

研 究

と畜場に搬入された宮城県産豚における レプトスピラ保菌状況調査

額田優花, 佐々木秀樹, 関 浩, 中田 聡, 岡崎紀之

宮城県食肉衛生検査所

要 約

レプトスピラ症は人獣共通感染症として留意すべき疾病である。過去に実施された宮城県内と畜場における繁殖豚のレプトスピラ感染状況調査では、抗体陽性率が48.2%、腎乳剤を暗視野顕微鏡で観察した検体においては6.3%でレプトスピラ菌体が観察されたことが報告されたが、その後同様の調査は行われておらず、現在の県産豚における浸潤状況は不明である。そこで、と畜場に搬入された県産豚を対象にレプトスピラの保菌状況調査を実施した。繁殖豚180頭の尿について、レプトスピラの*flaB*遺伝子を標的としたNested PCR法により遺伝子検出を試みところ、結果はすべて陰性であり、現在の県産豚では過去に比べてレプトスピラの浸潤状況は低く推移していることが示唆された。

キーワード：繁殖豚，レプトスピラ，*flaB*遺伝子，Nested PCR法

緒 言

レプトスピラ症は病原性レプトスピラの感染に起因する人獣共通感染症であり、ヒトは保菌動物の尿で汚染された水や土壌から経皮あるいは経口的に感染する¹⁾。2003年11月の感染症法改正以前は、レプトスピラ症は届出対象疾病ではなかったことから、全国の患者数は正確に把握されていないが、1970年代前半まで年間50名以上の死亡者が報告されていた²⁾。その後、農作業の機械化や衛生環境の向上により死亡者数は著減したものの、現在でも患者は全国的に散発している²⁾。

宮城県では、昭和34年度に患者報告数が800例を越す大流行があり、その後5年間にわたり、年間100例前後の患者が報告されるなど、全国でも有数の多発県であった³⁾。げっ歯類はレズルボアとしてヒトや家畜への感染において重要な役割を果たしており⁴⁾、宮城県では野ネズミの保菌率調査が平成15

年まで実施された^{3,5~7)}。この調査によると、野ネズミにおける保菌率はレプトスピラ症患者が著減してからも、患者が多数報告されていた時期と同程度で維持されていた^{3,5~7)}。しかし、近年の調査報告はなく、現在の宮城県内の野ネズミにおけるレプトスピラ浸潤状況は不明である。

一方、ヒトへの感染経路としては野ネズミのほかペットや家畜の介在も知られており、特に豚は感染後数か月から1年以上もの間尿中に排菌することから、ヒトや他の家畜への重要な感染源と考えられている⁸⁾。豚のレプトスピラ症は家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されているが、これまで宮城県で届出事例はなく^{9~16)}、と畜検査においても過去に同症と診断した例はない。しかし、平成3年から5年に実施された県内と畜場における繁殖豚の感染状況調査¹⁷⁾では、と畜場に搬入された豚の抗体陽性率は48.2%であり、腎臓の20%乳剤を暗視野顕微鏡で観察した検体においては、6.3%でレプトスピラ菌体

が観察されたことが報告されている。しかしながら、同報告以降、同様の調査は行われておらず、現在の宮城県産豚における浸潤状況は不明である。

そこで、本調査では県産豚におけるレプトスピラの現在の浸潤状況を明らかにすることを目的として、と畜場に搬入された県産豚を対象にレプトスピラの保菌状況を調査した。

材料および方法

1. 検体：令和3年6月から12月に当所が所管するA食肉流通センターに搬入された県内27農場の繁殖豚、計180頭の尿を膀胱穿刺により無菌的に採材した。
2. DNA抽出：尿1mlを遠心後、沈査をPBS（日水製薬株式会社、東京都）に懸濁し、5検体ずつプールした。プール検体を遠心後、その沈査からHigh Pure PCR Template Preparation Kit (Roche diagnostics, スイス) を用いてDNA抽出を行った（図1）。

