

學術研究報告編

[技術資料]

野外で想定される使用条件での A 型インフルエンザ診断用酵素標識抗体 反応キットの検出への影響

小林由佳、松永渡羽、石川容子、五藤秀男

(令和 7 年 8 月 29 日受付、令和 7 年 11 月 5 日受理)

[TECHNICAL REPORT]

Effect of Field Conditions on the Detection Performance of commercial influenza A virus immunoassay kit using an enzyme-linked monoclonal antibody

Yuka KOBAYASHI, Towa MATSUNAGA, Yoko ISHIKAWA, Hideo GOTO

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-22

Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8535, Japan

(Received: 29th Aug 2025, Accepted: 5th Nov 2025)

Abstract

An influenza A virus immunoassay kit using an enzyme-linked monoclonal antibody is an in-vitro diagnostics for animals. It detects viral antigens in poultry suspected of being infected with the avian influenza virus. Although the kit provides usage instructions, testing may need to be conducted under various conditions in field environments, such as on farms. Therefore, we examined how the kit's reaction changes under conditions that could affect the results, such as reaction temperature, amount of sample liquid added, level of fecal contamination in the sample, and time elapsed since the chicken died before sample collection. The color intensity of the color development line in the kit changed under each examined condition. This allowed us to demonstrate the specific effects on kit detection when the appropriate testing conditions could not be met.

要旨

A 型インフルエンザ診断用酵素標識抗体反応キット（キット）は、鳥インフルエンザウイルスの感染が疑われる家きんから、イムノクロマト法によりウイルス抗原を検出する動物用体外診断用医薬品である。キットには用法が示されているが、農場等の現場での環境下では様々な条件で検査を実施せざるを得ないことも想定される。そこで、検査結果に影響を与える要因として考え得る検査時の温度、キットへの試料液滴下量、試料液への鶏糞便の混入及び採材までの時間について、様々な条件下におけるキットの反応の変化を検討した。検討した各条件で発色ラインの発色強度に変化が認められ、適切な検査条件を確保できない場合に発生するキットの検出への影響を具体的に示すことができた。

1. 緒言

A 型インフルエンザ診断用酵素標識抗体反応キット（キット）は、インフルエンザ A ウイルス抗原をイムノクロマト法により検出する動物用体外診断用医薬品である。高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針（農林水産省 2020）は、都道府県が、家きんの所有者及び獣医師等から、高病原性鳥インフルエンザウイルス又は低病原性鳥インフルエンザウイ

ルスの感染を疑う異常家きん発見の届出を受けた際は、家畜防疫員を現地の農場に派遣し、キットを用いた抗原検査を行うことと定めている。

農場で検査を実施する場合、キットの用法に示された検査条件の確保が困難な場合が想定される。そこで、農場で検査を実施する際に想定される条件（低温条件での測定、試料液滴下量の増加、試料液への鶏糞便混入及び死亡から長時間経過した鶏の気管からの採材）を実験室で再現し、キットの検出への影響を検討した。

2. 材料および方法

1) A 型インフルエンザ診断用酵素標識抗体反応キット (図1)

エスプライン A インフルエンザ (富士レビオ株式会社)、Lot No.P1B11103、P1B21103、P1B4A001 を用いた。



図1 エスプライン A インフルエンザの構成
①綿棒②滴下チップ③検体処理液④反応カセット⑤反応停止液

2) 抗原

インフルエンザ A ウイルス A/Puerto Rico/8/34 株を発育鶏卵で増殖させて得た尿膜腔液を用いた。

3) 綿棒で採取される気管スワブ及びクロアカスワブの検討

初めにキット付属の綿棒の重量を測定した (A)。次にその綿棒で、4～5 週齢の鶏から気管スワブ及びクロアカスワブを採材し、採材後の綿棒の重量を再度測定した (B)。B から A を減じた値をスワブの採取量とした。5羽から得られた採取量の平均値を、綿棒で採取される気管スワブ及びクロアカスワブの採取量とした。気管スワブとクロアカスワブの採取量はそれぞれ 34mg と 76mg であった。

