

## 11 既知の種に属さないレンサ球菌属菌が分離された牛肺炎

### 炎の一症例と分離株の性状

中央家畜保健衛生所

○荒井 理恵・中井 悠華・平野 晃司

#### I はじめに

牛のレンサ球菌症は乳房炎が最も良く知られているが、その他、流産、肺炎、心内膜炎や髄膜炎といった病態も報告されており、病性鑑定上、遭遇しうる疾病の一つである<sup>1-8)</sup>。これらの原因菌としては *Streptococcus agalactiae*、*S. uberis*、*S. bovis* や *S. suis* が分離されている<sup>1-8)</sup>。牛から分離される *S. suis* は様々な血清型(2、9、10、15、16、18、20 および 33 型)が報告されており<sup>5-11)</sup>、近年、注目されつつあるのが、血清型 33 型によるレンサ球菌症である。

*S. suis* にはこれまで 35 種類の血清型(1~34 および 1/2 型)が知られているが、一部の血清型参考株は分類学的に *S. suis* とは異なる菌種であることが示されている。32 および 34 型参考株は *S. orisratti* に既に再分類されており<sup>12)</sup>、20、22、26 および 33 型参考株も新菌種として提唱されようとしている<sup>13)</sup>。

33 型参考株は関節炎の羊から分離された株であり<sup>14)</sup>、反芻獣への病原性が示唆されている。近年では、呼吸器病や心内膜炎等を呈した牛からの 33 型菌またはその近縁菌の分離事例が国内で相次いで報告されている<sup>8, 15-17)</sup>。2014 年、埼玉県内では初めて、子牛の肺炎事例から 33 型参考株に近縁なレンサ球菌属菌が分離された。本稿では、症例の概要に加えて、33 型参考株・本県分離株・他県分離株の簡易同定キット成績を比較検討したので、その結果を報告する。

#### II 農家概要および発生状況

当該農家は黒毛和種の繁殖経営農家であり、繁殖牛 40 頭および育成牛・子牛 30 頭を飼育している。

今回、呼吸器病の発生は子牛 1 頭のみで認められた。当該牛は 2014 年 1 月 16 日に出生した。母牛がヨーネ病患者であったことから、出生直後に母子分離を行ったため、初乳は未摂取であった。出生後間もなく呼吸器症状を呈し始め、ニューキノロン系抗生物質や解熱剤等で治療するも改善せず、2014 年 4 月 15 日、死亡した。

### Ⅲ 材料および方法

#### 1 材料

当該牛の死体 1 体を、死亡当日、病性鑑定に供した。

#### 2 方法

##### (1) 剖検および病理組織学的検査

剖検後、定法に従い、病理組織標本を作製し、HE 染色・グラム染色を行った。

##### (2) 細菌学的検査

###### ア 一般細菌検査

実質臓器、脳および心嚢水を材料に、5%羊血液加コロンビア寒天培地(37°C・48 時間・5%CO<sub>2</sub>培養)および DHL 寒天培地(37°C・24 時間・好気培養)により分離培養を行った。

分離菌は一次鑑別後、簡易同定キット(アピ 20 ストレップ;日本ビオメリュー)により生化学性状検査を行った。さらに、2 種類の *S. suis* 特異的 PCR 検査(Okwumabua ら(2003 年)<sup>18)</sup>、Ishida ら(2014 年)<sup>19)</sup>および 16S rRNA 遺伝子解析(動物衛生研究所に依頼)に供試した。

###### イ マイコプラズマ検査

肺からセパジーン(エーディア株式会社)により DNA を抽出し、*Mycoplasma bovis*<sup>20)</sup>、*M. bovirhinalium*<sup>21)</sup>、*M. bovirhinalis*<sup>21)</sup>および *M. dispar*<sup>22)</sup>特異的 PCR 検査を行った。

##### (3) ウイルス学的検査

肺、脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節および残血(血清)を材料に、10%組織乳剤を作製、MDBK-SY 細胞によりウイルス分離(2 代 7 日間)を行った。また、腸間膜リンパ節および残血(血清)から High Pure Viral RNA Kit (Roche)により RNA を抽出し、Pesti ウイルス RT-PCR 検査<sup>23)</sup>を行った。

