

豚細菌性心内膜炎及び扁桃由来 *Streptococcus suis* の 病原関連遺伝子プロファイリング

市川 隆[†] 丹羽 毅 中西俊明

名古屋市食肉衛生検査所 (〒 455-0027 名古屋市港区船見町 1-39)

(2017年6月21日受付・2017年11月1日受理)

要 約

疾病リスクの高い *Streptococcus suis* 株の侵淫状況を調査するため、名古屋市内と畜場に搬入された豚の細菌性心内膜炎病巣部及び扁桃から分離した *S. suis* 各 119 株 (33 農家) 及び 78 株 (27 農家) について、PCR 法により血清型別 (莢膜合成遺伝子 *cps*)、推定 multilocus sequence typing (pST 型) 及び病原性関連遺伝子のプロファイリングを行った。細菌性心内膜炎からは、疾病リスクが高いと推定される *cps2J+* の pST1c 及び pST27c 株が 102 株 (30 農家) 85.7% と高率に検出された。*cps2J+* 株の pST 型は、農家ごとに ST1c あるいは ST27c に偏る傾向がみられたが、各 pST 型株が検出された農家数には差は認められず、両 pST 型が同程度に侵淫していることが示された。*cps2J+* 株の遺伝子プロファイルは、人患者からも分離される pST1c/*epf+/sly+/mrp+* 及び pST27c/*epf-/sly-/mrp+* 型が多数を占め、豚を取り扱う関係者への啓発が重要であると思われた。

——キーワード：PCR, 豚細菌性心内膜炎, 豚扁桃, *Streptococcus suis*, 病原関連遺伝子プロファイリング。

-----日獣会誌 71, 193~197 (2018)

と畜検査時にしばしば認められる豚の細菌性心内膜炎は、古くは慢性型豚丹毒として知られていたが、1970年に富田ら [1] が、本症からは豚丹毒菌よりもむしろレンサ球菌が分離されることが多いと報告した。また、われわれ [2] は 1980 年代後半からレンサ球菌の中でも血清群 C 群や L 群菌に代わり *Streptococcus suis* が多く分離されるようになったことを報告した。現在では細菌性心内膜炎から検出されるレンサ球菌のほとんどが *S. suis* であり、豚敗血症の主要な原因菌となっている。本菌は細菌性心内膜炎のみならず、豚の扁桃を中心とした上部気道などから分離されることがあり、これらの保菌豚が他の豚への感染源となり得る。

本菌はまた、人にも髄膜炎や敗血症を引き起こすことがあり、特に豚肉産業に関連した人獣共通感染症の原因菌としても認識されている [3]。しかしその病原性は、強毒株からほとんど無毒な株まで存在することから、多様な菌株の中から疾病リスクの高い菌株を見分けて、その地域で浸潤しているタイプを把握することは家畜衛生上及び公衆衛生上重要である [4]。

豚に保菌されている *S. suis* 株のさまざまな血清型の中でも 2 型株が疾病に関係する可能性が高い [3, 5] とされているが、すべての 2 型株が強毒というわけでもなく、血清型別だけでその病原性を識別することは難しい。近年行われるようになった multilocus sequence typing (MLST) 法は、疾病リスクの高い *S. suis* 株の識別に有効な方法である。豚に髄膜炎や敗血症などを引き起こした菌株や人 *S. suis* 感染症由来株の多くが ST1 complex (以下, ST1c) 及び ST27 complex (以下, ST27c) に含まれていることから、ST1c 及び ST27c は最も強毒な株集団だと考えられている [4, 6, 7]。しかし、MLST 法は 1 株につき 7 種類の遺伝子の塩基配列を決定する必要があり、多くの検体を解析する方法には適していない。近年 Takamatsu ら [8] は、3 種の線毛関連遺伝子の有無を PCR で確認するプロファイリング法によって、MLST 法による ST1c 及び ST27c に属する株の迅速、簡便な識別推定法を報告した。また、本菌の病原因子についてはまだ明らかになっていないが、いくつかの病原性関連遺伝子がマーカーとして調べられてい

[†] 連絡責任者：市川 隆 (名古屋市食肉衛生検査所)

