

## 哺乳豚の *Streptococcus suis* 血清型 14 型による髄膜炎 及び心外膜炎を呈した豚レンサ球菌症

船守足穂<sup>1)</sup> 伊藤弘貴<sup>2)</sup> 河村美登里<sup>1)</sup> 細川久美子<sup>1)</sup>  
鈴藤 和<sup>1)</sup> 大倉正稔<sup>3)</sup> 芝原友幸<sup>3),4)†</sup>

- 1) 広島県西部家畜保健衛生所 (〒739-0013 東広島市西条御条町1-15)  
2) 広島県東部家畜保健衛生所 (〒720-8511 福山市三吉町1-1-1)  
3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)  
4) 大阪府立大学生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)

(2019年1月22日受付・2019年4月16日受理)

### 要 約

広島県内の一養豚農場で死産及び神経症状を呈する産子が散発した。2頭の剖検では心臓に線維素析出を認め、組織学的にはグラム陽性球菌を伴う化膿性髄膜炎及び線維素化膿性心外膜炎を認めた。主要臓器からは *Streptococcus suis* 血清型 14 型が分離され、脳、脊髄及び心臓の病変部にみられたグラム陽性球菌は *S. suis* 血清型 14 型に対する特異的抗体に陽性反応を示した。分離菌株はすべてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で同一パターンを示し、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) では Sequence Type 1 (ST1) に型別されたことから、本症例を同一クローン由来の *S. suis* 血清型 14 型 ST1 株による豚レンサ球菌症と診断した。本症例は、国内で初めて *S. suis* 血清型 14 型を免疫組織化学的染色により確定診断した貴重な症例であると考えられた。

——キーワード：豚，レンサ球菌症，*Streptococcus suis* 血清型 14 型。

-----日獣会誌 72, 533~538 (2019)

*Streptococcus suis* は、豚に髄膜炎、敗血症、心内膜炎等を引き起こす豚レンサ球菌症の主要な原因菌であり、養豚産業に多大な経済的被害を及ぼしている [1, 2]。また、本菌は公衆衛生分野においても重要であり、2005年に中国の四川省において215人が *S. suis* に感染し、うち39人が死亡した集団感染事例を契機に、人獣共通感染症としても世界的に注目度が高まっている [1, 3-5]。

本菌は、菌体表層の莢膜多糖の抗原性により30種類以上の血清型に分類されているが、一部血清型参考株は別菌種に再分類された (血清型 32 及び 34 型参考株は *Streptococcus orisratti* に修正、血清型 20, 22 及び 26 型参考株は *Streptococcus parasuis* に、血清型 33 型参考株は *Streptococcus ruminantium* に再分類) [6-9]。国内及び海外で人及び豚から分離された *S. suis* の主要

な血清型は2型である。特に人の患者からの分離株は血清型2型が多く、ほかの血清型株はほとんど分離されていない [10]。しかし、国内での報告はまだないが、アジアではタイを中心に台湾やベトナムで血清型14型株による人の感染事例が複数報告されており、臨床現場における重要度が高まっている [1, 10-12]。

今回、広島県内の一養豚場において *S. suis* 血清型 14 型による豚レンサ球菌症が発生したので、その概要を報告する。

### 材料及び方法

**発生状況と材料**：2018年2月、広島県内の母豚約270頭規模の一貫経営農場において、死産や産子の神経症状が発生した。抗菌薬による治療は実施しておらず、同様の症状が続発したため、同年3月病性鑑定を実施し

† 連絡責任者：芝原友幸 (国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7774 E-mail: tshiba@affrc.go.jp

た。起立困難及び遊泳運動等の特に重篤な症状を示していた子豚 2 頭 (No. 1 : 22 日齢, No. 2 : 10 日齢) を材料として、以下の検査を実施した。

**病理学的検査：**剖検後、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液により固定し、定法に従いパラフィン包埋・薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及びグラム染色を行った。

