

鋸脣肝から発見されたサルモネラ症および子牛のサルモネラ属菌保有状況について

○齋藤麻矢、神谷可菜、清水俊一
早来食肉衛生検査所

【はじめに】牛のサルモネラ症は、北海道において毎年発生している届出伝染病であるが、と畜検査で発見されることは稀な疾病である。今回、3カ月齢のホルスタイン種の子牛に、肝臓の巣状壊死及びその他の臓器に敗血症を疑う所見が認められ、精密検査を行った結果、サルモネラ症と診断された。症例の詳細とともに、と畜場に搬入された子牛のサルモネラ属菌の保菌状況について調査を行ったので報告する。また、今回の症例において、鋸脣肝からサルモネラ属菌が分離されたことから、鋸脣肝における細菌感染の関与と病理組織学的特徴について調査を行ったので報告する。

【材料及び方法】

1 症例について

3カ月齢のホルスタイン種の雄。生体検査では被毛粗剛、他著変なし。

肉眼検査所見：肝臓全葉にわたり、針頭大から粟粒大白色病巣が不規則に散在していた。脾臓は剖面がやや膨隆し、白脾髄が腫大していた。肺前葉は化膿性肺炎、肺中葉および後葉は小葉ごとに程度の異なる不規則斑状の充実性病巣が認められた。腎臓皮質に点状出血が散見され、枝肉はやや水腫様であった。

細菌検査：主要臓器（心臓、肺、肝臓、脾臓及び腎臓）を採材し、羊血液寒天培地にスタンプして好気及び嫌気培養を行った（37°C 48時間）。また、臓器 1g をトリプトソイプロス 9ml に入れて培養（37°C 24時間）した後、DHL 及びクロモアガーサルモネラ培地に接種し、培養した（37°C 24時間）。疑わしいコロニーについて TSI、LIM、VP、シモンズクエン酸培地にて生化学性状の確認を行い、リアルタイム PCR にてサルモネラの遺伝子検査を行った。分離されたサルモネラ属菌を純培養し、サルモネラ免疫血清を用いて O 抗原および H 抗原を同定し、血清型の判定を行った。

病理検査：10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定後、定法に従い組織標本を作製し、HE 染色及び免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学染色はサルモネラ免疫血清 09 群を 1000 倍に希釀したものを一次抗体として用いた。

2 鋸脣肝について

令和 2 年 6 月～8 月までに行われた食肉検査にて鋸脣肝で廃棄となった肝臓 7 検体（22～25 カ月齢の牛）を材料とした。

細菌検査：組織 10g の 9 倍量の緩衝ペプトン水を加えてストマッキングし 37°C 24 時間で培養後、羊血液寒天培地に塗抹し好気及び嫌気培養を行った（37°C 24 時間）。

分離された菌は 16S rRNA 遺伝子のシークエンスデータを EZBioCloud に照会し、菌種の同定を行った。

病理検査：ホルマリン固定後、定法に従い、パラフィン切片を作製し、HE 染色を行った。

3 子牛のサルモネラ属菌保有調査

令和 2 年 4 月～7 月までに所管と畜場にて処理された子牛（12 カ月齢未満）103 頭の直腸便 10g を 9 倍量の緩衝ペプトン水にて前増菌（37°C 24 時間）し、TT 及び RV 培地にて増菌後（42°C 24 時間）、DHL 及びクロモアガーサルモネラ培地にて菌分離した（37°C 24 時間）。分離菌について TSI、LIM、VP、シモンズクエン酸培地にて生化学性状を確認し、サルモネラ免疫血清を用いて O 抗原および H 抗原を同定し、血清型の判定を行った。

【結果】

1 症例について

細菌検査：主要臓器をスタンプした羊血液寒天培地からは細菌の発育は認められなかつた。液体培地で増菌したものからは、肝臓、脾臓、肺からグラム陰性桿菌（オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性）が分離された。分離菌は、TSIで斜面赤・高層黄・H₂S（+）・ガス（+）、LIMでリジン（+）・インドール（-）・運動性（+）、クエン酸利用能（-）、VP（-）であり、リアルタイムPCRでサルモネラ遺伝子を検出した。サルモネラのO群別試験ではO9群に凝集し、H型別試験ではg、pで凝集、s、uで非凝集、G相誘導で遊走はなく、*Salmonella Dublin*と同定した。