〒 455-0027 名古屋市港区船見町 1-39

☎ 052-611-4929 FAX 052-611-7566

E-mail : a6114929@kenkofukushi.city.nagoya.lg.jp

る [3, 9, 10]. そこで本研究では、疾病リスクの高い菌株の浸淫状況を調査することを目的に、当所に搬入された豚の細菌性心内膜炎病巣部及び同病巣を有していない豚の扁桃から検出された *S. suis* 株について、いくつかの遺伝子型別を行った。

材料及び方法

供試菌株：細菌性心内膜炎由来の *S. suis* 株は、2004年3月～2007年6月及び2014年4月～2016年3月に、名古屋市内と畜場に搬入され細菌性心内膜炎を呈した豚のうち119頭(33農家)の細菌性心内膜炎病巣部から検出された119株を用いた。扁桃由来株は、2014年4月から2015年3月の間に搬入された細菌性心内膜炎を認めない豚152頭(36農家)の扁桃を検査し、27農家(75.0%)の78頭(51.3%)から分離された78株を用いた。*S. suis* の分離は、細菌性心内膜炎由来株は細菌性心内膜炎病巣部を5%馬血液加寒天培地に塗抹し、37℃で24時間好気・嫌気培養(アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学株, 東京), 扁桃由来株は扁桃をストレプトコッカス選択サプリメント(関東化学株, 東京)を添加した同培地に塗抹し、37℃で24時間炭酸ガス培養(アネロパック・CO₂, 三菱ガス化学株, 東京)した。 α または β 溶血を呈するグラム陽性球菌で、カタラーゼ陰性を示す株について100℃, 20分間の熱処理でDNAを抽出し、PCR法により *recN* 陽性 [11] のものを *S. suis* と同定した。

血清型別：各血清型の莢膜合成遺伝子 (*cps*) を標的とし、29の血清型について各 multiplex PCR を実施した [12, 13]. そのうち *cps2J* は2型及び1/2型(1型と2型の両血清に反応する型)が、*cps1J* は1型及び14型がそれぞれ保有し、両型が陽性となる領域である。

推定 ST complex typing：3種の線毛関連遺伝子 (*sbp2*, *sep1*, *sgp1*) についてPCR法 [8] を実施し、*sbp2* のみ保有している菌株は推定 ST1c (以下, pST1c), *sgp1* のみ保有している菌株は推定 ST27c (以下, pST27c), それ以外はその他の ST 型と判定した。

病原性関連遺伝子検査：病原性関連遺伝子として報告されているマーカーのうち菌体外因子 extracellular factor, 細胞溶解毒素 *suilysin*, 細胞壁結合蛋白 *muramidase-released protein*, arginine deiminase system 及び血清白濁化因子 OFS をそれぞれコードする *epf*, *sly*, *mrp*, *arcA* [9] 及び *ofs* (1-4型) [10] を標的にPCRを行い、その有無をプロファイリングした。

検定方法：各菌株の検出率については、 χ^2 検定(Yatesの連続補正)で有意差を求めた。

成績

由来別分離株の血清型及び推定 ST 型 (表 1)：細菌性心内膜炎由来119株の血清型は、*cps2J+* の1/2 & 2

表 1 由来別分離株の血清型及び推定 ST 型

血清型 ¹⁾	細菌性心内膜炎由来株				扁桃由来株			
	株数 (農家 数)	推定 ST 型			株数 (農家 数)	推定 ST 型		
		pST1c	pST27c	その他		pST1c	pST27c	その他
<i>cps2J+</i>	102 (30)	41 (18)	61 (17)		20 (11)	14 (7)	6 (5)	
<i>cps1J+</i>	1 (1)	1 (1)			4 (3)	2 (1)		2 (2)
3 型					7 (7)		3 (3)	4 (4)
4 型					7 (6)			7 (6)
5 型					2 (2)			2 (2)
6 型					2 (2)	1 (1)		1 (1)
7 型					1 (1)			1 (1)
8 型					1 (1)			1 (1)
9 型					1 (1)	1 (1)		
10 型					1 (1)			1 (1)
11 型					1 (1)	1 (1)		
15 型					3 (3)	2 (2)		1 (1)
16 型	2 (2)			2 (2)	3 (3)			3 (3)
21 型	1 (1)	1 (1)						
23 型					1 (1)			1 (1)
25 型	1 (1)			1 (1)	1 (1)			1 (1)
28 型					1 (1)			1 (1)
30 型					1 (1)			1 (1)
31 型					7 (6)			7 (6)
UT	12 (8)	3 (3)	9 (5)		14 (9)	1 (1)	2 (2)	11 (7)
合計	119 (33)	46 (20)	70 (18)	3 (3)	78 (27)	22 (9)	11 (8)	45 (22)

