

## 9 遺伝子の塩基配列の解析により分離菌の同定・確認を行った病性鑑定例

県中央家畜保健衛生所

小菅 千恵子      山本 和明  
前田 卓也

### はじめに

病性鑑定における細菌検査の基本は、迅速な原因菌の分離と有効な薬剤を選定することである。しかし、伝染性疾病の対策には、疫学調査として過去の分離菌や他施設での分離菌との比較を行うことにより、分離菌の特性を把握し予防対策に生かすことが重要となってきた。そのためには、分離菌の正確な菌種同定が不可欠である。当所における細菌学的検査（菌種同定）は、「病性鑑定指針」を参照に、分離培養、形態観察、生化学的性状検査により行い、一部の検査に、遺伝子検査であるPCR検査を併用している。最近では、細菌分野で菌種同定や、疫学調査などに活用されている検査法に、16SrRNA遺伝子の塩基配列解析（以下、16SrRNA遺伝子解析）があり、今回、菌種同定及び菌種確認に16SrRNA遺伝子解析を行ったので、報告する。

### 材料及び方法

#### 1 検査材料

2010～2011年に実施した病性鑑定症例において疾病の主原因が細菌と診断した症例のうち、分離菌の菌種同定ができなかった症例と、同定したが更なる確認が必要と考えられる症例の計5症例各1株について、次のグループ分けにより、16SrRNA遺伝子解析を実施し、菌種同定及び確認を試みた。

- (1) 生化学的性状検査だけでは菌種を同定できなかった症例（症例1-(1～3)）
- (2) 生化学的性状検査で菌種を同定したが菌株の遺伝子解析が必要な症例（症例2）
- (3) 市販キットによる生化学的性状検査では誤同定の可能性があり再確認が必要な症例（症例3）

## 2 検査方法

### (1) 分離培養、形態観察、生化学的性状検査

$\beta$ -NAD加めん羊血液寒天培地、馬血液寒天培地、DHL寒天培地、さらに症例1ではGAM寒天培地、症例3ではチョコレート寒天培地を用い、好気、微好気、嫌気にて、37°C48時間培養し、分離培養を行った。グラム染色、オキシダーゼテスト、カタラーゼテスト及び分離菌の生化学的性状検査には、市販キットを用い、症例1はシスメックス社製API 20A、症例2はAPI Strep、症例3はAPI Staph、症例4・5は日水製薬IDテストHN-20ラピッドを用いた。さらに、症例1はFusobacterium属菌を区別する生化学的性状検査<sup>2) 5)</sup>、症例3はActinobacillus属を区別する生化学的性状検査<sup>1) 4)</sup>を追加し実施した。

### (2) 16SrRNA遺伝子解析

分離菌をバイオラッド社製インスタジーンマトリックスを用いてDNAを抽出し、検査キット (MicroSEQR<sup>®</sup> 500 16SrDNA PCR /Sequencing Kits, Applied Biosystems) を用いて、分離菌の16SrRNA遺伝子領域約500bpについて増幅およびシーケンス反応を行った。反応産物の塩基配列約500bpを遺伝子解析装置 (Genetic Analyzer3130,



Applied Biosystems) を用いて解析し、

図1 16srRNA遺伝子解析による菌種同定

16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定した。この塩基配列を解析ソフト (MicroSEQR<sup>®</sup> ID ソフトウェア / 16SrDNA500 Library) により相同性解析し、NCBI (National Center for Biotechnology Information) から入手したGenBank データベースとBLAST 検索を実施し、他の検査結果も踏まえ分離菌の同定を行った。(図1)

## 成 績

### 1 生化学的性状検査だけでは菌種を同定できなかった症例

症例1-(1)：壊死性化膿性肺炎を呈した肺から分離された*Fusobacterium* sp. の菌種同定

4ヶ月の間に食欲不振と発熱を繰り返し、数回の治療を実施後、死亡した乳用牛 (32ヶ月齢) で、剖検所見で後大静脈に隣接して被包化した膿瘍、肺全葉で粟粒大の乳白色結節散在、組織所

