(4)膿毒症の細菌検査による判定方法の検討と分離細菌の調査

○高橋 宏明、高橋 千鶴、菊地 利紀、佐々木 秀樹

1 はじめに

膿毒症とは化膿菌が血管またはリンパ管などに侵入して中毒作用を呈し、あるいは栓塞性（転移性）に化膿巣を生じた場合¹⁾と定義づけられており、と畜場法施行規則（昭和二十八年厚生省令第四十四号）第十六条別表第四に定める全部廃棄対象疾病である。令和5年度食肉検査等情報還元調査によると、牛527頭、豚5,633頭が膿毒症により全部廃棄となっており、特に、豚において全部廃棄の原因疾病となることが多い。

解体後検査において、明瞭な病理所見を示すものは、直ちに膿毒症と判定することが可能であるが、解体後検査で判定困難なものについては、細菌検査を実施し、菌の体内分布を調べたうえで判定を下す必要があるとされている¹⁾。しかし、当所では細菌検査の適用事例がほとんどなく、肉眼所見主体で判定を下している現状である。

豚の化膿性病変の起原菌に関する研究では、*Trueperella pyogenes*をはじめとする様々な細菌の分離が報告されている^{2)、3)}。当所でも、平成18年度に豚の頭、頸部に見られる膿瘍の起原菌を調査しており、*Corynebacterium*属菌や*T. pyogenes*の分離を報告している⁴⁾ものの、現在の所管と畜場搬入豚における化膿性病変の起原菌は不明である。

以上から、本調査では、膿毒症の細菌検査による判定方法の検討と分離細菌の調査を実施したので概要を報告する。

2 材料および方法

調査には、所管と畜場搬入豚のうち、膿毒症と判定された豚15頭を供した（表1）。

表1. 供試豚の農場、月齢区分および搬入区分

豚 No.	農場	月齢区分/搬入区分
1	岩手県	A 繁殖豚/健康畜
2		B 肥育豚/病畜
3		C 繁殖豚/病畜
4		
5		D 繁殖豚/健康畜
6	宮城県	E 繁殖豚/健康畜
7		F 繁殖豚/健康畜
8		G 繁殖豚/病畜
9		H 繁殖豚/病畜
10		I 繁殖豚/病畜
11	青森県	J 繁殖豚/健康畜
12	岩手県	A 繁殖豚/健康畜
13		K 肥育豚/健康畜
14	宮城県	L 繁殖豚/健康畜
15		M 肥育豚/健康畜

① 細菌検査による判定方法の検討

検体採取部位について検討するため、肉眼所見により全部廃棄と判定された豚 10 頭（表 1：No1-10）の膿瘍、躯幹リンパ節、頸部筋肉および臓器（心臓、肝臓、腎臓、脾臓）の細菌分離率を調査した。なお、躯幹リンパ節は前躯、後躯のそれぞれを広範囲に支配する浅頸リンパ節、内側腸骨リンパ節を採取した。分離培養には羊血液寒天培地（好気培養）および 5%羊血液加 GAM 寒天培地（嫌気培養）を使用した。膿瘍については、周囲組織とともに採取し、表面を焼烙滅菌した後、メスで穿刺して、膿 1 白金耳量を分離培地に塗抹し、躯幹リンパ節、頸部筋肉および臓器は無水エタノールに浸してバーナーの火で表面を滅菌後、割を入れ、その割面を分離培地に塗抹し、それぞれ 37±1℃、48 時間培養した。分離培地上に発育したコロニーの形態、性状を確認するとともにグラム染色により菌の形態、染色性を確認し、各検体の膿瘍から分離された菌と同一性状を示す菌の分離率を集計した。

② 分離細菌の調査

膿毒症と判定された豚 15 頭（表 1：No.1-15）の膿瘍について、上述と同様の方法で分離培養を実施した。分離培地上のいずれかの性状（形態、色、溶血性、大きさ等）が異なるコロニーを純培養し、各種簡易同定キット（API[®]シリーズ、バイオメリュウ）による菌種同定を実施した。*T. pyogenes* と同定されたものについては、ディスク拡散法による薬剤感受性試験を実施した。試験にはアンピシリン（AMPC）、ペニシリン（PCG）、セファゾリン（CEZ）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、ストレプトマイシン（SM）、エリスロマイシン（EM）、テトラサイクリン（TC）、ドキシサイクリン（DOXY）オフロキサシン（OFLX）、ノルフロキサシン（NFLX）およびクロラムフェニコール（CP）の 12 種の薬剤含有ディスク（日本 BD）を供した。耐性株が分離された豚について、繁殖豚、肥育豚の 2 群および健康畜、病畜の 2 群に分類し、耐性株とそれぞれの 2 群間の関係について、Fisher の正確率検定により検討した。