1) *cps2J*: 1/2 & 2型, *cps1J+*: 1 & 14型, UT: 型別不能

型が102株(85.7%)と多数を占め、その他の血清型は5株(4.2%)のみであった。推定 ST 型は pST27c が70株(58.8%), pST1c が46株(38.7%)とこの2つの型で97.5%を占めていた。一方、扁桃由来78株では多種類の血清型が分離されたが、血清型は *cps2J+* 株が20株(25.6%), 推定 ST 型は pST1c が22株(28.2%),

表2 細菌性心内膜炎由来株の農家別の血清型及び推定ST型

農家	供試株数	血清型 ¹⁾			推定ST型		
		<i>cps2J+</i>	その他	UT	pST1c	pST27c	その他
A	35	30	1		1		30
				4		4	
B	6	5			4	1	
				1	1		
C	6	4			3	1	
			2		1		1
D	6	4			2	2	
				2		2	
E	6	5				5	
				1		1	
F	4	4			4		
G	4	4			4		
H	4	4			3	1	
I	4	4				4	
J	4	4				4	
K	3	3			3		
L	3	3			3		
M	3	3			3		
N	3	2			2		
				1	1		
O	3	3				3	
P	3	3			1	2	
Q	2	2			2		
R	2	2			2		
S	2	2				2	
T	2	1				1	
				1		1	
U	2	1				1	
			1				1
その他 ²⁾							
5農家	5	5			5		
4農家	4	4				4	
3農家	3			2	1	1	
			1				1
合計	119	102	5	12	46	70	3

1) *cps2J+* : 1/2 & 2型, UT : 型別不能
 2) 1株のみ分離された農家

pST27cが11株(14.1%)で合わせて42.3%と、いずれも細菌性心内膜炎由来株に比べて少なかった ($P < 0.01$)。なお、細菌性心内膜炎由来の12株(10.1%)、扁桃由来の14株(17.9%)は血清型別できなかった。細菌性心内膜炎由来株を年度別に分け検討したが、この期間では血清型及び推定ST型ともにその割合に特に大きな変化

表3 由来別の病原関連遺伝子保有状況

推定ST型	血清型 ¹⁾	病原性関連遺伝子 ²⁾				株数(農家数)	
		<i>epf</i>	<i>sly</i>	<i>mrp</i>	<i>ofs</i>	細菌性心内膜炎由来株	扁桃由来株
<i>cps2J+</i>		+	+	-	1型	2 (2)	0
		+	+	+	1型	39 (17)	14 (7)
		+	+	+	1型	2 (2)	2 (1)
pST1c	その他	その他 ³⁾			1型・2型・4型	0	5 (5)
	UT	+	+	+	1型	3 (3)	0
		その他			1型	0	1 (1)
pST27c	<i>cps2J+</i>	-	-	+	4型	1 (1)	0
		-	-	+	3型	60 (16)	6 (5)
	その他	-	-	+	3型	0	3 (3)
	UT	-	-	+	3型	8 (4)	0
		-	-	-	1型・2型	1 (1)	2 (2)
その他	その他	その他			1型・2型・3型・4型	3 (3)	34 (18)
	UT	その他			2型・3型・4型	0	11 (7)
合計						119 (33)	78 (27)

