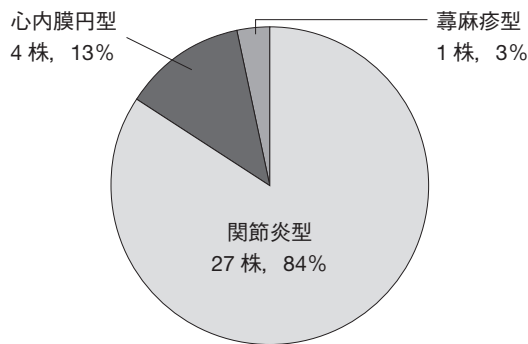
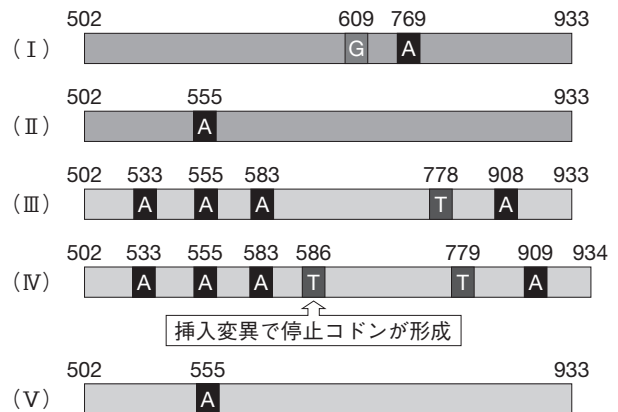


図2 ワクチン株の病型内訳



※ I 及び II は Fujisawa 株 (AP012027.1) と、III、IV 及び V は ATCC19414 (AB024083) 株の配列と比較して異なる塩基のみ記載している。

図3 野外株14株のSpaA遺伝子高度可変領域シーケンス解析結果

た。血清型2型の10株は、533番目のGがAに、555番目のCがAに、583番目のGがAに、778番目のCがTに、908番目のGがAに、計5カ所に一塩基多型が認められた(図3(III))が、そのうちの1株において、前述の5カ所の塩基の変異に加えて586番目にTの挿入変異(585\_586insT)が認められた(図3(IV))。また、555番目のCがAに変異した株が、血清型1b型で1株(図3(II))、血清型2型で1株(図3(V))認められた。

### 考 察

調査の結果、ワクチン株の割合は供試菌株全体の69.6%であった。Shiraiwaら[6]は、全国各地の生ワクチン接種歴がある豚から分離された豚丹毒菌にSNP検出PCRを行い、65.2%がワクチン株であると発表している。本調査におけるワクチン株検出率は、全国的な傾向と比較的近いといえる。

本研究でワクチン株と判定した株の一部について、春田は、アクリフラビン(AF)耐性試験とRandom Amplified Polymorphic DNA(RAPD)パターン分析を行ったが、その結果、その中の1株はAF感受性とRAPDパターンのどちらも小金井65-0.15株と異なることを2015年の秋田県獣医師会雑誌で報告した。AF

耐性はこれまでワクチン株判定の指標とされていたが、継代によりAF耐性が変化することや[1]、AF耐性を示す野外株の存在が指摘されている[7]。またImadaら[1]は、RAPDパターン分析からワクチン株が識別可能であると報告したが、ワクチン株と同じRAPDパターンを示す野外株も報告されている[8]。さらにRAPDパターン分析は、特異性だけでなく再現性にも問題があると指摘されており、これまでの方法では臨床分離株とワクチン株とを正確に識別することは困難であった。一方、本研究で行ったワクチン株識別法は、小金井65-0.15株に特異的な76カ所のSNPのうち5カ所をターゲットとしているため正確度が高く[2]、単一のバンドを検出するため、RAPDパターン分析と比較して再現性が高い。ワクチンによる豚丹毒の発生状況を正確に把握し考察するためには、今後、SNP検出PCR法を指標とした調査がより有効である。

SPF 豚は豚丹毒菌に対する感受性が高いことが知られているが、本調査において、分離されたワクチン株の割合は SPF 農場で 100%、コンベンショナル農場で 61.1%で、SPF 農場が高値であった。一方、図 1 のとおり、コンベンショナル農場間でもワクチン株の検出率に差がみられ、ワクチン株の感受性を左右する農場側の要因が存在する可能性が考えられた。今後は、より多い検体数で調査を行うと同時に、衛生状況やワクチン接種のタイミングなどについて農場側と情報共有を行い、ワクチン株の感受性を左右する要因について総合的に検討する必要がある。