**免疫組織学的染色：**グラム陽性球菌を認めた脳、脊髄及び心臓の組織切片について、抗 *S. suis* type 2 NCTC10234 株と抗 *S. suis* type 14 13730 株家兔血清を一次抗体として染色を行った。

**細菌学的検査：**脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、脾臓及び腎臓の乳剤について、5% 馬血液加寒天培地 (ミューラーヒントン寒天培地 (関東化学株, 東京) に馬脱繊維血液 (コスモ・バイオ株, 東京) を添加)、チョコレート寒天培地 (GC 寒天基礎培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京) に牛ヘモグロビン粉末 (日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京) 及びイソビタール X 強化剤 (日本ベクトン・ディッキンソン株, 東京) を添加)、DHL 寒天培地 (栄研化学株, 東京) を用いて好気条件もしくは 7.5% 炭酸ガス条件下で 24~72 時間、定量培養を行った。分離菌株はレンサ球菌同定用キット (ラピッド ID32 ストレップ アピ, ビオメリュー・ジャパン株, 東京)、ヘモフィルス属菌同定用キット (ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」, 日水製薬株, 東京) 及び *recN* 遺伝子を標的とした PCR [13] により同定を行った。

**血清型別：**2 頭から分離された *S. suis* 計 12 株 (脳及び脊髄由来 : 1 頭当たり各 2 株, 心臓及び肺由来 : 1 頭当たり各 1 株) について、型別用抗血清及び *S. suis* 菌体表層の莢膜多糖構造をコードする関連遺伝子群 (capsular polysaccharide synthesis gene cluster) を標的とした PCR [14] により血清型別を行った。

**遺伝子型別：**上記血清型別に供した *S. suis* について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を Arai ら [15] の方法を改変して行った。改変は、制限酵素 Swa I (ニュー・イングランド・バイオラボ・ジャパン株, 東京) を用いたこと、及び 1.2% アガロースゲルを用いて電圧 6.0V/cm、パルスタイム 1~20 秒、泳動時間 18 時間の条件下で行ったことである。また、*aroA*・*cpn60*・*dpr*・*gki*・*mutS*・*recA*・*thrA* の 7 遺伝子による Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 解析を行った [16]。

**ウイルス学的検査：**脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓及び扁桃の乳剤について、CPK-NS 細胞及び Vero 細胞を用いて各 3 代継代し、ウイルス分離培養を行った。

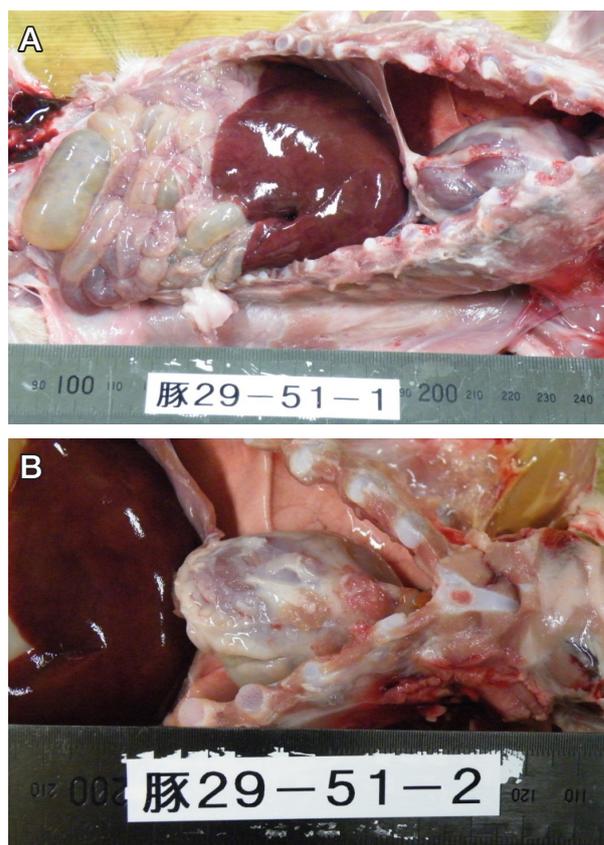


図 1 心臓剖検所見  
2 頭に共通して、線維素の析出が認められる。  
A : No. 1 (22 日齢) B : No. 2 (10 日齢)