3 結果

① 細菌検査による判定方法の検討

肉眼所見により膿毒症と判定された豚の膿瘍、躯幹リンパ節、頸部筋肉および臓器から分離培養を行ったところ、膿瘍から分離された菌と同一性状を示す菌の分離率は筋肉、躯幹リンパ節、臓器の順に高い結果となった（表 2）。

表 2. 躯幹リンパ節、頸部筋肉、臓器における同一性状菌*分離率

検体	同一性状菌*分離率 (検出数/検体数)
浅頸リンパ節	80.0% (8/10)
内側腸骨リンパ節	70.0% (7/10)
頸部筋肉	90.0% (9/10)
心臓	66.7% (4/6)
肝臓	50.0% (3/6)
腎臓	50.0% (5/10)
脾臓	16.7% (1/6)

*膿瘍から分離された菌と同一性状を示す菌

② 分離細菌の調査

膿毒症と判定された膿瘍から分離された細菌について、菌種同定を実施した。すべての豚から *T. pyogenes* が分離され、その他 *Staphyrococcus* 属や *Corynebacterium* 属等、種々の細菌が分離された (表 3-1、3-2)。また、11 頭から *T. pyogenes* を含む複数種類の細菌が分離された (表 4)。

T. pyogenes 15 株の薬剤感受性試験成績を表 5 に示した。8 株がすべての薬剤に感受性を示した一方で、7 株が SM、EM、TC のいずれか、またはすべての薬剤に耐性を示した。耐性株が分離された豚について、繁殖豚、肥育豚および健康畜、病畜に分類し、耐性株とそれぞれの 2 群間の関係について、Fisher の正確率検定を行ったところ、有意差は認められなかった (表 6-1、6-2)。

表 3-1. 膿毒症の豚から分離された細菌の分離率

菌種		分離率(検出数/頭数)
グラム陽性桿菌	<i>T. pyogenes</i>	100.0% (15/15)
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	6.7% (1/15)
	<i>Corynebacterium striatum/amycolatum</i>	6.7% (1/15)
	<i>Clostridium bifermentans</i>	6.7% (1/15)
グラム陰性桿菌	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	20.0% (3/15)
	<i>Salmonella enterica ssp arizonae</i>	6.7% (1/15)
	<i>Bacteroides uniformis</i>	6.7% (1/15)
	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	6.7% (1/15)

表 3-2. 膿毒症の豚から分離された細菌の分離率

菌種		分離率(検出数/頭数)
グラム陽性球菌	<i>Staphyrococcus xylosus</i>	20.0% (3/15)
	<i>Staphyrococcus hominis</i>	13.3% (2/15)
	<i>Staphyrococcus aureus</i>	13.3% (2/15)
	<i>Staphyrococcus epidermidis</i>	6.7% (1/15)
	<i>Staphyrococcus auricularis</i>	6.7% (1/15)
	<i>Staphyrococcus cohnii ssp cohnii</i>	6.7% (1/15)
	<i>Staphyrococcus simulans</i>	6.7% (1/15)
	<i>Staphyrococcus hyicus</i>	6.7% (1/15)
	<i>Streptococcus sp.</i>	6.7% (1/15)
	<i>Kocuria varians</i>	6.7% (1/15)
	<i>Aerococcus viridans</i>	6.7% (1/15)
	<i>Enterococcus faecium</i>	6.7% (1/15)
	<i>Gemella morbillorum</i>	6.7% (1/15)

表 4. 膿毒症の豚 15 頭から分離された細菌の組合せ

分離細菌の組合せ	頭数	分離細菌の組合せ	頭数
<i>T. pyogenes</i>	1	<i>T. pyogenes</i>	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>		<i>Staphyrococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus simulans</i>		<i>Staphyrococcus cohnii ssp cohnii</i>	
<i>Corynebacterium jeikeium</i>		<i>Salmonella enterica ssp arizonae</i>	
<i>Corynebacterium striatum/amycolatum</i>		<i>T. pyogenes</i>	
<i>Clostridium bif fermentans</i>	1	<i>Kocuria varians/rosea</i>	1
<i>T. pyogenes</i>		<i>Fusobacterium mortiferum</i>	
<i>Staphylococcus xylosus</i>		<i>T. pyogenes</i>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Staphylococcus hominis</i>	
<i>Staphylococcus hominis</i>		<i>Streptococcus sp.</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	1	<i>T. pyogenes</i>	1
<i>Bacteroides uniformis</i>		<i>Staphyrococcus auricularis</i>	
<i>T. pyogenes</i>		<i>T. pyogenes</i>	
<i>Staphylococcus xylosus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus hyicus</i>		<i>T. pyogenes</i>	
<i>Aerococcus viridans</i>	1	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	3
<i>Gemella morbillorum</i>		<i>T. pyogenes</i>	