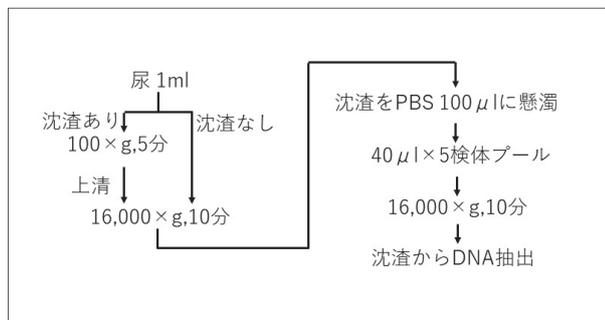


図1 尿からのDNA抽出方法

3. PCR：遺伝子解析はレプトスピラの鞭毛遺伝子である*flaB*遺伝子を標的としたNested PCR法により行った。L-*flaB* F1 (5'-CTCACCGTTCTCTAAAGT TCAAC-3'), L-*flaB* F2 (5'-TGAATTCGGTTTCAT ATTTGCC-3')¹⁸⁾ 及び*flaB*-IN-F1 (5'-TTGCTGTG GACAAGACGATG-3'), *flaB*-IN-R1(5'-CCCATA TCCGCTCTCTGC-3')¹⁹⁾を用いた（表）。陽性対照には、農林水産省動物医薬品検査所より分与を受けた*Leptospira interrogans* serovar Pomonaを用いた。
4. Nested PCRの検出限界：PCRで*flaB*遺伝子が陰性であった尿に、尿1mlあたりのレプトスピラ菌数が0, 1, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵個となるようそれぞれ菌液を加え、前述と同様の方法でDNA抽出及びPCRを実施し、検出限界を求めた。

成績

本調査で試験に供した尿180検体は全てPCR陰性であった（図2）。検出限界の算定では尿1mlあたり10³個以上の菌数でPCR陽性となり（図3）、1プール検体あたりでは本試験系の検出限界は5×10³個/mlであった。

考察

過去に宮城県で行われた調査では豚のレプトスピラ保菌率は6.3%であった¹⁷⁾が、本調査ではすべて陰性であった。検査手法が異なるため結果を直接比較することはできないものの、暗視野顕微鏡での菌体の検出は感度が低く、検出には10⁴個/ml以上の

表 PCR反応条件

		1st PCR	2nd PCR
反応液組成	DNA溶液	2.5 μl	1 μl(1st PCR産物)
	10×buffer	2.5 μl	2 μl
	dNTP(2.5mM)	2 μl	1.6 μl
	プライマー(20 μM)	0.25 μl	0.2 μl
	Ex Taq HS	0.125 μl	0.1 μl
	DW	17.375 μl	14.9 μl
PCR条件		94°C(1min)	94°C(1min)
		94°C(20sec)	94°C(20sec)
	} 30cycles	50°C(30sec)	63°C(30sec)
		72°C(60sec)	72°C(60sec)
		72°C(7min)	
産物サイズ		791bp	559bp

