

豚の全身性非定型抗酸菌症より分離されたM.avium-intracellulare Complexの化学的手法による種の同定と血清型別

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	村上, 廣一 井川, 久史
巻/号	42巻4号
掲載ページ	p. 257-261
発行年月	1989年4月

豚の全身性非定型抗酸菌症より分離された *M. avium-intracellulare* Complex の化学的手法による種の同定と血清型別

村上廣一* 井川久史*

(平成元年 1 月 20 日受理)

Identification and Classification of Serotypes of *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Isolated from Disseminated Atypical Mycobacterial Disease in Swine by Chemical Method

HIROKAZU MURAKAMI and HISAFUMI IKAWA (Osaka City Meat Inspection Center, Nankou-minami, Suminoe-ku, Osaka 559)

SUMMARY

We attempted identification and classification of serotypes of acid-fast bacilli isolated from disseminated atypical mycobacterial disease in swine at an abattoir by analysis of mycolic acid and glycopeptidolipid on thin layer chromatography.

All isolated strains were *Mycobacterium intracellulare*, and strains isolated from nine swine of serial-outbreak at a farm belonged to serotype 8, while the other strains belonged to serotypes 4 and 8.

————— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 257~261 (1989).

要 約

抗酸菌の細胞壁に含まれるミコール酸および糖脂質 (Glycopeptidolipid) を薄層クロマトグラフィーによって分画する手法を用い、屠畜検査でしばしば発見される豚の全身性非定型抗酸菌症から分離された菌の同定と、血清型別を行った。

16 頭から分離された 92 株は生化学的性状ならびにミコール酸のサブクラス組成からすべて *M. intracellulare* と同定された。このうち、1 頭から分離された 7 株は血清凝集反応および菌体糖脂質の薄層クロマトグラフィーパターンによって血清型 4 型に型別され、他の 15 頭の 85 株はすべて 8 型であった。また、一養豚場でみられた集団発生豚の 9 頭からはすべて血清型 8 型が分離された。

以上のことから、化学的分析手法を用いた抗酸菌の同定および型別法は一般の検査室でも実施可能であり、本症の迅速診断と疫学的調査に有用な一手法と思われる。

屠畜検査では豚の非定型抗酸菌症は、肝臓などの乳白色の結節、腸間膜リンパ節や下顎リンパ節の乾酪化、あるいは石灰化した結節で発見され、全国の食肉衛生検査所などから、数多く報告がなされている^{4,5,9,16)}。

しかし、豚の非定型抗酸菌症の主な原因菌である *Mycobacterium avium* と *M. intracellulare* の同定や血清型別は、一般の試験室では容易ではない。すなわち、生化学的性状検査、血清凝集反応用抗血清の作成、さらに動物接種試験など多くの時間と労力を必要とし、さらに実験室内感染の機会も多くなる。

今回、著者らは化学的分析手法を用い、非定型抗酸菌の細胞壁に含まれるミコール酸サブクラス組成の菌種特異性を利用した非定型抗酸菌の種の同定と、*M. avium-intracellulare* complex (以下、MAI-complex と略す) の血清型特異的糖脂質の薄層クロマトグラフィーパターンによる血清型別を試み、良好な結果を得た。また、全身性非定型抗酸菌症豚の臓器およびリンパ節から分離された菌の血清型別、さらに集団発生例について抗酸菌の分離状況を検討したので、その概要を報告する。

1. 材料と方法

1) 検査材料

昭和 62 年 2 月から 63 年 2 月までに、大阪市食肉処理場に搬入され、剖検で肝臓・肺・脾臓などに光沢のある

* 大阪市食肉衛生検査所 (大阪市住之江区南港南 5-2-48)

Key Words : 豚, 全身性非定型抗酸菌症, *M. avium-intracellulare* Complex, 種の同定, 血清型別.