表 5. *T. pyogenes* の薬剤感受性試験成績

耐性薬剤	菌株数	由来豚	農場
EM	1	繁殖豚/健康畜	青森県 J
SM	3	繁殖豚/健康畜	岩手県 A
EM		繁殖豚/健康畜	
		繁殖豚/病畜	宮城県 G
SM	3	肥育豚/病畜	岩手県 B
EM		繁殖豚/健康畜	宮城県 L
TC		肥育豚/健康畜	宮城県 C
耐性なし	8		

表 6-1. *T. pyogenes* の耐性株数の群間比較 (繁殖豚、肥育豚)

	耐性	中間、感受性
繁殖豚	6 (54.5%)	5 (45.5%)
肥育豚	2 (50.0%)	2 (50.0%)

% : それぞれの群における耐性株の割合

Fisher の正確率検定 : P=1.0

表 6-2. *T. pyogenes* の耐性株数の群間比較 (健康畜、病畜)

	耐性	中間、感受性
健康畜	5 (50.0%)	5 (50.0%)
病畜	2 (40.0%)	3 (60.0%)

% : それぞれの群における耐性株の割合

Fisher の正確率検定 : P=1.0

4 考察

膿毒症の主な剖検所見は各部位に形成された膿瘍である。新・食肉衛生検査マニュアル (全国食肉衛生検査所協議会) に基づくと、明瞭な肉眼所見を示すものは、直ちに判定することが可能であるが、肉眼所見による判定が困難なものについては細菌検査による判定が必要とされている。令和 6 年度食肉衛生検査研修 (国立保健医療科学院) の課題研究で実施したアンケート調査によると、膿毒症の細菌検査を実施している検査所は約 40%にとどまっており、当所でも適用事例がほとんどなく、肉眼所見主体で判定を下している現状にあることから、本調査では細菌検査方法を検討するとともに、現在のと畜場搬入豚の化膿性病変の分離細菌に関する調査を実施した。

分離培養の結果、膿瘍から分離された菌と同一性状を示す菌は筋肉、リンパ節から分離されることが多い結果となった。本調査では、肉眼所見により全部廃棄と判定された膿毒症の症例を対象としたため、頸部付近およびリンパ節の支配領域に膿瘍が形成されていたものが多く、筋肉およびリンパ節からの分離率が高くなったと考えられる。当所マニュアル (案) では膿瘍の起因菌が支配領域を越えて血行性に移行していることを確認するため、筋肉、リンパ節ともに膿瘍形成部を支配するリンパ節の支配領域とは異なる部位から採取することとした (表 7)。細菌検査の検体数はその作業が煩雑にならないよう、必要最小限であることが望ましい。また、検体採取により、枝肉の外観を著しく損ねることのないよう配慮する必要もある。これらの点を考慮するとともに、今後は、肉眼所見により判定困難なものに対して、細菌検査を実施し、膿瘍から離れた部分の筋肉およびリンパ節の同一性状菌の分離率から、検体採取部位の検討を継続する。

表 7. 膿毒症の細菌検査マニュアル (案)

検体採取	<ul style="list-style-type: none"> ・膿瘍 ・臓器 (心臓、肝臓、腎臓、脾臓) ・浅頸 Ly、内側腸骨 Lyのうち、膿瘍形成部の支配領域と異なるリンパ節から1か所 (支配領域を越えて血行性に細菌が移行していることを確認するため) ・頸部、殿部の筋肉のうち、膿瘍形成部のリンパ節の支配領域と異なる部分から1か所 (支配領域を越えて血行性に細菌が移行していることを確認するため) <p>内臓 (心臓、肝臓、脾臓) が残存していない場合は、膿瘍、腎臓、リンパ節、筋肉を採取する</p>
分離培養	<ul style="list-style-type: none"> ・分離培地は血液寒天培地 (好気培養)、血液加 GAM 寒天培地 (嫌気培養) を用いる ・膿瘍は表面をスパーテルで焼烙滅菌した後、メスあるいはハサミで穿刺し、白金耳で膿を採取して分離培地に塗抹する ・シリンジで採取した場合は、膿を分離培地に少量滴下し、白金耳で塗抹する ・臓器は表面をスパーテル等で焼烙滅菌し、無菌的に作った断面を分離培地に塗抹する ・筋肉、リンパ節はアルコールに浸してバーナーの火で表面を滅菌し、無菌的に作った断面を分離培地に塗抹する ・37℃、24~48h 培養する

判定	<ul style="list-style-type: none"> ・分離培地上に発育するコロニーの形態、性状を確認するとともに、グラム染色を実施し、菌の形態、染色性等を確認する ・本症を疑う所見を認め、臓器、リンパ節、筋肉のいずれか1か所以上から膿瘍と同一性状菌が認められたものを全部廃棄とする
----	---