### Ⅳ 成績

#### 1 剖検所見

当該牛は削瘦し、重度の発育不良を示していた(図 1)。病変は胸腔にのみ認められ、肺表面は混濁し、一部は胸壁と癒着していた(図 2)。肺は全葉にわたり硬結感を増し、その表面や断面には大小様々な大きさの黄白色



図 1 外貌

結節が多数認められ、何らかの細菌感染が疑われた (図 2・3)。

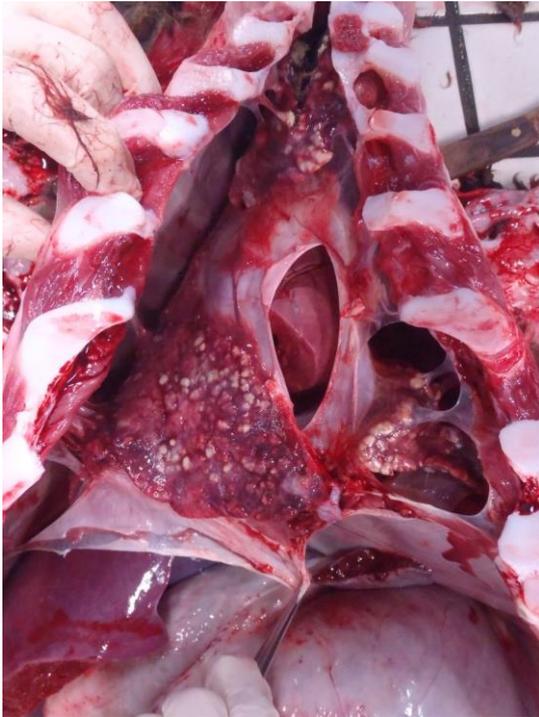


図 2 胸腔および肺



図 3 肺 (断面)

## 2 病理組織学的検査成績

肺において、中心部に菌塊や壊死退廃物を含む膿瘍が多数認められ、膿瘍周囲には線維素析出や好中球浸潤も確認された (図 4 左)。グラム染色を実施したところ、膿瘍辺縁部を主としてグラム陽性球菌がわずかに確認された (図 4 右)。膿瘍中心にはグラム陽性球菌は確認されなかったが、病変形成より時間が経過しているためと考えられた。また、同様に菌塊形成や線維素析出を伴う化膿性気管支肺炎も重度に認められた。その他臓器に著変は確認されなかった。

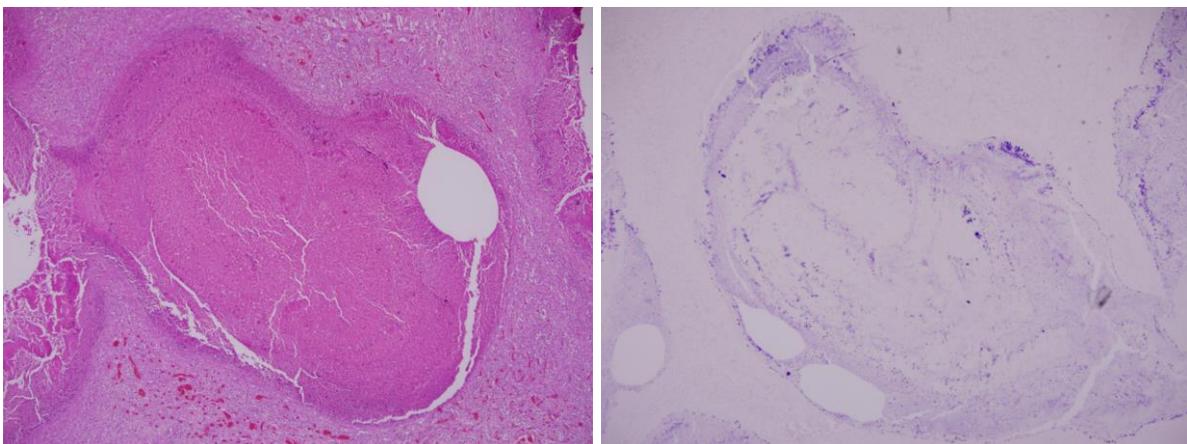


図 4 肺の病理組織像 (HE 染色 (左) およびグラム染色 (右))