豚の全身性非定型抗酸菌症より分離された *M. avium-intracellulare* Complex の化学的手法による種の同定と血清型別

乳白色結節が認められ、全身性の非定型抗酸菌症を疑った豚 16 頭を対象とした。検査材料としては肝臓、肺、脾臓、腎臓および乾酪化や石灰化結節あるいは髄様腫張を認めた各リンパ節を用いた。

2) 病理学的検査

各臓器およびリンパ節について、肉眼検査により結核様結節の有無を調べた。

3) 細菌学的検査

常法により⁷⁾、各検査材料の病変部を乳化後、1% NaOH で処理し、1%小川培地(自家製)で1カ月間観察を続けた。遅発育性でS型、白色～淡黄色のコロニーをZiehl-Neelsen染色で菌形と抗酸性を確認した後、光発色性(-)、ナイアシン試験(-)、硝酸塩還元(-)、ツィーン80水解(-)、ウレアーゼ(-)、アリスルファターゼ(-)、耐熱カタラーゼ(+))を指標として、MAI-complex と同定された92株と検査室保存の95株を供試菌とした。

4) 凝集反応による血清型別

SCHAEFERの方法により標準菌株で家兎を免疫した。320倍以上の力価を有する抗血清を作成し、スライド凝集反応によって血清型別を行った。

5) ミコール酸および糖脂質の薄層クロマトグラフィによる菌種の同定と血清型別

供試菌をデュボス液体培地(栄研)30mlで37°C・10~20日間振盪培養後、培養液を121°C・15分高圧滅菌を行った。その全量を8,000rpm・20分遠沈し、沈渣を分取し、クロロホルム:メタノール(2:1v/v、以下v/vは同じ)40mlを加えた後、超音波処理で菌体を破壊し、さらに水10mlを加えて2層分配を行った。

まず、水層(菌体残渣を含む)を分取し、6N塩酸で80°C・24時間水解を行い、ヘキササンで脂肪酸を抽出す

る。次にベンゼン:メタノール:硫酸(10:20:1)で90°C・1時間のメチル化後、再度ヘキササン:水(1:1)を加えヘキササン層を分取し、濃縮後、薄層クロマトグラフィ(以下、TLCと略す)上に、ヘキササン:エチルエーテル(4:1)で展開した。展開したプレートは、乾燥、50%硫酸噴霧、180°C・20分間高温加熱で発色させ、ミコール酸メチルエステルのサブクラス組成を調べた。

いっぽう、クロロホルム:メタノール層は0.2N KOHメタノールで37°C・30分間水解後、酢酸でpHを調整し、濃縮乾固後、少量のクロロホルム:メタノール(2:1)で溶かし、同様にTLCにスポットし、クロロホルム:メタノール:水(30:8:1)で展開し、上記と同様に発色させ、抗原特異糖脂質のRf値を調べた。(図1)

2. 成 績

1) 剖 検 所 見

検査に供試した16頭はすべて、当検査所搬入時は、生体検査において異常を認めず、発育状態も遜色なかった。解体検査においては肝臓に粟粒大から大豆大の白色結節が2~3個の散発から密発までさまざまであり、病変の著しい例では、結節が癒合し島状にまでいたっている例もあった。脾臓は暗赤色の結節が散発し、肺には粟粒大の結節が散見された。いっぽう、腎臓では、これら3臓器に比べ病変はほとんど認められず、有病豚においても結節は小さく、数も2~3個にとどまっていた。また、腸間膜リンパ節のほとんどが乾酪化、もしくは石灰化した結節を有したが、他のリンパ節では結節はみられず、髄様腫張の程度にとどまっていた。