分離細菌の菌種については、*T. pyogenes* が最も分離率が高い結果となった。*T. pyogenes* は様々な動物種に化膿性炎を引き起こす日和見感染の原因菌である⁵⁾。病原性については、同菌が合成する細胞外毒素により、根源的な原因となって病変を生じることがある一方で、複数の細菌感染の一因として関与することも多いとされている^{6)、7)}。本調査においても同一個体から *T. pyogenes* を含む複数の菌種が分離された例が多く、同様の傾向が示された。

T. pyogenes に次いで、*Staphyrococcus* 属が分離された。*Staphyrococcus* 属の多くは哺乳動物の皮膚や粘膜に常在しており、体内に菌が侵入すると、その病原性が発揮され、さまざまな化膿性疾患や毒素性疾患を引き起こす⁸⁾。*S. hyicus* が、豚の滲出性皮膚炎の原因菌として報告されているほか⁹⁾、*S. aureus* が化膿性心外膜炎、*S. epidermidis* が耳介の皮膚炎から分離されたという報告^{10)、11)} のとおり、今回分離された *Staphyrococcus* 属には、しばしば豚の各種疾病の起原菌となる菌種があり、これらの細菌と *T. pyogenes* との共感染が化膿性炎を引き起こした可能性が考えられた。

分離した *T. pyogenes* を薬剤感受性試験に供した結果、12 薬剤のうち、9 薬剤 (AMPC、PCG、CEZ、KM、GM、DOXY、OFLX、NFLX、CP) にすべての菌株が感受性を示した。一方で、SM、EM、TC に対しては、耐性を示した株があり、そのほとんどが複数の薬剤に耐性を示した。*T. pyogenes* の薬剤耐性については、種々の報告がある。TC については、高い割合で耐性株が分離された報告があり、その多くが耐性遺伝子を保有することが報告されている^{12)、13)}。また、Yoshimura ら¹⁴⁾ は分離した *T. pyogenes* の 85.7% に SM 耐性、28.6% に EM 耐性を示したとしている。今回、これらの薬剤に耐性を示す *T. pyogenes* が分離されたことから、当該豚の農場においては、薬剤耐性の実態を考慮した抗菌薬の選択が必要と考えられる。また、耐性株について、繁殖豚/肥育豚、健康畜/病畜の群間にいずれも関連は認められなかった。*T. pyogenes* は耐性遺伝子を伝播する可能性が指摘されており^{12)、13)}、本調査においても、飼養期間や治療歴の有無に関わらず、耐性株を保有することが示された。*T. pyogenes* については、多剤耐性の報告¹²⁾ もあることから、今後も、と畜場搬入豚の薬剤耐性状況を継続的に確認し、衛生管理指導の一助としたい。

5 引用文献

- 1) 全国食肉衛生検査所協議会 編：新・食肉衛生検査所マニュアル。中央法規、261(2011)
- 2) 柴田 重孝：細菌による膿瘍形成 (化膿性疾患)。日獣会誌 16、128-131 (1963)
- 3) 鈴木 達郎 他：豚に見られた化膿症の病変および細菌学的検討。日獣会誌 26、188-192 (1973)
- 4) 井上 奈々 他：一般豚の頭、頸部に見られる膿瘍の細菌学的検査。平成 18 年度宮城県食肉衛生検査所事業概要、26
- 5) 油井 武 他：*Arcanobacterium pyogenes* による豚の多発性化膿性漿膜炎の 1 例。日獣会誌 64、645-650 (2011)
- 6) Rzewuska M et al.: Pathogenicity and Virulence of *Trueperella pyogenes*: A Review. Int. J. Mol. Sci., 20, 2737 (2019)
- 7) 大野 祐太 他：北海道の食肉検査で分離された敗血症起原菌の調査。北海道立衛生研究所報 70、61-65 (2020)

- 8) 見上 彪 監修：獣医微生物学第3版. 文永堂、101 (2011)
- 9) 清水 晃 他： *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* が分離された豚の滲出性表皮炎の発生例. 神戸大学農学部研究報告 17、259-267 (1987)
- 10) 木村 久美子 他：家畜衛生研修会（病性鑑定病理部門、2009）*† における 事例記録（V）. 日獣会誌 64、874-878 (2011)
- 11) 望月 敬司 他：一養豚場で集団発生した耳介の皮膚炎. 日獣会誌 36、135-139 (1983)
- 12) 藤本 英樹 他：牛及び豚敗血症由来 *Trueperella pyogenes* の薬剤感受性と遺伝学的特徴. 平成 29 年度鹿児島県食肉衛生検査所業務概要、63-66
- 13) Stephen J Billington et al: Widespread distribution of a tet W determinant among tetracycline-resistant isolates of the animal pathogen *Arcanobacterium pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(5):1281-7 (2002)
- 14) Yoshimura H et al: Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public*, 47, 139-143 (2000)