### 3 細菌学的検査成績

一般細菌検査では、肺から α 溶血性を示すグラム陽性球菌が多数分離され、簡易同定キットにより、*S. suis* と判定された(プロファイル:4740473、同定確率:99.2%)。分離菌を *S. suis* 特異的 PCR 検査に供したところ、*S. suis* 35 種類全ての血清型をターゲットとする Okwumabua らの方法<sup>18)</sup>では陽性であったが、20、22、26、32、33、34 型以外の血清型をターゲットとする Ishida らの方法<sup>19)</sup>では陰性であった(図 5)。分離菌は *S. suis* とは異なる菌種であることが示唆されたため、16S rRNA 遺伝子部分塩基配列(1,514bp)を決定し、EzTaxon-e<sup>24)</sup>(<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)により解析を行った。その結果、既知の全ての種の基準株とは相同性 97% 以下であった。一方、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)を用い、データベース上の全ての株との相同性を確認した結果、*S. suis* H23-Yamagata-NS978 株(血清型 33 型)とは 99.9%、*S. suis* 血清型 33 型参考株とは 99.1%の相同性を示し、これら 2 株以外に相同性 98% 以上を示す株は確認されなかった。以上のことから、本分離菌は *S. suis* 血清型 33 型参考株に近縁な、既知の種に属さないレンサ球菌属菌と同定された。

マイコプラズマ検査では、肺から *M. dispar* 特異遺伝子が検出された。

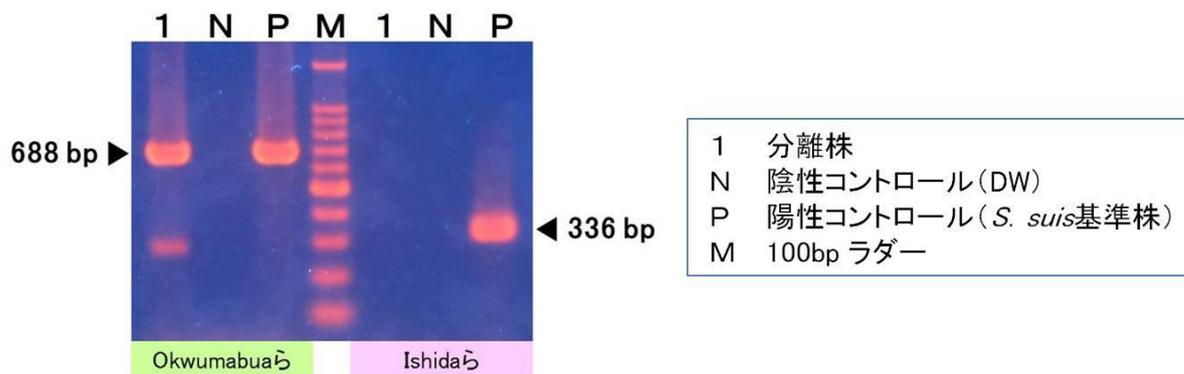


図 5 分離株の *S. suis* 特異的 PCR 検査成績

### 4 ウイルス学的検査成績

ウイルス分離および Pesti ウイルス RT-PCR 検査ともに陰性であった。

## V 診断

以上の成績から、本症例を既知の種に属さないレンサ球菌属菌および *M. dispar* による膿瘍形成を伴う肺炎と診断した。今回は単発の発生であったため、特別な防疫対応は取らなかったが、その後、同様の呼吸器病の発生は認めていない。

## VI *S. suis* 血清型 33 型参考株および野外分離株の簡易同定キット成績比較

今回の分離株は 16S rRNA 遺伝子解析により最終同定された。しかし、家畜保健衛生所等の現場で日常的に用いられている簡易同定キットによっても、同定の根拠たり得る成績が得られるのかどうか、*S. suis* 血清型 33 型参考株および野外分離株を用い検証を行った。