見で肺に壊死性化膿性肺炎、肺・膿瘍・心臓等の複数臓器でのフィラメント状桿菌を認め、肺膿瘍・肺・肝臓から *Fusobacterium* sp. が分離された。分離菌は、API 20A で、*Fusobacterium necrophorum/nucleatum* (68.0% ID) と判定され、追加検査等により、インドール (+)、エスクリン加水分解 (-)、牛乳の凝固消化 (-)、マンノース (-)、ラクトース (-)、グルコース (+)、リパーゼ (+)、鶏血球凝集性 (+)、溶血性 (+) を示したが菌種同定には至らなかった。16SrRNA 遺伝子解析を実施した結果 (図2)、データベース登録株 *Fusobacterium necrophorum* との相同性が99%以上であり、分離菌

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
F530475.1	Uncultured bacterium clone C-40403-2787-FFUS 16S ribosomal RNA	809	809	100%	0.0	99%	
HM28893.1	Uncultured bacterium clone ncd902e04c1 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	
AB332413.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> gene for 16S riboso	809	809	100%	0.0	99%	
F184527.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> strain 2008-10-264 16S ribosomal RNA	809	809	100%	0.0	100%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_10C 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_6E 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_3B 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_7F 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_9C 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA08_7B 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA03_4E 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06WA03_5C 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06OR05_10B 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	
FJ290133.1	Uncultured bacterium clone 06OR02_3A 16S ribosomal RNA gene, pa	809	809	100%	0.0	99%	
AB093366.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> subsp. <i>funduliforme</i> partial 16S rDNA seq	809	809	100%	0.0	99%	
F7704813.1	Uncultured <i>Fusobacteria</i> bacterium clone MS13641_805 16S ribosom	809	809	100%	0.0	99%	
NR_042365.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> strain ATCC 25286 16S ribosomal RNA, i	809	809	100%	0.0	99%	
AF044646.1	<i>Fusobacterium necrophorum</i> 16S ribosomal RNA gene, complete seq.	809	809	100%	0.0	99%	
HM307193.1	Uncultured bacterium clone ncd877005c1 16S ribosomal RNA gene, r	809	809	100%	0.0	99%	

野外分離株との相同性99%以上

基準株との相同性99%

は *Fusobacterium necrophorum* と同定した。

図2 BLAST解析の結果

症例1-(2) : 化膿性髄膜脳脊髄炎を呈した脳から分離されたグラム陽性菌の菌種同定

突然死した肥育豚 (約5ヶ月齢) で、剖検所見で脳の血管充盈、肺の一部肝変化、組織所見で化膿性髄膜脳脊髄炎を認め、脳・主要臓器からグラム陽性菌が分離された。分離菌は、市販キットによる生化学的性状検査で同定に至らなかった。16SrRNA 遺伝子解析を実施した結果、データベース登録株 *Streptococcus suis* との相同性が99%であり、分離菌は *Streptococcus suis* と同定した。

症例1-(3) : カタル性化膿性気管支肺炎を呈した肺から分離された *Actinobacillus* sp. の菌種同定

突然死した肥育豚 (約5ヶ月齢) で、剖検所見で肺の肝変化、組織所見でカタル性化膿性気管支肺炎を認め、肺から *Actinobacillus* sp. が分離された。分離菌は、IDテストHN-20ラピッドで、相対確率の高い順に、*A. equiili*、*A. pleuropneumoniae*、*A. lignieresii*、*A. suis* と判定された。追加検査でV因子要求 (+)、アラビノース (-)、ソルビトール (-)、セロビオース (-)、エスクリン加水分解 (-) を示したが、菌種同定に至らなかった。16SrRNA 遺伝子解析を実施した結果、データベース登録株 *A. pleuropneumoniae* と *A. lignieresii* の2菌種ともに相同性が99%であった。併せて実施した *A. pleuropneumoniae* 血清型別検査により II型に特異的なバンドを認めた事も併せて、分離菌は *A. pleuropneumoniae* と同定した。

2 生化学的性状検査で菌種を同定したが菌株の遺伝子解析が必要な症例

症例2：化膿性髄膜炎を呈した脳から分離された*Staphylococcus hyicus* の菌種確認

2週間前からの皮膚症状及び神経症状を示し死亡した離乳豚（22日齢）で、剖検所見で肺の一部肝変化、耳下腺リンパ節の腫脹、組織所見で脳・脊髄の化膿性髄膜炎、細菌性皮膚炎を認め、脳・肺・耳翼部及び背部皮膚内側から*Staphylococcus hyicus* が分離された。*Staphylococcus hyicus* によって、神経症状を引き起こす症例は珍しいと考えられるため、菌種確認に16SrRNA 遺伝子解析を実施した。結果、データベース登録株*Staphylococcus hyicus* との相同性が99%であり、分離菌は*Staphylococcus hyicus* と確認した。