ワクチン株によって発生する豚丹毒の病型は、これまで慢性型であると考えられてきた [1]。本調査では、図 2 のとおりワクチン株のほとんどは慢性型から検出されたが、非 SPF 農場の一つ (図 1 農場コ) において蕁麻疹型からも 1 株検出され、ワクチン株が亜急性型を引き起こす場合があることが明らかになった。病型も含めて正確な発生状況を把握するために、今後も調査が必要である。

SpaA 高度可変領域のシーケンス解析の結果、Met-203 タイプ型が 2 株検出された。Met-203 タイプ型は、長野で流行が確認されており [3]、全国各地にも広く分布しているとの報告がある [4]。本研究で Met-203 タイプ型が分離された農場では、聞き取り調査によると生ワクチンが接種されていた。Met-203 タイプ型は急性敗血症の豚から多く分離されているが [3]、当該株が分離された時期にこの農場から急性敗血症の届け出は成されていない。現在流通している生ワクチンと不活化ワクチンは Met-203 タイプ型による急性敗血症の発症を抑えるとの報告がある [9]。このことから、当該農場では生ワクチンにより急性敗血症は抑えられたが、慢性型として発症した可能性が考えられた。

SpaA 遺伝子高度可変領域について国内外で複数のシーケンス解析が行われており [8, 10]、本調査と共通する一塩基多型を持つ株も報告されている。図 3 (Ⅲ) で示す一塩基多型を持つ株が、本調査では 14 株中 9 株分離されたが、平成 27 年度全国食肉衛生検査所協議会北海道・東北ブロック大会で大野らにより発表された北海道の調査では、92 株中 33 株検出されている。詳細な関連性は现阶段で不明であるが、SpaA 遺伝子の塩基配列は豚丹毒菌の系統分類結果と一部相関があると示唆する報告もあり [11]、当該領域の遺伝的変異解析は分離株間の関連性を調査するために重要である。

興味深いことに、本研究において、当該領域に挿入変異を持つ株 (図 3 (Ⅳ)) が分離された。この変異で終止コドンが形成されるため、SpaA タンパクは機能不全であると考えられる。SpaA を欠損させた株は、病原性が低下することが報告されている [12]。また、SpaA タン

パクが菌の豚上皮細胞への付着に重要であることが報告されている [13]。機能的な SpaA を発現していない株が、菌血症の後遺症と考えられる疣贅性心内膜炎を罹患した豚から分離されたことは、病原学的にも興味深い。

最後に、県内では多くの農場で生ワクチンが使用されているが、ワクチン株による発症予防のため家畜保健衛生所は不活化ワクチンへの切替を推奨している。ワクチン株により慢性型だけでなく亜急性豚丹毒が引き起こされる恐れもあり、不活化ワクチンへの切替えが強く望まれる。また、適切なワクチン切替えのためにもワクチン株由来豚丹毒の発症状況を正確に調査することが必要である。

稿を終えるに当たり、本調査にご協力・ご指導いただいた (国研) 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 下地善弘先生に深謝する。

## 引用文献

- [1] Imada Y, Takase A, Kikuma R, Iwamaru Y, Akachi S, Hayakawa Y : Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping, *J Clin Microbiol*, 42, 2121-2126 (2004)
- [2] Shiraiwa K, Ogawa Y, Eguchi M, Hikono H, Kusumoto M, Shimoji Y : Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *J Microbiol Meth*, 117, 11-13 (2015)
- [3] 神田 章, 小林千恵, 矢彦沢小百合, 長井伸也 : 新しい遺伝型を示す豚丹毒菌が分離された敗血症型豚丹毒の発生事例, *獣医畜産新報*, 64, 905-909 (2011)
- [4] To H, Sato H, Tazumi A, Tsutsumi N, Nagai S, Iwata A, Nagano T : Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan, *J Vet Med Sci*, 74, 949-953 (2012)
- [5] Shimoji Y, Mori Y, Hyakutake K, Sekizaki T, Yokomizo Y : Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas, *J Clin Microbiol*, 36, 86-89 (1998)
- [6] Shiraiwa K, Ogawa Y, Nishikawa S, Kusumoto M, Eguchi M, Shimoji Y : Single nucleotide polymorphism genotyping of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs affected with chronic erysipelas in Japan, *J Vet Med Sci*, 79, 699-701 (2017)
- [7] Makino S, Ishizaki H, Shirahata T, Fujiwara S, Sawada T : Isolation of acriflavine resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* from slaughter pigs in Japan, *J Vet Med Sci*, 60, 1017-1019 (1998)
- [8] Nagai S, To H, Kanda A : Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of a hypervariable region in the *spaA* gene: discrimination of a live vaccine strain from field isolates, *J Vet Diagn Invest*, 20, 336-342 (2008)