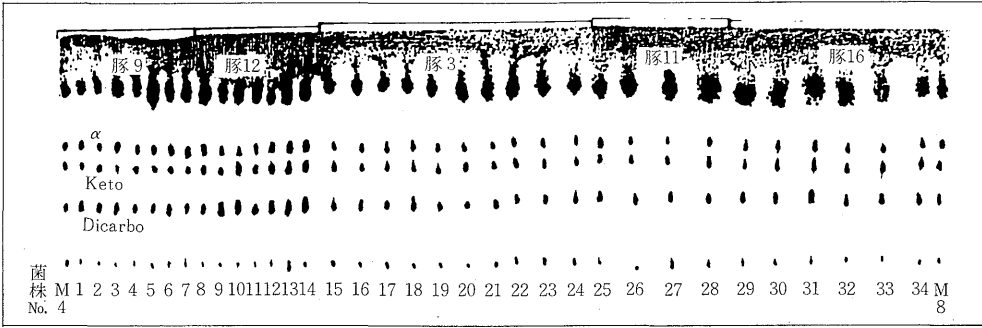
2) 抗 酸 菌 の 分 離 成 績

検査に供した16頭のうち1例を除いて、すべての肝

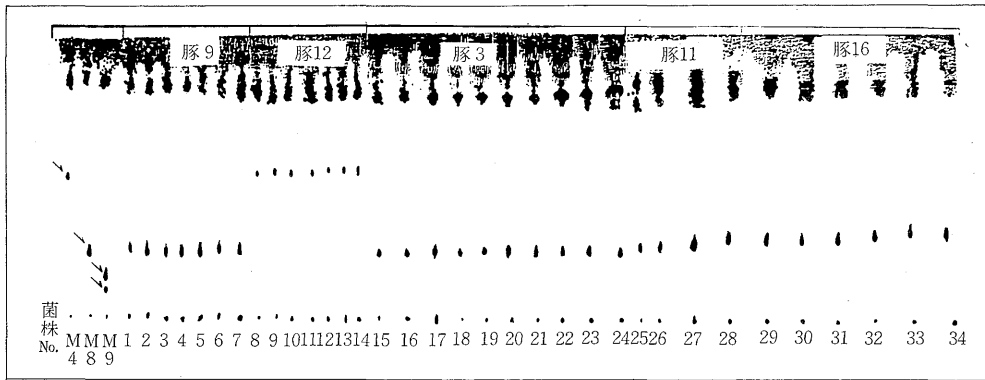
表1 臓器・リンパ節からの抗酸菌分離状況

養 豚 場	臓 器	A									B		C	D	E	F	G	陽性 検 体 数
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
肝	臓	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/16
	肺	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	14/16
脾	臓	+	+	+	+	+	.	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	11/15
	腎	-	+	+	.	-	.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/14
リ ン パ 節	腸間膜	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	14/14
	胃肝門	+	+	+	.	+	.	+	+	+	+	.	+	.	+	+	+	12/12
	気管支	+	.	+	.	.	+	.	.	+	+	+	+	9/9
	下顎	+	.	+	.	.	.	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	11/11
	浅鼠径	.	.	+	.	.	-	-	-	-	.	+	.	.	-	.	-	2/8
	内側腸骨	.	.	+	-	-	.	-	-	-	-	-	.	-	-	+	-	2/12
膝窩	-	-	-	0/3	
血 清 型		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	8	8	8	8	

注) - : 陰性 + : コロニー数(1~50) ++ : コロニー数(50~100) +++ : コロニー数(100以上)
 . : 検査せず



M, M
4, 8 は *M. intracellulare* 4型, 8型の標準株
写真1 供試菌34株のミコール酸展開像



M, M, M
4, 8, 9 は *M. intracellulare* 4型, 8型, 9型の標準株. 矢印はそれぞれの血清型に特異的な糖脂質のスポット.
写真2 供試菌34株の糖脂質展開像

臓から抗酸菌が分離された。また、2例を除き、肝臓、肺、脾臓および腎臓の4臓器のうち2臓器以上から同一形態を示すコロニーが分離された。コロニーは乳白色から淡黄色味を帯びた1~2mmのS型コロニーで、培養後2~3週間で発育した。腎臓からの菌分離は14例中わずかに2例であり、菌量も少なかった。

