豚抗酸菌症の集団発生を起こした、新規の遺伝子学的特徴を持つ *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

中央家畜保健衛生所　小松徹也（こまつてつや）・髙村祐士（たかむらゆうじ）

【はじめに】

Mycobacterium avium complex (MAC)はヒトや家畜の非結核性抗酸菌症(Non-tuberculosis mycobacterial disease：NTM 症)の主要な原因菌であり、4 つの亜種、*M. avium* subsp. *avium* (MAA)、*M. avium* subsp. *silvaticum* (MAS)、*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)、*M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH)が含まれる。

MAH は豚抗酸菌症の主要な原因菌であり、主に腸間膜リンパ節や下顎リンパ節に結節性病変を形成し、時に全身性感染を引き起こす [1)]。と畜検査において、当該部位を含めた消化管は廃棄となるため、大規模な発生となると被害が大きく、日本における年間の豚抗酸菌症による被害額はおよそ 2 億円程度と試算されている [2)]。

一方 MAH はヒトの医療分野においても重要な菌である。日本は世界の中で肺 NTM 症の罹患率が最も高い国であり、その主要な原因菌は MAC であり、約 80－90%を占める [3)]。これらのうち MAH が最も重要な菌と考えられている [4)]。

近年のゲノムを用いた詳細な疫学調査により、現在 MAH は 6 つの系統への分類が提唱されている(EastAsia1：EA1、EastAsia2：EA2、SC1－SC4)[5,6)]。これらの系統の分布は、地球規模で地域特異性が認められている。例えば、EA1 や EA2 は日本や韓国といった東アジアの国のヒトの肺炎から多く分離され、SC2－SC4 は欧米に広く分布している。豚由来株は主に SC2 又は SC4 に属する。しかし日本における豚由来抗酸菌のゲノム疫学調査の例数は少なく、今後の調査が期待される。

今回、豚抗酸菌症の発症豚のリンパ節から分離された MAH は通常とは異なる遺伝子学的特徴を有していたので、その概要を報告する。

【発生状況】

平成 30 年 3 月より、県内 1 養豚場で、と畜場における豚抗酸菌症による腸管廃棄率が急増した（図 1)。本農場における豚抗酸菌症による腸管廃棄率は 2 月までは 0～7%程度で推移していたが、3 月 1 週の廃棄率が 19%、2 週目が 34%と増加し、5 月 1 週目に 70%に達した。6 月 1 週に 12%に減少し、その後 7 月ま

でに終息した。

【材料及び方法】

(1)　材料

6月8日にと畜場で摘発された4頭の腸間膜リンパ節と農場の環境材料(31検体：落下糞便、敷料、飼料)を採材した。

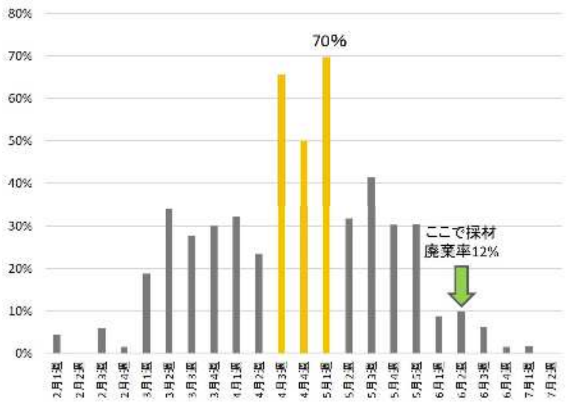

図1　腸管廃棄率の推移

(2)　菌分離

菌分離は、リンパ節は細切後、4%NaOHと混和し、2%小川PS培地（ニッスイ)で3～4週間培養した。環境材料はヨーネ病検査マニュアル[7]に従い前処理を行い、同様に培養した。

(3)　遺伝子検査

分離菌の遺伝子はInstagene (Bio-Rad Laboratories)を用いて抽出し、PCRは全てTaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)を用いて実施した。*M. avium*属特異的PCR[8]で陽性を示した菌について、*M. avium*属の亜種同定に用いられる挿入配列（Insertion sequence: IS)であるIS*1245*[9]、IS*901*[10]の有無を調べた。最終的に、*hsp65*[11]、*rpoB*[12]遺伝子のシークエンスを実施し、*hsp65*遺伝子の645番目の塩基配列の比較、及び*rpoB*遺伝子の相同性比較により亜種を確定した。