1) *cps2J+* : 1/2 & 2型, UT : 型別不能
 2) *arcA* はすべて+ 3) + + +, - - + 以外

はみられなかった。

農家別にみた細菌性心内膜炎由来株の血清型及び推定ST型(表2) : 細菌性心内膜炎由来株の推定ST型は、農家ごとにpST1cまたはpST27cに偏る傾向がみられた。*cps2J+*株を分離した30農家のうち、pST1c型は18農家(60.0%)、pST27c型は17農家(56.7%)から分離されており、両者に差は認められなかった。また、pST1cとpST27c型株がともに分離された農家が5農家あった。最も多くの35株を供試したA農家は、*cps2J+*の30株及び血清型別不能(以下、UT)の4株すべてがpST27c型であった。一方、扁桃由来株では農家によって分離血清型や推定ST型が偏る傾向は認められなかった。

病原性関連遺伝子検出状況(表3) : *arcA*は供試したすべての菌株が陽性であった。細菌性心内膜炎由来株のpST1c型株では、*cps2J+*の18農家由来41株のうち、17農家由来39株(95.1%)が*epf+/sly+/mrp+/ofs1*のプロファイルを示した。また、その他の血清型(1&14型及び21型)の2農家由来2株及び血清型UT株の3農家由来3株もすべて同じプロファイルであった。pST27c型株では、17農家由来61株のうち16農家由

来 60 株 (98.4%) が *epf/sly/mrp+/ofs3* のプロファイルを示し、血清型 UT の 4 農家由来 8 株も同様のプロファイルを示した。一方、扁桃由来の 78 株では多くのパターンを示したが、8 農家由来 16 株 (20.5%) が pST1c/*epf+/sly+/mrp+/ofs1*, 6 農家由来 9 株 (11.5%) が pST27c/*epf/sly-/mrp+/ofs3* のプロファイルを示した。

考 察

当所に搬入される豚における疾病リスクの高い *S. suis* 株の侵淫状況を調査するために、細菌性心内膜炎及び扁桃から検出された *S. suis* 株について、血清型、推定 ST 型及びいくつかの病原性関連遺伝子マーカーについて検討した。

細菌性心内膜炎からは血清型では 2 型と推測される *cps2J+* 株が 85.7%、推定 ST 型では pST1c と pST27c が合わせて 97.5% と扁桃由来株に比べ高率に検出された。今回の ST 型別は推定ではあるが、これまでの報告 [5, 8] と同様に血清型 2 型及び pST1c・pST27c 型株と疾病との関連が改めて示されるとともに、これらの菌株がこの地域に広く侵淫していることが示された。

細菌性心内膜炎由来の *cps2J+* 株の推定 ST 型は、農家ごとに pST1c または pST27c に偏る傾向が認められたが、これは農家内で同一菌株の汚染が維持されていることを示すものと思われた。*cps2J+* の pST1c 及び pST27c 型株は、細菌性心内膜炎からはそれぞれ 18 農家及び 17 農家から、また扁桃からもそれぞれ 7 農家及び 5 農家から分離され両推定 ST 型株の分離率に差がみられなかったことから、*cps2J+* の pST1c 型と pST27c 型株が同程度に浸潤していることが示唆された。またこの傾向は、今回の調査期間中においては年次的な変化がないことも示された。

病原性関連遺伝子プロファイルはこれまでの報告 [5, 14] と同様に、pST1c 型株では *epf+/sly+/mrp+*, pST27c 型株では *epf/sly-/mrp+* のプロファイルを示す菌株が多数を占めた。人患者からの分離株は、わが国ではその多くが血清型 2 型の ST1c 株であり [6]、さらに 2005 年に中国四川省で 215 名が感染し 39 名が死亡した大規模発生事例では *cps2J+/epf+/sly+/mrp+* 型株が原因 [14] となっていることから、今回分離された *cps2J+* の pST1c/*epf+/sly+/mrp+* 型株は今後も公衆衛生上重要なタイプの株であると考えられた。

また血清型 2 型の ST27c 型株はわが国の人患者からの分離例は少ない [6] もの、タイにおいては人患者からは *cps2J+/epf/sly-/mrp+* 型株が最も多く分離されている [7, 15] ことから、今後わが国においても公衆衛生上このプロファイルを示す菌株の動向を注視していく必要がある。