### 3 市販キットによる生化学的性状検査では誤同定の可能性があり再確認が必要な症例

症例3：化膿性気管支肺炎を呈した肺から分離された *Mannheimia haemolytica* complex の菌種同定

呼吸速拍と起立困難を呈し死亡した乳用牛（17ヶ月齢）で、剖検所見で胸水貯留、肺の肝変化、胸壁との癒着、組織所見で化膿性気管支肺炎を認め、肺から*Mannheimia haemolytica* complexが分離された。市販キットで、*Mannheimia haemolytica* complexとされた菌株については、16SrRNA 遺伝子解析を実施すると、再同定される可能性

- 生化学的性状により*M. haemolytica* complexとしたなかには少なくとも5菌種が含まれている
  - M. haemolytica*
  - M. glucosida*
  - M. granulomatis*
  - M. ruminalis*
  - M. varigena*
- *M. haemolytica* 以外については病原性、発生状況など詳細が明らかとなっていない。
- *M. haemolytica* とした菌株133株について16SrRNA遺伝子解析を実施すると、

<i>M. haemolytica</i>	102株 (76.7%)
<i>M. varigena</i>	18株 (13.5%)
<i>M. glucosida</i>	2株 (1.5%)
<i>M. spp.</i>	11株 (8.3%)

のあることが報告されている<sup>3)</sup> (図3)。 図3 *Mannheimia haemolytica* complex について菌種確認に、16SrRNA *lytica* complexについて遺伝子解析を実施した結果、データベース登録株*Mannheimia haemolytica*との相同性100%であり、分離菌は*Mannheimia haemolytica* と同定した。

### まとめ及び今後の展望

2010～2011年に病性鑑定を実施し疾病の主原因が細菌と診断した症例のうち、原因菌の菌種同定に、従来より実施している生化学的性状検査では同定できない、もしくはさらなる確認が必要と考えられた症例の菌種同定及び確認のため、16SrRNA 遺伝子解析を用いた。結果、すべての症例の菌種同定

及び確認をすることが出来、16SrR NA 遺伝子解析が有効な検査法であることが認識できた。16SrR NA 遺伝子解析を実施するには、機器の整備が必要であること、また外部委託にはコストがかかること、菌種によっては今回実施したActinobacillus属のように、その塩基配列の相同性に違いがみられず分類が出来ないものがあること等の問題点が挙げられる。しかし、16SrR NA 遺伝子解析の利点である①生化学的性状検査（菌の代謝能力に依存する検査）で同定できない細菌を遺伝子検査で同定できること、②機器の操作に馴れば手法が簡便、またDNAの抽出からBLAST解析までが約5時間程度と短時間で判定出来ること、さらに③系統樹解析など疫学調査に有効であることなどの特徴を生かし、今後は、豚の常在菌でありながらレンサ球菌症を引き起こし、養豚農家へ経済的被害を与え、又、人にも感染する人獣共通感染症として、家畜衛生及び公衆衛生上重要である*Streptococcus suis* 感染症の疫学調査に、今回同定した菌や過去の病性鑑定症例から分離された菌を用い、遺伝子解析を活用していきたい。

## 謝 辞

16SrR NA 遺伝子解析の実施にあたり、快く、機材の使用・提供及び御助言を頂いた農林水産省動物検疫所 精密検査部に深謝します。

## 引用文献

- 1) G. L. Barrowら：医学細菌同定の手引き〈第三版〉、130-135、近代出版（1933）
- 2) Holdeman L. V and Moore W. E. C. : Anaerobe Lab Manual (4th edition)、23-28（1977）
- 3) 勝田 賢ら：動衛研研究報告 第115号、15-18（2009）
- 4) 佐々木幸治ら：日獣会誌、58号、186～189（2005）
- 5) 上野一恵：細菌学技術菌叢〈嫌気性菌の分離と同定法〉、菜根出版（1982）