(4)　系統樹解析

シークエンスで得られた*hsp65*及び*rpoB*遺伝子の塩基配列とThe National Center for Biotechnology Information (NCBI)のgene bankに登録されている代表的なMAP、MAS及びMAHのゲノム配列から、それぞれ*hsp65*及び*rpoB*遺伝子を抜き出して、系統樹解析を行った。なお登録されているMAH株の系統は、OCU404はEA1、TH135はEA2、A5はSC1、109はSC2、100はSC3及びOCU491はSC4である[5,6]。それぞれEA1、EA2、系統樹解析は全てMolecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 7.0を用いて近隣結合法を用いて行った。ブートストラップ値は500回の計算により求めた。

【結果】

(1)　菌分離状況

4頭の腸間膜リンパ節から純培養的に抗酸菌が分離された。環境材料からは、

抗酸菌様の細菌が複数分離されたが、腸間膜リンパ節由来菌と同様の遺伝子学的特徴を持つ抗酸菌は分離されなかった。

(2)　遺伝子検査

腸間膜リンパ節から分離された 4 つの抗酸菌株（No.94－97)の PCR 及びシークエンス配列は、全て同じ結果であった。IS*901*、IS*1245* がともに陰性であり、*hsp65* 遺伝子のシークエンス解析から、これらの菌株は MAH と同定された。*rpoB* 遺伝子の相同性比較を行ったところ、MAH や MAA の両菌と高い相同性を示した(99.65%)。

(3)　系統樹解析

rpoB 及び *hsp65* 遺伝子の系統樹をそれぞれ図 1 と図 2 に示した。*rpoB* 遺伝子では、本分離株群（No.94－No.97、以下本分離株）は、MAP、MAH (ヒト及び豚由来)、MAA/MAS/MAH (ヒト由来)と異なるグループに分類された。*hsp65* 遺伝子の系統樹では、*M. avium* 属菌は MAP、MAA/MAS 及び MAH のグループに大別されたが、本分離株は MAH の中で異なるクレードに分類された。なお図のバーの長さは遺伝的距離を表している。

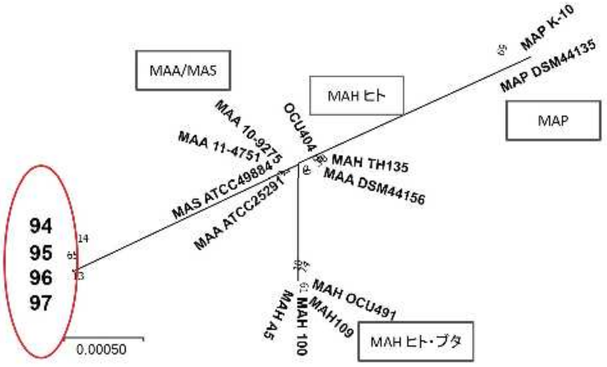

図 2

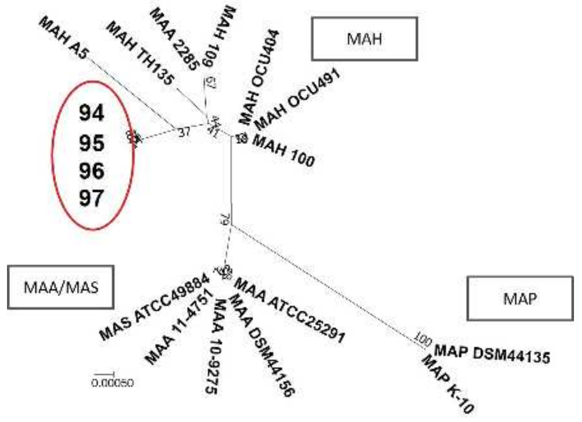

図 3

【まとめ及び考察】

県内養豚場で豚抗酸菌症の集団発生を引き起こした原因菌は、既報と異なる特徴的な *hsp65* 配列を持ち、IS*1245* が陰性といった従来の MAH の特徴と異なる IS パターンを示した。東アジアのヒト由来 MAH では IS*1245* 陰性となる頻度が高いことが知られているが[13)]、日本の豚由来株では 90%以上が保持するという報告がある[14)]。さらに *M. avium* 属菌の *hsp65* 遺伝子の Single nucleotide polymorphism (SNP)パターンは 17 種知られているが、本分離株の SNP パター