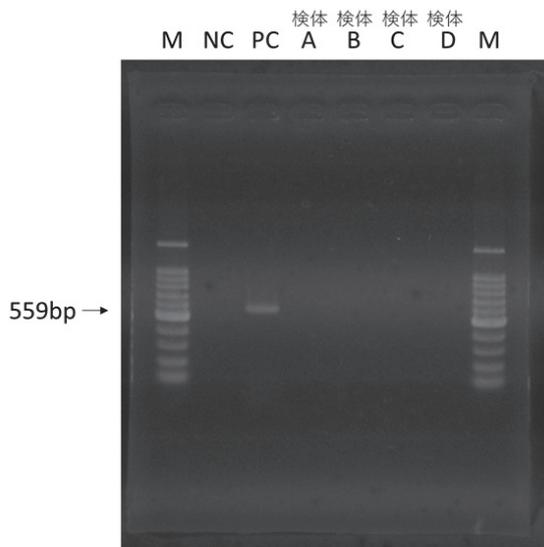


図2 検体のNested PCR産物泳動像。A～Dはプール検体の例を示す。M:100bpマーカー，NC:陰性対照，PC：陽性対照。

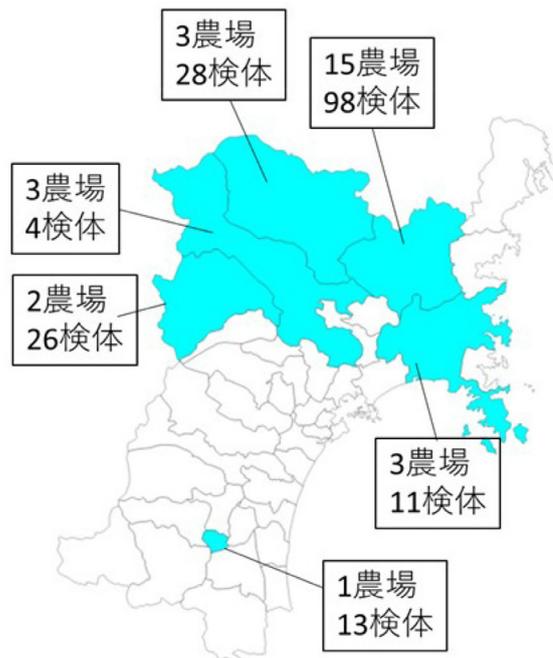


図4 検体豚の県内出荷地

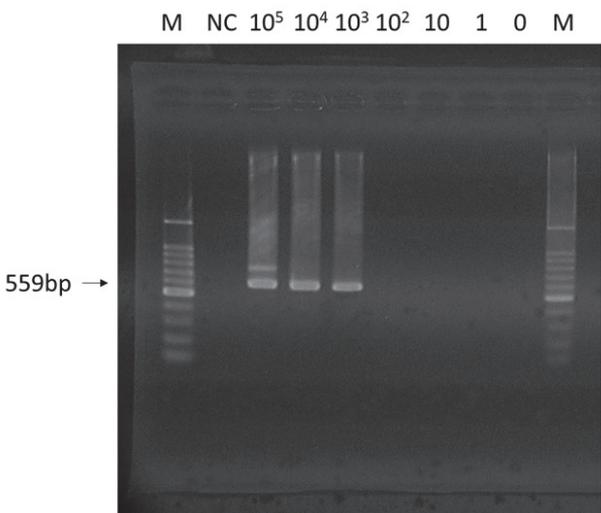


図3 検出限界の算定。10⁵～0は尿1mlあたりの菌数を示す。M:100bpマーカー，NC:陰性対照。

菌数が必要とされる¹⁾一方、本調査で用いたNested PCR法はそれよりも高感度に検出可能であったことから、県産豚では、過去に比べてレプトスピラの浸潤状況は低く推移していることが示唆された。

豚のレプトスピラ症の対策として飼養衛生管理による予防が重要とされている^{4,20)}ことから、家畜伝染病予防法における飼養衛生管理基準の制定以降、農場における衛生管理の向上が本結果の要因の一つと考えられるが、今回は農場への聞き取り調査は実施していないため、今後調査が必要である。また、

本調査で尿を採材した豚は当所が所管すると畜場に搬入されたものに限られており、採材した豚の92.8%が県北地域から出荷されていた(図4)ため、県内全域の浸潤状況の把握には至らなかった。県産豚におけるレプトスピラの浸潤状況を把握するためには、今後さらに農場数を増やし、肥育豚も含め調査していく必要がある。

レプトスピラ症はヒトにおいて全世界で発生が見られており、日本でも各地で散発している²⁾。宮城県でも、2001年、2006年、2015年にヒトのレプトスピラ感染事例が報告されている^{7,21~23)}。豚を対象とした本調査ではレプトスピラ陽性検体は認められなかったが、レプトスピラは淡水中や湿った土壤中で長期間にわたり生存可能である⁴⁾ことから、他の動物の保菌状況や環境中の汚染状況調査と併せて、今後もその動向について注視していく必要がある。