## 成 績

**病理解剖所見：**2 頭ともに、心臓に線維素析出を認めた (図 1)。No. 1 の病変は比較的軽度であったが、No. 2 は重度であった。また、No. 2 の左肺前葉に軽度の肝変化を認めた。

**病理組織学的所見：**脳及び脊髄では、髄膜にグラム陽性球菌を伴う好中球及びマクロファージの浸潤を認め (図 2)、心臓では心外膜の肥厚、線維素の析出及びグラム陽性球菌を伴う好中球及びマクロファージの浸潤を認めた (図 3)。また、No. 2 の左肺前葉の肝変化部分において、細気管支及び肺胞内に局限して好中球及びマクロファージの浸潤等軽度の化膿性病変を認めた。

**免疫組織学的染色：***S. suis* 血清型 2 型抗体に対する陽性反応は認められなかったが、*S. suis* 血清型 14 型抗体に対しては陽性反応が確認された (図 4)。

**細菌学的検査：**2 頭の各臓器から *S. suis* が純培養状に分離されたほか、No. 2 の肺から *Haemophilus parasuis* が分離された (表)。

**血清型別：**分離菌株はすべて血清型 14 型に型別された。

**遺伝子型別：**分離菌株はすべて PFGE で同一の切断

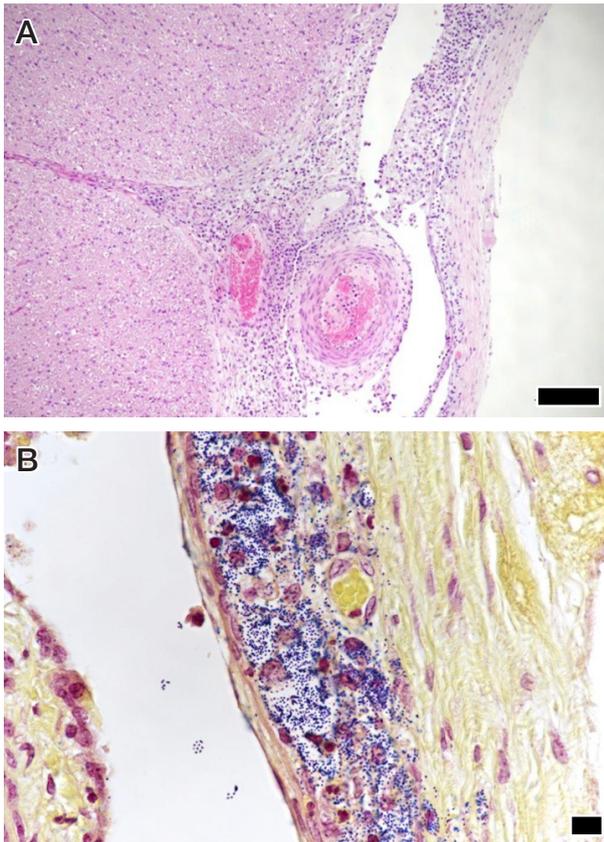


図2 脊髄の病理組織学的所見

- A: No. 1 化膿性髄膜炎. 髄膜に好中球及びマクロファージの浸潤が認められる (HE 染色 Bar=100µm).  
 B: No. 1 Aの病変部に一致してグラム陽性球菌が認められる (グラム染色 Bar=10µm).