- [9] Uchiyama M, Yamamoto K, Ochiai M, Yamamoto T, Hirano F, Imamura S, Nagai H, Ohishi K, Horiuchi N, Kijima M : Prevalence of Met-203 type spaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan, *Biologicals*, 42, 109-113 (2014)
- [10] Janßen T, Voss M, Kühl M, Semmler T, Philipp HC, Ewers C : A combinational approach of multilocus sequence typing and other molecular typing methods in unravelling the epidemiology of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains from poultry and mammals, *Vet Res*, 46, 84 (2015)
- [11] Ogawa Y, Shiraiwa K, Ogura Y, Ooka T, Nishikawa S, Eguchi M, Hayashi T, Shimoji Y : Clonal Lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Responsible for Acute Swine Erysipelas in Japan Identified by Using Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Analysis, *Appl Environ Microb*, 83, e00130-17 (2017), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440707/>), (accessed 2018-07-30)
- [12] Borrathybay E, Gong FJ, Zhang L, Nazierbieke W : Role of surface protective antigen A in the pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065, *J Microbiol Biotechn*, 25, 206-216 (2015)
- [13] Harada T, Ogawa Y, Eguchi M, Shi F, Sato M, Uchida K, Nakayama H, Shimoji Y : Phosphorylcholine and SpaA, a choline-binding protein, are involved in the adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to porcine endothelial cells, but this adherence is not mediated by the PAF receptor, *Vet Microbiol*, 172, 216-222 (2014)

---

### Characterization of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Strains Isolated from Pigs Affected with Chronic Swine Erysipelas

Koko OSHIMA, Kazuya HARUTA, Mikiko KIKUCHI, Rikako TAKAHASHI  
and Kenichi YAMAGUCHI<sup>†</sup>

\*Akita City Meat Hygiene Inspection Office, 2-6 Douzaka Jinnai Kawabe,  
Akita-shi, 019-2631, Japan

#### SUMMARY

Swine erysipelas is an infectious disease caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae*, and the live vaccine strain has been suspected of involvement in the onset of chronic cases. Of the 46 *E. rhusiopathiae* isolates from cases of chronic (arthritis and endocarditis) or subacute (urticaria) swine erysipelas at an abattoir, 32 were found to be vaccine strains and 14 were wild-type strains. Of the 32 vaccine strains, 5 were derived from cases of endocarditis and urticaria. PCR was used to identify the vaccine strains by detecting the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the vaccine strain. The method was found to be simple with easy judgement of positive and negative results. Sequence analysis of the 432 bp hypervariable region of the SpaA (surface protective antigen A) of the 14 wild-type strains identified two Met-203 type strains (serovar 1a), which are currently prevalent in Japan. The analysis also revealed that nine strains (serovar 2) displaying the same SNPs as the strains isolated in other prefectures, which might warrant further research on the epidemiological relationships between the strains.

—Key words : *Erysipelothrix rhusiopathiae*, live vaccine strain, SNP-based PCR assay, hyper variable region of SpaA.

<sup>†</sup> Correspondence to : Kenichi YAMAGUCHI (Akita City Meat Hygiene Inspection Office)

2-6 Douzaka Jinnai Kawabe, Akita-shi, 019-2631, Japan

TEL 018-882-2395 FAX 018-882-2126 E-mail : [ac050679@city.akita.lg.jp](mailto:ac050679@city.akita.lg.jp)

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 745~749 (2019)