

# と畜場搬入豚におけるレプトスピラ浸潤状況について（第 報）

友國由香里<sup>1)</sup> 稲谷憲一<sup>2)</sup> 森松清美<sup>3)</sup>

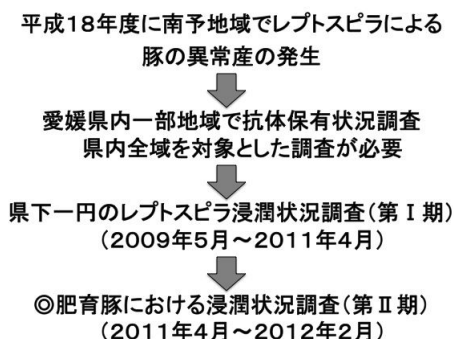
<sup>1)</sup>愛媛県食肉衛生検査センター <sup>2)</sup>愛媛県農林水産研究所畜産研究センター <sup>3)</sup>愛媛県中予地方局生活衛生課

## 1. はじめに

レプトスピラ症は、人獣共通感染症であり、家畜伝染病予防法に基づく届出伝染病、と畜場法では全部廃棄対象疾病となっている。豚に感染すると、妊娠後期に早死産などを引き起こし子豚生産に大きな経済的損失をもたらすが、それ以外では明らかな臨床症状を示さず、菌培養にも長時間を要するため、発見、確定しにくい疾病であると言える。

愛媛県内では、平成 18 年度に、南予地域でレプトスピラによる豚の異常産の発生が確認され、一部地域でのみ抗体保有状況調査が実施されたが、更に県内全域を対象とした調査が必要であると考え、当と畜場に搬入された繁殖母豚を中心に、2009 年 5 月から 2011 年 4 月まで県下一円でのレプトスピラ浸潤状況調査を実施した。（第 期）その結果、県内で広く浸潤している状況が推測され、明らかな臨床症状を示さない肥育豚でも遺伝子が検出されたことから、これまで実施していなかった肥育豚における浸潤状況を継続調査することとした。（第 期）

### これまでの経過



## 2. 材料と方法

検体は、当と畜場に搬入された県下 12 農場の肥育豚の腎臓を、2011 年 4 月から 2012 年 2 月までの調査期間中 2 ヶ月ごとに、計 335 頭分採材した。採材した腎から、皮質 5mm 角を採取し 1.5ml の PBS を加えてホモジネ - トした後、農場ごとに 5 頭分をプールし、67 検体の腎乳剤を作成した。その後、High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) にて核酸を抽出し、Leptospira flaB 遺伝子を標的とした Nested PCR を実施した。Nested PCR で遺伝子が検出された場合は、更に、Hae、Hind による制限酵素断片長多型解析を実施した。Nested PCR 1st PCR は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に、2nd PCR は沖縄県家畜衛生試験場新田らの方法に（表 1）、制限酵素断片長多型解析は、Kawabata らの方法に（表 2）準じて行った。

(表1) 方法① Nested PCR

標的: Leptospira flaB			
	1st PCR <sup>※1</sup>		2nd PCR <sup>※2</sup>
primer	・L-flaB-F1(23mer) 5'-CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC -3' ・L-flaB-R1(22mer) 5'-TGA ATT CCG TTT CAT ATT TGC C -3'		・L-flaB-IN-F1(20mer) 5'-TTG CTG TGG ACA AGA CGA TG -3' ・L-flaB-IN-R1(18mer) 5'-CCC ATA TCC GGT CTC TGC -3'
反応液組成 (1st,2nd共通)	DNA溶液 2μl PCR buffer 1.8μl	dNTP 2μl primer 各0.2μl	taq polym 0.1μl DW 13.9μl (計20μl)
PCR条件	94°C (20s) 50°C (30s) 72°C (60s) } 30cycles		94°C (20s) 63°C (30s) 72°C (60s) } 30cycles
product size	790bp		559bp

※1:レプトスピラ症病原体検査マニュアル(国立感染症研究所)  
 ※2:家畜衛生研修会(細菌部門)2004(新田ら、沖縄県家畜衛生試験場)

(表2) 方法② 制限酵素断片長多型解析

Nested PCRで陽性

➡ HaeIII-RFLP、HindIII-RFLP (Hiroki Kawabataら)