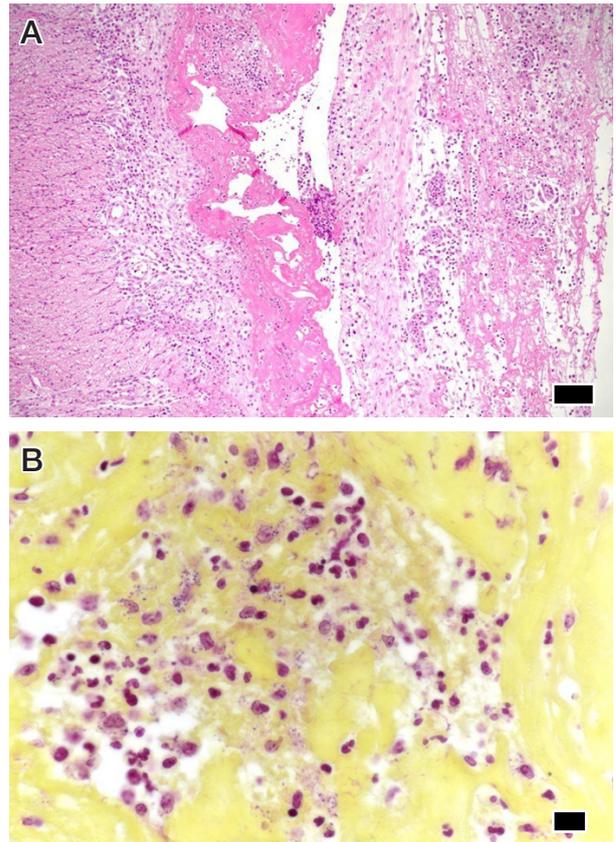


図3 心臓の病理組織学的所見

- A: No. 2 線維素化膿性心外膜炎. 心外膜の肥厚及び線維素の析出が認められ, 周囲には好中球及びマクロファージがみられる (HE 染色 Bar=100µm).  
 B: No. 2 Aの病変部に一致してグラム陽性球菌が認められる (グラム染色 Bar=10µm).

パターンを示し (図5), MLSTではSequence Type1 (allele types : *aroA/cpn60/dpr/gki/mutS/recA/thrA* =1/1/1/1/1/1) に型別された.

ウイルス学的検査: 2頭ともにウイルス分離陰性であった.

## 考 察

本症例を, *S. suis*による豚レンサ球菌症と診断した. しかし, グラム陽性球菌を認めた組織切片は *S. suis* 血清型2型抗体を用いた免疫組織化学的染色で陽性反応を示さなかったことから, 本症例には国内で主要な血清型2型以外の *S. suis* の関与が疑われ, 詳細な追加調査により, 分離菌株は同一クローン由来の血清型14型 ST1株と同定された. また, No.2の肺から分離された *H. parasuis* は一般に豚の呼吸器系に常在する細菌で, 免疫状態の悪化等により肺炎等を引き起こすことから [17], No.2の肺に局限した化膿性病変については, 本菌の関与が考えられた.

これまで, 国内で病豚から *S. suis* 血清型14型が分離

された事例は誌上では報告がなく, 本症例は国内で初めて *S. suis* 血清型14型を免疫組織化学的染色により確定診断した貴重な症例であると考えられた.

MLST型別は *S. suis* において最も広く用いられている型別法であり, 世界中の分離株で実施されている [10]. 現在, 1,000以上のSTが報告されており (*Streptococcus suis* MLST Databases, PubMLST, <https://pubmlst.org/ssuis/>), その型別結果から, 人患者由来株のほとんどはST1及び7遺伝子のうち6遺伝子がST1と同一なSTの集団である Clonal complex 1 (CC1) に型別されることが明らかになっている [2, 10, 16]. また, CC1には髄膜炎や敗血症等の重篤な症状を示した病豚由来株も多数含まれている [10, 16]. 以上から, CC1の *S. suis* は人獣共通感染症のリスクが高い公衆衛生及び家畜衛生上, 最も注意が必要な集団として認識されている. CC1の株の多くは血清型2型であるが, 血清型14型株も複数含まれる (*Streptococcus suis* MLST Databases, PubMLST, <https://pubmlst.org/ssuis/>).