### (1) 供試株

検証には、*S. suis* 血清型 33 型参考株、本県分離株、他県分離株 14 株（山形県 1 株・長崎県 8 株・福島県 5 株）の計 16 株を用いた（表 1）。なお、これら 16 株は、その 16S rRNA 遺伝子配列が互いに 98.9～99.9%と高い相同性を示し、遺伝子解析上、同一菌種であることを確認している。

表 1 供試株一覧

株名	株名2	分離年	畜種	病態など	参考文献
33型参考株	EA1832.92	1995年以前	羊	関節炎	13, 14
埼玉	-	2014年	肉牛(黒毛和種)	肺炎	
山形	H23-Yamagata-NS978	2011年	肉牛(黒毛和種)	疣贅性心内膜炎	8
長崎①	-	2013年	肉牛(黒毛和種)	肺炎	16
長崎②	-	2013年	肉牛(黒毛和種)	肺炎	16
長崎③	1	2013年	肉牛(黒毛和種)	呼吸器症状	17
長崎④	2	2013年	肉牛(黒毛和種)	呼吸器症状	17
長崎⑤	6	2013年	肉牛(黒毛和種)	呼吸器症状	17
長崎⑥	8	2013年	肉牛(黒毛和種)	健康	17
長崎⑦	9	2013年	肉牛(黒毛和種)	健康	17
長崎⑧	12	2013年	肉牛(黒毛和種)	環境材料(哺乳ロボット)	17
福島①	3	2012年	肉牛(黒毛和種)	肺炎	15
福島②	4	2012年	肉牛(黒毛和種)	内耳炎	15
福島③	5	2012年	肉牛(黒毛和種)	肺炎	15
福島④	2	2011年	肉牛(黒毛和種)	肺炎	15
福島⑤	1	2005年	肉牛(黒毛和種)	腹膜炎	15

### (2) 検証項目

各株の簡易同定キットによる陽性項目および同定確率を比較した。本県分離株以外の株については、論文として発表されているデータ<sup>8, 13, 15)</sup>、または、株を分離した検査機関から直接提供頂いたデータを用いた。

### (3) 成績

簡易同定キットでは全ての株が *S. suis* と判定された。しかし、その陽性項目や同定確率は株により様々であり、16 株が 12 パターンに分かれた（表 2）。分離地域や分離年にも特段の傾向は認めなかった。簡易同定キットでは *S. suis* と判定される以上の、同定に有用な情報は得られず、本菌の同定のためには 16S rRNA 遺伝子解析の実施が必要であることが明らかとなった。

表 2 各株の簡易同定キットによる陽性項目および同定確率

株名	ESC	PYRA	$\alpha$ GAL	$\beta$ GAL	LAP	ADH	RIB	MAN	INU	RAF	AMD	同定確率 (%)
33型参考株	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	99.9
埼玉・山形	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	99.2
長崎①・②	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	97.3
長崎③・④	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	95.8
長崎⑤	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	57.9
長崎⑥	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	98.4
長崎⑦・⑧	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	97.3
福島①	ND	ND	+	-	ND	-	-	-	ND	+	ND	99.6
福島②	ND	ND	+	-	ND	+	-	-	ND	+	ND	99.9
福島③	ND	ND	+	+	ND	+	-	-	ND	-	ND	87.3
福島④	ND	ND	+	-	ND	-	-	-	ND	-	ND	99.4
福島⑤	ND	ND	+	-	ND	-	-	-	ND	-	ND	98.2

※ [全株陽性]  $\beta$  GUR, LAC, TRE, GLYG [全株陰性] VP, HIP, PAL, SOR, ARA,  $\beta$  HEM

## VII まとめおよび考察

2014 年、県内では初めて、*S. suis* 血清型 33 型参考株に近縁な、既知の種に属さないレンサ球菌属菌が子牛の肺炎症例から分離された。当該個体は初乳未摂取という易感染状態にあったこと、発症から死亡までの経過が長いこと、また、肺からは *M. dispar* も検出されたことから、今回分離株の病原性の程度は不明である。しかし、複数頭の子牛が肺炎を発症し、しかも比較的急性経過で死亡した事例<sup>16)</sup>も報告されていることから、本菌は注意を要する病原体であると考えられる。本菌に関しては病原性の程度に加え、牛での保菌率等の疫学的な情報も不足していることから、今後も症例・データの集積が必要とされる。