引用文献

- 1) 増澤俊幸：げっ歯類を感染源とする人獣共通感染症 レプトスピラ病，日獣会誌，55(5)，324-330 (2002)
- 2) 小泉信夫，渡辺治雄：レプトスピラ症の最新の知見，モダンメディア，52(10)，299-306 (2006)
- 3) 秋山和夫，植木洋，佐久間隆，新妻澤夫，菱沼早樹子，御代田恭子，山本仁，佐々木智司：宮城県におけるワイ

- ル病, 宮城県保健環境センター
- 4) 菊地直哉: 豚のレプトスピラ症の現状と対策, 日本豚病研究会報, 50, 1-6 (2007)
 - 5) 増澤俊幸: 回帰熱, レプトスピラ等希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究 平成12年度総括・分担研究報告書 (2001)
 - 6) 増澤俊幸: 回帰熱, レプトスピラ等希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究 平成13年度総括・分担研究報告書 (2002)
 - 7) 沖村容子, 庄司美加, 佐藤千鶴子, 佐藤由紀, 植木洋, 上村弘, 斎藤紀行: レプトスピラ症依頼検査について, 宮城県保健環境センター年報, 25, 52-57 (2007)
 - 8) 全国食肉衛生検査所協議会: レプトスピラ症, 新・食肉衛生検査マニュアル, 全国食肉衛生検査所協議会編, 190-195, 中央法規出版 (2011)
 - 9) 農林水産省: 届出伝染病発生累年比較 (1937~2021), https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-22.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 10) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成12年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-103.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 11) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成13年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h13_nenpou.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 12) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成14年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h14_nenpou.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 13) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成16年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h16_nenpou.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 14) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成19年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h19_nenpou.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 15) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成23年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h23_nenpou.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 16) 農林水産省: 監視伝染病発生年報平成29年次, https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-219.pdf (参照日2022年10月21日)
 - 17) 御代田恭子, 相馬慶八, 千葉成美, 秋山和夫: と畜場搬入獣畜 (ウシ・ブタ) のレプトスピラ感染状況調査, 事業概要平成6年度版, 宮城県仙南食肉衛生検査所, 38-39 (1994)
 - 18) 国立感染症研究所: レプトスピラ症 病原体検査マニュアル, <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/leptospirosis.ver2015-2-2.pdf> (参照日2022年10月21日)
 - 19) Sakoda Y, Naito M, Ito M, Ito Y, Isoda N, Tanaka T, Umemura T, Kida H: Recovery of Leptospire from Miniature Pigs Experimentally Infected with *Leptospira interrogans* Serovar Manilae Strain UP-MMC under Immunosuppressive Conditions by Dexamethasone, *J Vet Med Sci*, 74, 955-958 (2012)
 - 20) 藤倉孝夫: 25. レプトスピラ症, 豚病学, 熊谷哲夫他編, 第1版, 318-333, 近代出版 (1977)
 - 21) 佐藤千鶴子, 後藤郁男, 植木洋, 渡邊節, 沖村容子, 秋山和夫, 白石廣行, 林千恵: 宮城県内で発生したレプトスピラ症, 宮城県保健環境センター年報, 20, 51-54 (2002)
 - 22) 国立感染症研究所: 発生動向総覧, *IDWR*, 8 (50), 2 (2006)
 - 23) 国立感染症研究所: 発生動向総覧, *IDWR*, 17 (52・53 合併号), 3 (2015)

産業動物臨床講習会

日 時: 令和5年1月27日 (金) 13:30~15:30

場 所: ZOOMによるWEB講習会

演 題: 離乳期子牛と肥育牛における亜急性第一胃アシドーシスの病態と制御

講 師: 岩手大学 名誉教授 佐藤 繁 先生