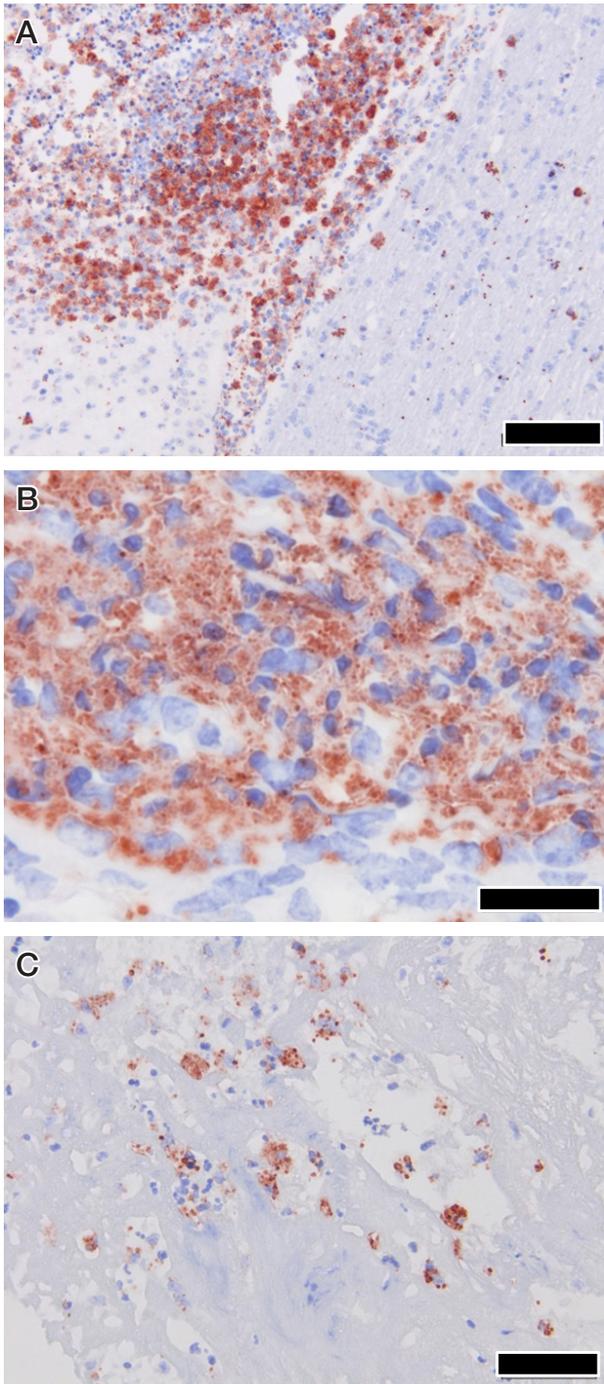


図4 *S. suis* 血清型 14 型抗血清を用いた免疫組織化学的染色

グラム陽性球菌に一致して、抗 *S. suis* type 14 13730 株家兎血清に対する陽性反応が認められる。

A : No. 1 脳 (Bar=100 $\mu$ m)

B : No. 1 脊髄 (Bar=20 $\mu$ m)

C : No. 1 心臓 (Bar=50 $\mu$ m)

表 細菌分離成績

部位	No. 1		No. 2	
	分離菌	菌量 (cfu/g)	分離菌	菌量 (cfu/g)
脳	<i>Streptococcus suis</i>	$4.6 \times 10^6$	<i>Streptococcus suis</i>	$1.1 \times 10^4$
脊髄	<i>Streptococcus suis</i>	$1.3 \times 10^6$	<i>Streptococcus suis</i>	$1.2 \times 10^4$
肺	<i>Streptococcus suis</i>	$1.8 \times 10^3$	<i>Streptococcus suis</i>	$1.1 \times 10^3$
			<i>Haemophilus parasuis</i>	$5.0 \times 10^3$
心臓	<i>Streptococcus suis</i>	$6.0 \times 10^4$	<i>Streptococcus suis</i>	$\geq 10^4$
肝臓	<i>Streptococcus suis</i>	$9.4 \times 10^3$	<i>Streptococcus suis</i>	$5.2 \times 10^3$
脾臓	<i>Streptococcus suis</i>	$1.2 \times 10^4$	<i>Streptococcus suis</i>	$\geq 10^4$
腎臓	<i>Streptococcus suis</i>	$1.1 \times 10^4$	<i>Streptococcus suis</i>	$1.3 \times 10^3$