いっぽう、腸間膜、胃・肝門、気管・気管支および下顎の各リンパ節など臓器付属のリンパ節48例のすべてから抗酸菌が多量に分離された。しかし、浅鼠径、内側腸骨、膝窩の各リンパ節など軀幹リンパ節からは23例中4例(17.3%)と低率であった。

3) ミコール酸による菌種の同定成績

供試92株について、*Mycobacterium intracellulare*の標準菌株を参照として、菌体細胞壁のミコール酸メチルエステルをTLC上で展開した成績を写真1に示した(写真1には92株中34株のみを示した)。

92株のすべての供試菌は、Rf値を大きく異にするα, Keto, Dicarboxyの3種のミコール酸からなる展開像を示し、参照菌株と一致した。しかし、*M. avium*さらにはRunyon II群の*Mycobacterium scrofulaceum*もこれら3種

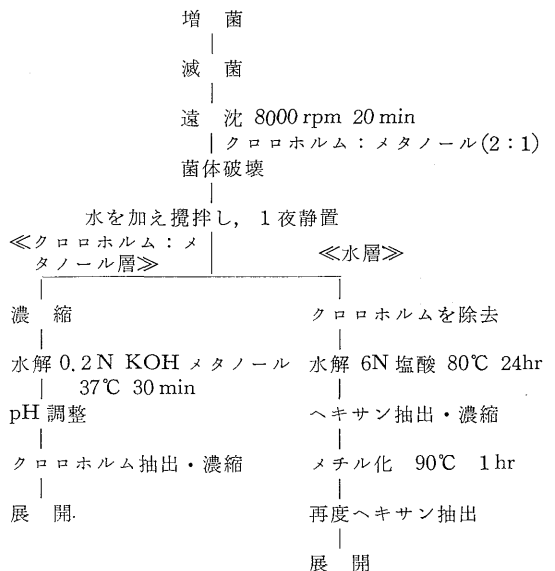


図1 ミコール酸・糖脂質(Glycopeptidolipid)の抽出法

豚の全身性非定型抗酸菌症より分離された *M. avium-intracellulare* Complex の化学的手法による種の同定と血清型別

のミコール酸を有しており、ミコール酸の TLC 分析のみでは、これら 3 菌種の識別はできなかった。

4) 菌体糖脂質の TLC による血清型別

供試菌 92 株と各種血清型の参照菌株からクロロホルム・メタノールで抽出した糖脂質について TLC による分析を試みた。成績は写真 2 に示したように (写真 1 と同一の 34 株のみを示した)。参照株では、4 型は大きな Rf 値の糖脂質スポットを 8 型はこれより小さな Rf 値のスポットを、そして 9 型では 8 型と同じスポットのほか、さらに小さな Rf 値のスポットからなる展開像が得られた。供試菌別にみると、No. 12 の豚から分離された 7 株が 4 型の展開パターンを示し、他の豚由来の 85 株はすべて参照株 8 型菌と同一の展開パターンであった。

これら 16 頭の豚から分離された 92 株の TLC 展開像から得られた結果をスライド凝集反応の結果と比較すると、交差反応がみられた 6 株を除いて他の 86 株は、すべて一致した。成績は表 1 に示したように、集団発生がみられた A 養豚場の 9 頭の臓器およびリンパ節から分離された 53 株はすべて 8 型であった。また、C 養豚場の 1 頭から分離された 7 株は 4 型であったが、その他の 5 養豚場の 6 頭からはすべて 8 型が分離された。

同一個体の臓器およびリンパ節から分離された菌はすべて同一の菌種、血清型であった。

3. 考 察

近年、人の結核症が減少するなかで、非定型抗酸菌症の増加が指摘されている。なかでも原因菌の大半を占める MAI-complex が注目をあびてきている^{9,12,14}。また、乳牛については、長年のツベルクリン反応陽性牛の淘汰の成果として、*Mycobacterium bovis* による牛結核症は著しく減少している状態にある。いっぽう、豚では腸間膜リンパ節および下顎リンパ節に限局した結核病巣を有するものが特定の養豚場から継続的に出荷されており、しばしば屠畜検査において摘発されている。これら豚の腸間膜リンパ節由来の非定型抗酸菌は MAI-complex として数多く報告されている^{4,5,8}。