S. suis の血清白濁化因子 OFS の遺伝子には少なくと

も 4 種類の変異体 (1-4 型 *ofs*) が存在し、そのうち 1 型 *ofs* は ST1c に株に偏って分布し、1 型 OFS は ST1c に属する *S. suis* 株をより強毒にしている因子の一つであることが示唆されている [10]。今回も細菌性心内膜炎由来の pST1c 型の 46 株はすべて 1 型 *ofs* であり同様の結果が認められた。一方、pST27c 型の 70 株では 2 型及び 4 型 *ofs* の各 1 株を除く 68 株が 3 型 *ofs* であった。3 型及び 4 型 *ofs* では、点突然変異や挿入配列 (IS element) の挿入により血清を白濁する活性を発現しないとされている [10] ため、本型株の病原性には OFS 以外の因子が関与しているものと思われた。

細菌性心内膜炎から少数ではあるが *cps2J+* 以外の血清型や UT 株で、pST1c/*epf+/sly+/mrp+* や pST27c/*epf/sly-/mrp+* のプロファイルを示す株が検出された。これらの株については MLST 法を行うなどの詳細な検討が必要と思われたが、野外分離株の中には既報の血清型に当てはまらない型別不能株が多数存在する [3] ともいわれている。現在市販されているワクチンは血清型 2 型のみにも効果を有するため、今後ワクチンの普及に伴いその選択圧などにより異なる血清型や新たな血清型の台頭の可能性も考えられ、継続した調査が必要と思われた。

今回最も多くの株を供試した A 農家は、2015 年度になって細菌性心内膜炎の摘発率が急増し衛生管理の失宜が疑われた。供試した 2015 年度の細菌性心内膜炎由来 34 株のうち 29 株が pST27c 型で *cps2J+/epf/sly-/mrp+/ofs3* 型であった。しかし 2014 年度に A 農家の扁桃から分離された 6 株には該型株は認められず、2015 年度になって新たに侵入した可能性も考えられた。今後、繁殖用豚を含めた保菌状況や農場施設での調査など、農家の担当獣医師と連携して家畜衛生、公衆衛生の両面から防疫対策に努めていきたい。

以上のように、今回の研究では A 農家からの分離株が 29.4% を占めており、単一農家汚染菌株の検査結果が研究全体に影響を及ぼしていることも考えられるが、この地域の養豚農家においては *S. suis* の中でも疾病リスクが高いと推定される *cps2J+* の pST1c/*epf+/sly+/mrp+* 及び pST27c/*epf/sly-/mrp+* 型株が、農家ごとに偏る傾向があるものの同程度に侵淫しており、またその割合は調査を行った 2004 年以降変化が認められないことが示された。

S. suis は、本菌に感染した豚や汚染された豚肉に接触した際に、皮膚の外傷を介して人に感染すると考えられており、厚生労働省は 2005 年に中国四川省での事件を受けて「豚レンサ球菌感染症に係ると畜業者等への注意喚起について」により、と畜業者等への感染予防対策の徹底を通知した。今後さらに衛生講習会等を通じて従事者への衛生教育を実施することが重要と思われた。

