

と畜場搬入豚におけるレプトスピラモニタリング調査

大洲支部 徳永 貢一郎¹⁾、溝田 文美¹⁾、田尻 幸子²⁾、白石 光伸¹⁾

¹食肉衛生検査センター、²内子家畜診療所

1 はじめに

人獣共通感染症であるレプトスピラ症は、公衆衛生及び畜産分野の重要疾病の一つである。愛媛県内では、生産段階における豚での発生が、平成 18 年に確認されている。と畜検査においては、肉眼的所見からの豚レプトスピラ症の鑑別は困難であり、また菌分離には長期間を要することなどから判定が困難な実態があるため、と畜場に健康な豚を搬入することが重要である。そこで、と畜場搬入豚の清浄性を確認するため、nested PCR 及び菌分離によるモニタリング調査を実施した。

2 材料と方法

第 1 次調査として、平成 21 年 2 月に 16 農場から尿及び腎臓合計 100 検体を採取し、flaB 遺伝子を標的とした nested PCR を行った。第 2 次調査は、平成 21 年 5、6 月に 13 農場から、尿 110 検体及び腎臓 50 検体

合計 160 検体を採取し、農場ごとに 5 検体をプール(表 1)した尿 22 検体と腎臓 10 検体からの遺伝子検出を行った(表 2)。

nested PCR は、1stPCR は国立感染症研究所レプトスピラ症検査マニュアル(PCR 産物サイズ 790bp)に、2ndPCR は新田ら(沖縄県家衛試、PCR 産物サイズ 559bp)の方法に準じた(表 3)。

表 1 検体のプール

尿	2ml を遠心分離(10,000×1 分)沈渣を PBS200 µl に懸濁
腎臓	皮質 5mm 角からビーズ破碎により、ホモジネートを作成
	40 µl づつ 5 検体をプールし、合計 200 µl を 1 検体とする

表 2 検体とその調整

検体数	検体の調整等
第 1 次調査(16 農場、合計 50 頭)	
尿 50 検体	2 週間培養液
腎臓 50 検体	2 週間培養液
第 2 次調査(13 農場、合計 160 頭)	
尿 110 検体	5 検体プール後抽出 22 検体
腎臓 50 検体	5 検体プール後抽出 10 検体

表3 nested PCR

Nested PCR		標的 : leptospira flaB	
		1st PCR ¹	2nd PCR ²
primer		L-flaB-f (23mer)	L-flaB-IN-f (20mer)
		5' - CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC -3'	5' - TTG CTG TGG ACA AGA CGA TG -3'
		L-flaB-r (22mer)	L-flaB-IN-r (18mer)
		5' - TGA ATT CGG TTT CAT ATT TGC C -3'	5' - CCC ATA TCC GCT CTC TGC -3'
反応液組成 (1st、2nd 共通)	DNA 溶液 2μl、dNTP 2μl、taq polym 0.1μl PCR buf 1.6μl、primer 各 0.2μl、DW 13.9μl (計 20μl)		
PCR 条件	94 (20s) 50 (30s) 72 (60s)	} 30cycles	94 (20s) 63 (30s) 72 (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)

さらに、第2次調査の腎臓については、1頭ごとに BSA 加 EMJH 培地を用いた菌分離を行い、4週間培養液から遺伝子検出も行った。また、PCR 陽性農場については、管理獣医師等から疾病発生状況等についての聞き取り調査を実施した。

3 結果及び考察

第1次調査では、全て不検出であった。第2次調査では、尿プール2検体、腎臓プール2検体から検出され (図1)、尿プール検体から検出のあった農場での臨床的異常は認められなかった (表4)。腎臓プール検体から検出の2検体のうち1検体は、1stPCR のみの増幅で検出された (図2)。この2検体の培養液を用いた1頭ごとの遺伝子検出では、10頭のうち7頭から検出され、さらに7頭中4頭から、暗視野顕微鏡下で活発に運動するひも状の菌体を培養7週間後に認めた (表5)。また、当該豚群は家畜病性鑑定上の原因が確定されない早産を散発していたことがわかった。これらのことから、農場でのレプトスピラ浸潤が示唆され早産との関連も疑われたため、農場における適切な糞尿処理及び鼠族対策等の実施を助言した。と畜場においては、作業員等の安全確保のため、尿スプラッシュ等に関する防護対策の実施を指導した。なお、と畜場搬入豚を用いた検査は、早産等の原因究明の一助となると考えられた。

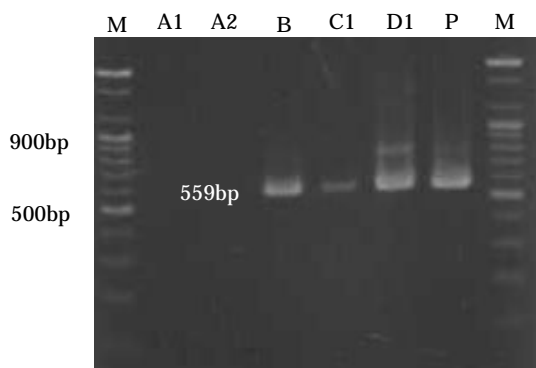


図1 nested PCR 産物の泳動像

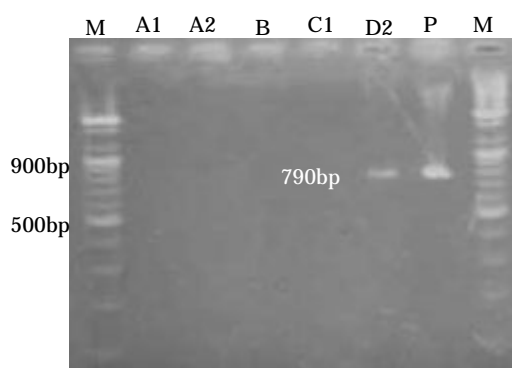


図2 1st PCR 産物の泳動像

〔 A1、A2 尿（農場 A）、B 尿（農場 B）、C1 尿（農場 C）、
D1、2 腎臓（農場 D）、P 陽性対照 〕

表4 第2次調査結果（プール検体）

プール検体	検出検体数（1st）	検出農場数	疾病等
尿	2（0） / 22	2 / 12	無し
腎臓	2（1） / 10	1 / 5	早産散発

表5 第2次調査結果（培養検体）

遺伝子検出腎臓プール検体	検出検体数（1st）	菌分離検体数
4週間培養液	7（6） / 10	4 / 10

4 まとめと今後の課題

と畜場に搬入される豚生産農場の一部農場において、レプトスピラ浸潤が疑われたことから、今後は関係機関等と連携しながら、と畜段階での調査を継続して行い、当該農場の清浄化の確認を行うとともに、健康な豚の搬入の推進を図り、生産から消費における食肉の供給体制の安全強化に努めたい。

また、食肉衛生検査センターでは生産関係部局等と連携し、と畜検査結果の生産段階への情報提供（フィードバック制御）により、と畜関係疾病の生産段階からの清浄化に取り組んでいるところである。一方、と畜検査で判定が困難なレプトスピラ症などの疾病に関しては、生産段階からと畜段階への疾病発生状況等の情報提供すなわちフィードフォワード制御が重要であり、その体制整備が今後の課題と考えられた。