しかし、全身性非定型抗酸菌症について、*M. avium*, *M. intracellulare* の同定および血清型別を行った報告は少ない^{2,4}。

今回、摘発された供試豚と一緒に搬入された同一群では、約 20~60% もの豚が腸間膜リンパ節に限局した病変を有しているのが解体検査において発見されており、これら腸間膜リンパ節に病変を有する豚の中に今回供試されたすべての全身性罹患豚が 1~2 頭づつ含まれていた。これら罹患豚は早発性の下痢が養豚業者から報告されているものの、16 頭とも生体検査で发育不良、消瘦などなら異常はみられず、肉豚の段階では发育および肥育状態は健康豚と差はなかった。

培養結果では、肝臓および腸間膜、胃・肝門、下顎リンパ節など消化器系リンパ節からの菌分離はきわめて高く、他方、腎臓および浅鼠径、内側腸骨、膝窩リンパ節など軀幹リンパ節からの菌分離率は低い。これらは吉田ら¹⁰の全国食肉衛生検査所協議会の調査結果と一致している。しかし、肺および気管支リンパ節の分離率はそれぞれ 14/16, 9/9 と高く、吉田らの報告と傾向を異にしている。

また、同一個体から分離された菌はすべて同一の血清型であり、さらに同一養豚場から搬入された豚からも同一血清型がみられたのは、感染豚の排菌による濃厚な環境汚染があるものと推定される。

今回、著者らが分離した株はすべて *M. intracellulare* であり、血清型は、8 型が多く、4 型が 1 例であった。今回の調査とは別に、当検査所保有の豚由来株 95 株 (一部、腸間膜リンパ節限局の非定型抗酸菌由来株を含む) を今回と同様の方法で同定したところ、8 型が 45 株 (47%)、4 型が 32 株 (34%)、9 型が 9 株 (9%)、型別不能 9 株 (9%) であった⁹。双方の成績における血清型の分布状況は、わが国の豚で行われた柚木ら¹⁷、東村、根本¹¹ および佐藤ら⁹ の報告と一致しており、*M. intracellulare* にあつては、8 型、4 型、9 型が豚に対し病原性が高いものと考えられる。

TLC 法を用いた種の同定および血清型別について人由来株では、BRENNAN¹⁰をはじめとして多くの報告がみられる。しかし、豚由来株については後藤ら⁹の報告をみるにすぎない。ミコール酸の TLC 上での展開像で、 α , Keto, Dicarboxy の 3 種のミコール酸サブクラス組成のスポットは、*M. intracellulare*, *M. avium* と、*M. scrofulaceum* および他の Runyon III 群の一部の菌種に認められることから、ミコール酸の展開像だけでは同定不可能であり、この点今後の課題である。

TLC を用いた各血清型標準株の糖脂質の展開パターンについて、後藤ら⁹は各菌型ごとに Rf 値の異なる 1~3 個の型特異的糖脂質を検出している。今回著者らが分離した 8 型と 4 型、さらに日本で多く分離されている 9 型の 3 血清型はクロロホルム・メタノール抽出の型特異的糖脂質の Rf 値が明らかに異なり、判定は容易であった。しかし、著者らは、前回の経験⁹から血清型別のための参照菌株として 4・8・9 型のみしか展開しなかったが、糖脂質の Rf 値のみでは型別できない血清型の存在も BRENNAN らは指摘しており、方法論に検討の余地が残されている。しかしながら、今回の化学的分析手法は一般の検査室においても、通常の器具類の範囲で十分応用可能であり、スライド凝集反応との併用で短期間で確実な MAI-complex 同定および血清型別が期待でき、なお、かつ、生菌を取り扱う機会が少ないことから、安全な手法でもあると考えられる。