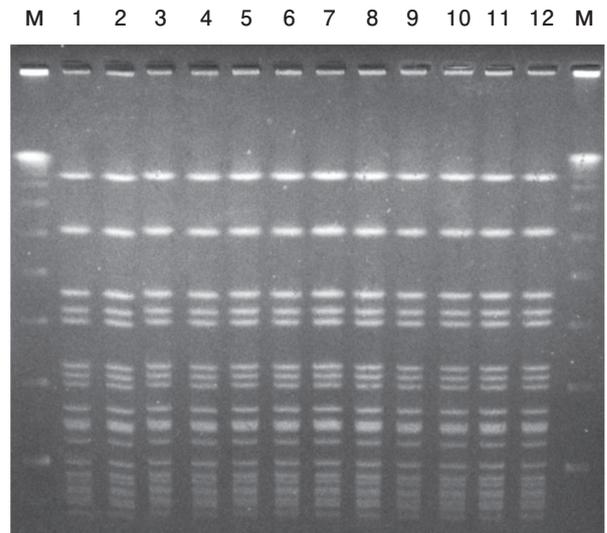


図5 PFGE 泳動像

2頭の脳、脊髄及び心臓から分離された *S. suis* は、すべて同一の切断パターンを示した。

1, 2 : No. 1 脊髄 7, 8 : No. 2 脊髄

3, 4 : No. 1 脳 9, 10 : No. 2 脳

5 : No. 1 肺 11 : No. 2 肺

6 : No. 1 心臓 12 : No. 2 心臓

M :  $\lambda$  Ladder

血清型 14 型による症例で分離株の MLST 型別が実施された例は少ないが、これまで人の患者では CC1 (ST1, ST2, ST6, ST105 及び ST127) の株による症例がタイ、中国、ベトナム、英国、オランダ及びカナダで、病豚では ST1 に型別された株による症例がスペイン及び英国で報告されている [10].

本研究で分離された株は ST1 に型別され、人獣共通感染症のリスクが高い強毒株と示唆されたため注意が必

要であるが [10, 18], 豚では一般に強毒株を保菌しても発症しない場合も多く, 発症要因はストレスや免疫状態の悪化等によると考えられていることから, 保菌豚による豚及び人への感染被害低減には, 飼養衛生管理面での発生予防対策が重要となる [1, 2]. 当該農場に対しては, 畜舎の清掃及び消毒等のさらなる徹底を指導した結果, 続発はなく平穩に推移している.

稿を終えるに当たり, 多くの助言をいただいた(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の小林 勝技師, 嶋田恵美技師に深謝する.