引用文献

- [1] 富田 忍, 野尻秀雄, 大脇正治, 後藤正和: 豚の心内膜炎よりのレンサ球菌分離, 日獣会誌, 23, 608-612 (1970)
- [2] 市川 隆, 近藤東師, 山原照生: 心内膜炎罹患豚から分離されたレンサ球菌, 日獣会誌, 44, 153-157 (1991)
- [3] 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)
- [4] 高松大輔: 線毛関連遺伝子のプロファイリングによる疾病リスクの高い *Streptococcus suis* 株の識別, 日獣会誌, 64, 600-603 (2011)
- [5] 土屋祐司, 佐藤貞雄: と畜場に搬入された豚から検出された *Streptococcus suis* の疫学的検討, 日獣会誌, 62, 563-567 (2009)
- [6] Chang B, Wada A, Ikebe T, Ohnishi M, Mita K, Endo M, Matsuo H, Asatuma Y, Kuramoto S, Sekiguchi H, Yamazaki M, Yoshikawa H, Watabe N, Yamada H, Kurita S, Imai Y, Watanabe H: Characteristics of *Streptococcus suis* isolated from patients in Japan, Jpn J Infect Dis, 59, 397-399 (2006)
- [7] Thravichitkul P, Wongsawan K, Takenami N, Pruksakorn S, Fongcom A, Gottschalk M, Khanthawa B, Supajatura V, Takai S: Correlation between PFGE group and *mrp/epf/sly* genotypes of human *Streptococcus suis* serotype 2 in Northern Thailand, J Pathogens, 2014, Article ID 350416 (2014), (online), (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/350416>), (accessed May 16, 2017)
- [8] Takamatsu D, Nishio H, Ishiji T, Ishiji J, Osaki M, Fittipaldi N, Gottschalk M, Thravichitkul P, Takai S, Sekizaki T: Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*, Vet Microbiol, 138, 132-139 (2009)
- [9] Silva LMG, 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)
- [10] Takamatsu D, Osaki M, Thravichitkul P, Takai S, Sekizaki T: Allelic variation and prevalence of serum opacity factor among the *Streptococcus suis* population, J Med Microbiol, 57, 488-494 (2008)
- [11] Ishida S, Tien le HT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T: Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*, J Microbiol Meth, 107, 66-70 (2014)
- [12] 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 Lett, 218, 79-84 (2003)
- [13] Kerdsin A, Akeda Y, Hatrongjit R, Detchawna U, Sekizaki T, Hamada S, Gottschalk M, Oishi K: *Streptococcus suis* serotyping by a new multiplex PCR, J Med Microbiol, 63, 824-830 (2014)
- [14] Yu H, Jing H, Chen Z, Zheng H, Zhu X, Wang H, Wang S, Liu L, Zu R, Luo L, Xiang N, Liu H, Liu X, Shu Y, Lee SS, Chuang SK, Wang Y, Xu J, Yang W: Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China, Emerg Infect Dis, 12, 914-920 (2006)
- [15] Takamatsu D, Wongsawan K, Osaki M, Nishino H, Ishiji T, Thravichitkul P, Khantawa B, Fongcom A, Takai S, Sekizaki T: *Streptococcus suis* in humans, Thailand, Emerg Infect Dis, 14, 181-183 (2008)

Virulence-Associated Gene Profiling of *Streptococcus Suis* Isolated from Porcine Bacterial Endocarditis and TonsilsTakashi ICHIKAWA[†], Tsuyoshi NIWA and Toshiaki NAKANISHI

*Nagoya City Meat Hygiene Inspection Laboratory, 1-39 Funami-cho, Minato-ku, Nagoya, 455-0027, Japan

SUMMARY

To investigate the state of invasive *Streptococcus suis* strains at higher risk of causing disease, *S. suis* strains isolated from bacterial endocarditis (119 strains from 33 farms) and tonsils (78 strains from 27 farms) of pigs carried into slaughterhouses in Nagoya City were profiled by serotyping (*cps*), putative multilocus sequence typing (pST typing) and PCR sequencing of virulence-related genes. From endocarditis, the pST1c and pST27c strains of *cps2J+*, which estimated to be high risk strains, had a high rate of detection at 85.7% (102 strains from 30 farms). The pST type of *cps2J+* strains tended to be biased toward pST1c or pST27c for each farm. In addition, there was no difference in the number of farms from which pST1c or pST27c strains were isolated, suggesting that both pST types were equally invasive. Because the genetic profile of the *cps2J+* isolates have been largely detected in pST1c/*epf+/sly+/mrp+* and pST27c/*epf-/sly-/mrp+*, which were also detected in human patients, it seemed important to share with people who handle pigs. — Key words: PCR assay, porcine bacterial endocarditis, porcine tonsil, *Streptococcus suis*, virulence-associated gene profiling.

[†] Correspondence to: Takashi ICHIKAWA (Nagoya City Meat Hygiene Inspection Laboratory)

1-39 Funami-cho, Minato-ku, Nagoya, 455-0027, Japan

TEL 052-611-4929 FAX 052-611-7566 E-mail: a6114929@kenkofukushi.city.nagoya.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 193~197 (2018)