病理検査所見：肝臓では、多発性巣状壊死が認められた。病巣はマクロファージが主体の好中球、リンパ球等の炎症細胞浸潤を伴う小肉芽腫巣で、出血は軽微であった。脾臓では、白脾髄周囲に多数の好中球浸潤が認められた。肺では、化膿性気管支肺炎が認められ、肺前葉においては、好中球を主体とした炎症細胞がびまん性に広がり肺の組織構造が破壊され、肺後葉においては、細気管支内は膿性滲出物が浸潤し、肺胞腔は線維素やマクロファージ、リンパ球で満たされていた。腎臓においては、糸球体における赤血球の充満と、尿細管間質性腎炎が認められた。また心臓において著変は認められなかつた。免疫組織的染色では、肝臓及び肺においてサルモネラO9群陽性の桿菌を確認した。

2 鋸脛肝について

細菌検査：7検体中6検体の鋸脛肝から羊血液寒天培地にて溶血性のあるグラム陽性球菌が分離され、16SrRNA遺伝子のシークエンスデータより*Streptococcus lutetiensis*と判定された。

病理検査：全ての検体において大小多様な巣状壊死が多発していた。病巣は主に好中球やリンパ球の浸潤が多く、マクロファージの浸潤は比較的軽度であった。また、中～重度の出血を伴い正常部との境界が不明瞭で、巣状壊死が複数連なることで大きな病巣を形成しているものも多く認められた。

3 子牛のサルモネラ属菌保有調査

103頭中9頭の糞便からサルモネラ属菌が検出され（保有率9%）、9頭中8頭で同一農場での飼養経歴があった。この農場で飼養されていた子牛は103頭中63頭で、保有率は13%であった。また、これらから分離されたサルモネラ属菌は全て*S. Dublin*と同定された。

【考察】家畜伝染病予防法では*Salmonella serovar Dublin*、*Enteritidis*、*Typhimurium*、*Choleraesuis*によるものをサルモネラ症としており、牛では*Typhimurium*と*Dublin*の分離頻度が高い。今回の症例では、*S. Dublin*が検出されたが、組織片のスタンプによる培養方法では菌の発育がみられず、菌の分離には液体培地での増菌が必要であった。これは、組織におけるサルモネラの菌量が少なく、スタンプ培養では増殖できなかつたためと考えられた。病理検査の免疫組織化学的染色においても、サルモネラO9群陽性部位は非常にわずかであった。菌量が少ない場合にはスタンプによる菌培養では陰性となる可能性があるため、精密検査に入る前にサルモネラ症を疑う所見があるかどうかを確認し、培養方法を検討する必要があると考えられた。

サルモネラ症の肝臓では、肉眼で針頭大白色病巣、組織ではマクロファージを中心のチフス様結節が多発し、出血は少なかつた。一方、調査を行った鋸脛肝では、肉眼で大小不同的白色病巣と暗赤色病巣が混在し、組織では複数の肝小葉にわたる出血や好中球の浸潤が顕著で、両者の所見は異なつていた。加えて、鋸脛肝から菌分離を試みたところ、*Streptococcus lutetiensis*が分離された。*S. lutetiensis*は*Streptococcus bovis*グループに属する比較的新しく分類された菌である。人や動物の糞便等から分離されており、動物における病原性は不明であることから、今回の鋸脛肝への関与の有無は不明であった。

また、と畜場に搬入された子牛の糞便について調査したところ、*S. Dublin*の保有率は9%

であった。保菌していた子牛の糞便の状態は特に問題なく、チフス様結節や敗血症を疑う病変はなかった。ある特定農場で飼養されていた子牛での保有率は高く（13%）、継続してと畜場に搬入されていたことから、農場内に蔓延している可能性があると考えられ、このことについて家畜衛生保健所への情報提供を行った。

【まとめ】所管と畜場で3ヶ月齢の子牛の肝臓に巣状壊死及びその他臓器に敗血症を疑う所見が認められ、精密検査を行ったところ、*Salmonella Dublin* が分離され、サルモネラ症と診断された。と畜場に搬入された子牛の糞便からは、発症していないもののサルモネラ属菌が検出され、そのほとんどが同一農場で飼養履歴がある子牛であった。また、今回調査を行った成牛の鋸屑肝からは、主に *Streptococcus lutetiensis* が検出され、サルモネラのチフス様結節とは異なる病理検査所見であった。