## 引用文献

- [1] Gottschalk M : Streptococcosis, Diseases of swine, Jeffrey JZ, Locke AK, Alejandro R, Kent JS, Gregory WS, eds, 10th ed, 841-855, Blackwell Publishing, Ames, Iowa (2012)
- [2] Gottschalk M, Xu J, Calzas C, Segura M : *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen?, *Future Microbiol*, 5, 371-391 (2010)
- [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] 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, and the *Streptococcus suis* study groups : Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China, *Emerg Infect Dis*, 12, 914-920 (2006)
- [5] Gomez-Torres J, Nimir A, Cluett J, Aggarwal A, Elsayed S, Soares D, Teatero S, Chen Y, Gottschalk M, Fittipaldi N : Human case of *Streptococcus suis* disease, Ontario, Canada, *Emerg Infect Dis*, 23, 2107-2109 (2017)
- [6] Okura M, Osaki M, Nomoto R, Arai S, Osawa R, Sekizaki T, Takamatsu D : Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*, *Pathogens*, 5, e45 (2016), (online), (<https://doi.org/10.3390/pathogens5030045>), (accessed 2019-8-23)
- [7] Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH : Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*, *Vet Microbiol*, 107, 63-69 (2005)
- [8] Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R : Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov, *Int J Syst Evol Micr*, 65, 438-443 (2015)
- [9] Tohya M, Arai S, Tomida J, Watanabe T, Kawamura Y, Katsumi M, Ushimizu M, Ishida-Kuroki K, Yoshizumi M, Uzawa Y, Iguchi S, Yoshida A, Kikuchi K, Sekizaki T : Defining the taxonomic status of *Streptococcus suis* serotype 33: the proposal for *Streptococcus ruminantium* sp. nov, *Int J Syst Evol Micr*, 67, 3660-3665 (2017)
- [10] Goyette-Desjardins G, Auger JP, Xu J, Segura M, Gottschalk M : *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing, *Emerg Microbes Infec*, 3, e45 (2014), (online), (<https://doi.org/10.1038/emi.2014.43>), (accessed 2019-8-23)
- [11] Kerdsin A, Oishi K, Sripakdee S, Boonkerd N, Polwichai P, Nakamura S, Uchida R, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S : Clonal dissemination of human isolates of *Streptococcus suis* serotype 14 in Thailand, *J Med Microbiol*, 58, 1508-1513 (2009)
- [12] Ye C, Bai X, Zhang J, Jing H, Zheng H, Du H, Cui Z, Zhang S, Jin D, Xu Y, Xiong Y, Zhao A, Luo X, Sun Q, Gottschalk M, Xu J : Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China, *Emerg Infect Dis*, 14, 787-791 (2008)
- [13] Ishida S, Tien LHT, 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)
- [14] Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M, Takamatsu D : Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*, *J Clin Microbiol*, 52, 1714-1719 (2014)
- [15] Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D : Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates, *Plos One*, 7, e33708 (2012), (online), (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033708>), (accessed 2019-8-23)
- [16] King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM : Development of a multi-locus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange, *J Clin Microbiol*, 40, 3671-3680 (2002)
- [17] Aragon V, Segales J, Oliveira S : Glasser's Disease, Diseases of swine, Jeffrey JZ, Locke AK, Alejandro R, Kent JS, Gregory WS, eds, 10th ed, 760-769, Blackwell Publishing, Ames, Iowa (2012)
- [18] 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)

Streptococcal Infection with Meningitis and Epicarditis Caused by *Streptococcus suis* serotype 14 in Suckling Pigs

Taruho FUNAMORI<sup>1)</sup>, Hiroataka ITOU<sup>2)</sup>, Midori KAWAMURA<sup>1)</sup>, Kumiko HOSOKAWA<sup>1)</sup>,  
Madoka SUZUTOU<sup>1)</sup>, Masatoshi OHKURA<sup>3)</sup>  
and Tomoyuki SHIBAHARA<sup>3), 4) †</sup>

- 1) *Western Center for Livestock Hygiene Service, Hiroshima Prefecture, 1-15 Saijogojo-cho, Higashi-Hiroshima, 739-0013, Japan*
- 2) *Eastern Center for Livestock Hygiene Service, Hiroshima Prefecture, 1-1-1 Miyoshi-cho, Fukuyama, 720-8511, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 4) *Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinkuourai-Kita, Izumisano, 598-8531, Japan*

SUMMARY

Stillbirth in sows and neurological symptoms in suckling pigs occurred sporadically on a pig farm in Hiroshima Prefecture. Fibrin deposits in the hearts were observed at the necropsies of two of the pigs. A histopathological examination of the principal organs of the two pigs revealed suppurative meningitis and fibrinous suppurative epicarditis due to gram-positive cocci. From the organs, three *Streptococcus suis* serotype 14 were isolated. In addition, immunostaining with the antiserum against *S. suis* serotype 14 was positive in the lesions of the brains, spinal cords and hearts. These *S. suis* serotype 14 isolates showed the same Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) pattern, and were classified into Sequence Type 1 by Multi-Locus Sequence Typing (MLST). In conclusion, we diagnosed these cases as streptococcal infections due to *S. suis* serotype 14, probably derived from the same clone. This is the first report on the cases caused by *S. suis* serotype 14 in Japan to be diagnosed by immunohistochemical examinations.

— Key words : pig, streptococcal infection, *Streptococcus suis* serotype 14.

† Correspondence to : Tomoyuki SHIBAHARA (National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization)

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL · FAX 029-838-7774 E-mail : tshiba@affrc.go.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 72, 533 ~ 538 (2019)