標的: Leptospira flaB	
	PCR
primer	・L-flaB-f1(24mer) 5'-TGT CAC GGT TCT CTA AAG TTC AAC-3' ・L-flaB-r1(23mer) 5'-CTG AAT TCG GTT TCA TAT TTG CC-3'
PCR条件	94°C (300s) 95°C (30s) 50°C (30s) 72°C (60s) 72°C (420s) } 30cycles
product size	793bp

3. 結果

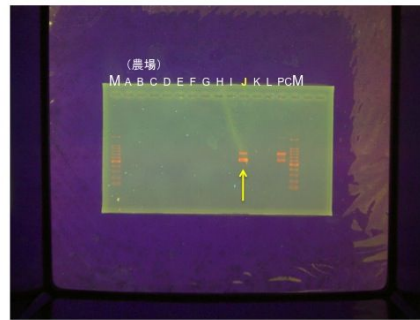
A~Lの12農場のうち、A、C、E、J、Lの5農場で遺伝子が検出された。検体陽性率は、全67検体中12検体陽性で16.4%、農場別の陽性率は12農場中5農場陽性で、41.7%、地域別では、東予地域の陽性率50%(3/6)、南予地域の陽性率40%(2/5)であった。A、C、E、Lの4農場では、期間中に陰性に転じ、J農場では期間を通してflaB遺伝子が検出された。(表3)

また、Nested PCR 陽性の11検体に対して実施した制限酵素断片長多型解析では、7検体が、KawabataらのflaB遺伝子タイプ分け(表4)でaタイプとなり、L.interrogansであった。

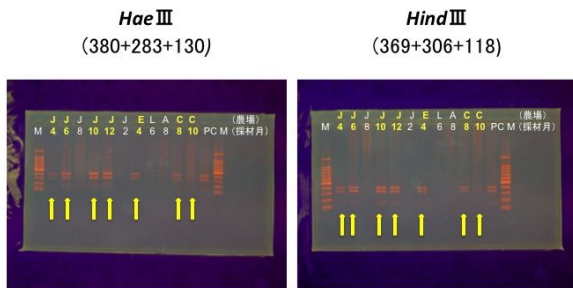
(表3) 結果

農場	2011年4月		2011年6月		2011年8月		2011年10月		2011年12月		2012年2月	
	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR
A	-	-	-	-	-	+	?	-	-	-	-	-
B	NT	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	+	+	Ia	+	+	Ia	-	-
D	NT	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	+	+	Ia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	NT	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	+	+	Ia	+	+	Ia	+	+	?	+	+	Ia
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	-	+	NT	-	+	?	-	-	-	NT	NT	NT

(図1) Nested PCR泳動像 (2012年2月、2nd PCR)



(図2) 制限酵素断片長多型解析泳動像



(表4)

Species	flaB-RFLP		flaB-type
	HaeIII-RFLP	HindIII-RFLP	
<i>L.interrogans</i>	380+283+130	369+306+118	I a
	413+380		I b
	283+229+151+130		I c
<i>L.kirschneri</i>	510+283	487+306	II a
<i>L.noguchii</i>	793	487+306	II b
<i>L.santarosai</i>	490+152+151	487+306	II c
<i>L.borgpetersenii</i>	642+151	367+306+120	III a
<i>L.weilii</i>	567+212+14	367+306+120	III b
<i>L.inadai</i>	264+165+159+123+82	675+118	IV

\* Kawabataらより引用

#### 4 . 考察

レプトスピラは、肥育豚においても愛媛県内の広い地域で浸潤していることがわかった。陽性の 5 農場中、4 農場では、期間中に陰転が見られたことから、環境衛生や抗生物質投与等の対策をすることにより、感染拡大防止は可能と考えられた。調査期間を通して陽性であった J 農場では、現在のところ、繁殖豚での異常産等は発生していないものの、農場内では慢性化している状態であると考えられ、豚同士、または環境を介して、肥育豚から繁殖豚への感染等が懸念される。そのため、専任または指導獣医師を配置し、農場の清浄化対策を検討することにより、豚および生産者等への感染リスクを低減させる必要があると考えられる。今後、この農場で原因不明の異常産が発生した場合は、レプトスピラ症も疑う必要がある。

また、家畜を飼養する農場での疾病対策は安全安心な食肉を生産する基盤となるため、今後は、当センターからの検査結果のフィードバック等情報提供だけでなく、生産段階、指導関係機関、農場担当獣医師等と連携した衛生並びに疾病対策の構築と検証が、食肉の安全性確保のために必要な取り組みであると考えている。