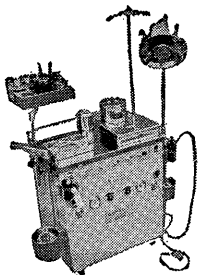
終わるにあたり、当化学的分析法のご指導をいただいた、大阪市立大学医学部の矢野郁也教授、ならびに標準菌株を分与していただいた、新潟県食肉衛生検査所の後藤公吉氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) BRENNAN, P. J., ASPINALL, G. O. and NAM SHIN, J. E.: *J. Biol. Chem.*, 254 4205~4211 (1981).
- 2) 後藤公吉, 金田研司, 矢野郁也, ほか: 日本細菌学雑誌, 43, 653~670 (1988).
- 3) 井川久史, 村上廣一, 上野善照, ほか: 日本細菌学雑誌, 43 (学会講演要旨), 227 (1988).
- 4) 板屋民子, 原田郁男, 上川 静, ほか: 日獣会誌, 35 214~247 (1982).
- 5) 加美山勇一, 山本尚志, 谷津寿郎, ほか: 食品衛生研究, 38, 117~123 (1988).
- 6) 駒形和男編: 微生物の化学分類実験法, 87~143, 学会出版センター, 東京 (1977).
- 7) 厚生省監修: 結核菌検査指針 (1979).
- 8) 成田 晶, 杉山良太, 石田靖男, ほか: 獣医畜産新報, 706, 25~27 (1980).
- 9) 佐藤明正, 穴田勝進, 松尾秀輝: 結核, 62, 21~26 (1987).
- 10) TSANG, A. Y., BRENNAN, P. J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33, 285~292 (1983).
- 11) TSUKAMURA, M., NEMOTO, H.: *Japan. J. Microbiol.*, 17, 91~98 (1973).
- 12) 国療非定型抗酸菌症共同研究班: 結核, 62, 319~327 (1987).
- 13) 山岡弘二, 青山 弘, 前川政則, ほか: 日獣会誌, 26 (学会講演要旨) 414~415 (1973).
- 14) 山岡弘二: 広島大学医学雑誌, 26, 45~56 (1978).
- 15) 矢野郁也, ほか: 細菌学技術叢書, 6, 40~84, 菜根出版, 東京 (1987).
- 16) 吉田義夫 (全国食肉衛生検査所協議会): 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 1~6 (1985).
- 17) 柚木弘之: 豚病学, 第1版, 438~446, 近代出版, 東京 (1978).
- 18) YUGI, H. NEMOTO, H. and WATANABE, K.: *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 12, 168~169 (1972).

診療室の設備として便利でデラックスな

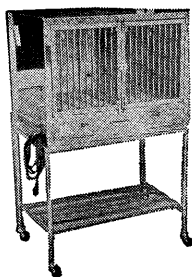
獣医科ユニット
(主要部ステン)



巾 奥行 高さ
本体 50×70×80cm

吸引、噴霧クリーナー、ドレイヤー、他に用途広いです。自在車付 軽く移動します。

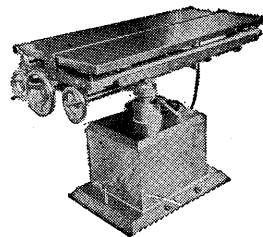
保 育 器
(本体オールステン製)



巾 奥行 高さ
本体 80×50×60cm

保温、酸素吸入ネブライザー吸入用アクリル板扉、及び間仕切りは取りはずし可能犬舎としても利用出来ます。

電動保温型手術台
(主要部ステン)



巾 奥行 高さ
本体 52×110×73~100cm

ヒーター 20℃~40℃調節可
上面グリーンゴム板は別附属として頭部品、消毒盤品取付出来ます。

製作販売

獣医科器械器具 レントゲン装置 理化学器械

木下医療器械店

大阪市浪速区戎本町2-9
TEL. 06-641-6053