データの集積のためには、本菌を正しく同定することが必要であるが、本菌は簡易同定キットのみでは *S. suis* と区別が付かない。牛からは血清型 33 型以外の *S. suis* も分離される<sup>5-7, 9-11)</sup>ため、例え分離株が簡易同定キットで *S. suis* と判定されても、必ず追加の検査が必要となる。本菌の同定に必要とされる 16S rRNA 遺伝子解析は、最近では広く実施されるようにはなってきたものの、家畜保健衛生所における日常業務の中で実施するにはまだまだ難しい検査である。PCR 検査等の簡便に実施可能な同定法の開発が望まれる。

## VIII 謝辞

本県分離株の 16S rRNA 遺伝子解析を実施頂いた動物衛生研究所の大倉正稔先生、および野外分離株の検査データを提供頂いた福島県中家畜保健衛生所および長崎県中央家畜保健衛生所の関係各位に深謝いたします。

## IX 参考文献

- 1) 明石ら編集：牛病学<第三版>，近代出版，309-314 (2013)
- 2) 舛下ら：乳用牛の細菌性胎盤炎による流産例，臨床獣医，32，22-24 (2014)
- 3) 矢島ら：栃木県における過去 3 年間における牛の流・死産に関する病理組織学的病因解析，臨床獣医，32，18-21 (2014)
- 4) Seimiya et al.：Clinicopathology of meningoventriculitis due to *Streptococcus bovis* infection in neonatal calves, J Vet Med Sci, 54, 871-874 (1992)
- 5) Hampson et al.：Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis*, J Clin Microbiol, 31, 2895-2900 (1993)
- 6) 青野ら：*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)
- 7) 荻野ら：*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)
- 8) 佐藤ら：牛の心内膜炎から分離された *Streptococcus suis* type 33，日獣会誌，66，195-199 (2013)
- 9) Gottschalk et al.：Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*, J Clin Microbiol, 27, 2633-2636 (1989)
- 1 0) Higgins et al.：Isolation of *Streptococcus suis* from cattle, Can Vet J, 31, 529 (1990)
- 1 1) Kataoka et al.：The epidemiological studies of *Streptococcus suis* infections in Japan from 1987 to 1991, J Vet Med Sci, 55, 623-626 (1993)
- 1 2) Hill et al.：Biochemical analysis, cpn60 and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotype 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus oriratti*, Vet Microbiol, 25, 63-69 (2005)
- 1 3) Tien et al.：Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotype 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and *sodA* and *recN* phylogenies, Vet Microbiol, 162, 842-849 (2013)
- 1 4) Higgins et al.：Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*, J Vet Diagn Invest, 7, 405-406 (1995)

- 1 5) 大西 : 牛由来 *Streptococcus suis* 様菌の解析, 福島県, 平成 24 年度家畜保健衛生業績発表会, 54-56 (2012).
- 1 6) 木山ら : 既知の種に属さないレンサ球菌属菌が関与した細菌性肺炎, 長崎県, 平成 25 年度家畜保健衛生業績発表会, 45-47 (2013)
- 1 7) 下條ら : 肉用牛から分離された既知の種に属さないレンサ球菌の疫学解析および同定法の検討, 長崎県, 平成 25 年度家畜保健衛生業績発表会, 48-51 (2013)
- 1 8) Okwumabua et al. : A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase, FEMS Microbiol, 218, 79-84 (2003)
- 1 9) Ishida et al. : Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*, J Microbiol Methods, 107, 66-70 (2014)
- 2 0) Subramaniam et al. : Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC genes by PCR, Mol Cell Probes, 12, 161-169 (1998)
- 2 1) Kobayashi et al. : *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR, J Vet Med Sci, 60, 1299-1303 (1998)
- 2 2) Mori et al. : Detection of *Mycoplasma dispar* from pneumonic lungs of beef cattle, Japanese Journal of Mycoplasmaology, 25, 78-80 (1998)
- 2 3) Vilcek et al. : Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol, 136, 309-323 (1994)
- 2 4) Kim et al. : Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species, Int J Syst Evol Microbiol, 62, 716-721 (2012)