ンは、いずれとも異なっていた。異なる SNP パターンを持つ MAH はヒト由来株で報告がある[15]。また系統樹解析においても、本分離株は *rpoB* 及び *hsp65* 遺伝子の両方において、異なるクレードに分類された。以上より、本分離株は、遺伝子学的に特徴的な菌株であることが示唆された。一方で、*hsp65* 遺伝子では、MAH の各系統を正確に分類することはできないことが分かっているため[6]、本分離株の系統は不明であり、豚由来とヒト由来 MAH の疫学的特徴を調べる貴重な菌になる可能性ある。

また環境材料から同じ特徴を持つ抗酸菌が分離されず、感染源の特定には至らなかった。この理由として、①環境材料を採材した時期には、発生が沈静化してきており、農場内の MAH が減少していた可能性、②すでにリンパ節内に被包化され、排出量が少ない可能性、及び③環境中よりも生体内での生育に適応した菌株である可能性[6]が考えられた。今後、本分離株の疫学的、進化的特徴を明らかにするために、ゲノム解析を実施する予定である。

〇参考文献

1） Agdestein A, Johansen TB, Kolbjørnsen Ø, Jørgensen A, Djønne B, Olsen I. A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs. BMC Vet Res. 2012. 8: 11.

2） 大屋 賢司, 澤井 宏太郎. 豚の抗酸菌症の原因菌とその生態について. All about swine. 2017. 51: 33-37.

3） Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, Hoshino Y, Hasegawa N, Ato M, Mitarai S. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan. Emerg Infect Dis. 2016. 22: 1116-1117.

4） Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection sources of a common non-tuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* Complex. Front Med (Lausanne). 2017. 4: 27.

5） Yano H, Iwamoto T, Nishiuchi Y, Nakajima C, Starkova DA, Mokrousov I, Narvskaya O, Yoshida S, Arikawa K, Nakanishi N, Osaki K, Nakagawa I, Ato M, Suzuki Y, Maruyama F. Population structure and local adaptation of MAC lung disease agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. Genome Biol Evol. 2017 9: 2403-2417.

6） Yano H, Suzuki H, Maruyama F, Iwamoto T. The recombination-cold region as an epidemiological marker of recombinogenic opportunistic pathogen *Mycobacterium avium*. BMC Genomics. 2019. 20: 752.

7)　ヨーネ病検査マニュアル. 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門. 2018.
8)　Chen ZH, Butler WR, Baumstark BR, Ahearn DG. Identification and differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* by PCR. J Clin Microbiol. 1996. 34: 1267-1269.
9)　Marsh I, Whittington R, Cousins D. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS*1311*. Mol Cell Probes. 1999. 13: 115-126.
10)　Nishimori K, Eguchi M, Nakaoka Y, Onodera Y, Ito T, Tanaka K. Distribution of IS*901* in strains of *Mycobacterium avium* complex from swine by using IS*901*-detecting primers that discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare*. J Clin Microbiol. 1995. 33: 2102-2106.
11)　Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM, Behr MA. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. J Clin Microbiol. 2006. 44: 433-440.
12)　Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, Kim EC, Cha CY, Kook YH. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J Clin Microbiol. 1999. 37: 1714-1720.
13)　Ichikawa K, Yagi T, Moriyama M, Inagaki T, Nakagawa T, Uchiya KI, Nikai T, Ogawa K. Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, IS*Mav6*. J Med Microbiol. 2009. 58: 945-950.
14)　Hibiya K, Kazumi Y, Nishiuchi Y, Sugawara I, Miyagi K, Oda Y, Oda E, Fujita J. Descriptive analysis of the prevalence and the molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* complex-infected pigs that were slaughtered on the main island of Okinawa. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010. 33: 401-421.
15)　Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. Infect Genet Evol. 2012. 12:

846-852.