4) 綿棒の使用・不使用での検出感度の比較

3) で算出した気管スワブ採取量の密度を 1000g/L とし、気管スワブの採取量の体積を 30 μ L に設定した。抗原を検体処理液で 10 倍階段希釈し、各希釈列の抗原 30 μ L を用い、条件 1 では、綿棒に滴下後、キットの用法に従い綿球部分から採取検体を抽出して、また条件 2 では、検体処理液に直接滴下して、それぞれの試料液を調製した。両条件の試料液の 20 μ L (キット付属の滴下チップを用いて滴下した場合の 1 滴分) を反応カセットに滴下し、室内温度で 15 分間反応させた場合における検出の比較を行った。条件 1 と条件 2 の r 及び A の発色ラインの発色強度は、全ての抗原量 ($10^{2.4}$, $10^{3.4}$, $10^{4.4}$, $10^{5.4}$, $10^{6.4}$ EID₅₀) において同等であり、抗原量が $10^{5.4}$ EID₅₀ では A の陽性発色ラインが明瞭に認められたが、

$10^{4.4}EID_{50}$ ではほとんど認められなかった（図2）ことから、両条件で検体処理液に抽出される抗原量は同等であると判断し、以下2の5）から8）の試験では、条件2の方法（検体処理液で調製した抗原を直接マイクロピペットで反応カセットに滴下）で実施することとした。











抗原量 (EID_{50})	$10^{6.4}$	$10^{5.4}$	$10^{4.4}$	$10^{3.4}$	$10^{2.4}$	
綿棒使用 (条件1)						r B A
綿棒不使用 (条件2)						

図2 綿棒の使用・不使用の検出の比較
反応カセットに試料液を $20\mu\text{L}$ 滴下した。

5) 低温条件での測定がキットの反応に及ぼす影響の検証

抗原を、検体処理液を用いて調製し試料液とした。試料液 $20\mu\text{L}$ （抗原量 $10^{4.9}EID_{50}$ ）を反応カセットに滴下後、用法通り室内（ $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ ）、低温条件として冷蔵庫内（ 4°C ）、低温条件で保温（反応カセットを保温ボックスに入れた上で冷蔵庫内に静置）の3条件でそれぞれ15分間反応させ、検出の比較を行った。保温ボックスは、小型の発泡スチロール箱内の側面に市販の使い捨てカイロを貼って作成した（図3）。保温ボックスを冷蔵庫内に静置して1時間後、保温ボックス内は 23°C であり室内温度となった。

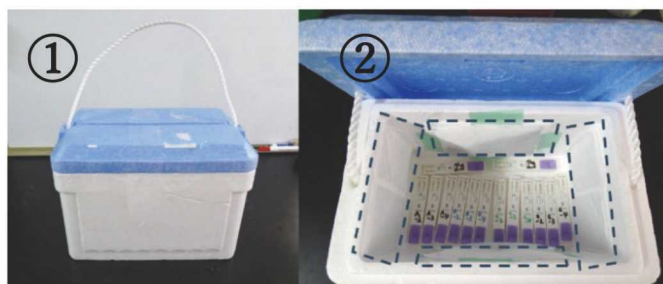


図3 保温ボックス
①外観、②内側（点線で囲まれた部分に市販の使い捨てカイロを貼った）

6) 試料液滴下量の増加がキットの反応に及ぼす影響の検証

5)と同様に調製した試料液を、反応カセットに $20\mu\text{L}$ （用法通り、1滴分）、 $40\mu\text{L}$ （用法の2倍）または $60\mu\text{L}$ （用法の3倍）滴下後、室内温度で15分間反応させ、検出の比較を行った。

7) 検体への鶏糞便混入がキットの反応に及ぼす影響の検証

3)で算出したクロアカスワブ採取量（ 76mg ）を、1検体の試料液調製に使用する検体処理液の容量（ 0.2mL ）で割った値（ 0.38g/mL ）を、クロアカスワブを検体として調製される試料液の平均的な鶏糞便濃度と推定した。検体希釈液及び新鮮な鶏糞便を用いて、 0.19g/mL 、 0.38g/mL 及び 0.76g/mL の溶液を調製した。これらの溶液及び検体希釈液で抗原を希釈して調製した試料液を反応カセットに $20\mu\text{L}$ （抗原量 $10^{5.3}EID_{50}$ ）滴下して室内温度で15分間反応させ、検出の比較を行った。

8) 死亡から長時間経過した鶏の気管からの採材がキットの反応に及ぼす影響の検証

3週齢の鶏を安楽殺後、気管を採材し、長さ3cmの円筒状の組織片とした。抗原をPBSで調製した試料液を、組織片の内腔に200 μ L(抗原量 $10^{7.3}$ EID₅₀)注入し、20℃のインキュベーターで10分間静置した。条件検討の実験において、組織片の内腔に $10^{6.3}$ EID₅₀を注入して実験を行ったところ、8時間経過時点でAの陽性発色ラインの発色が認められなかったため、更に長時間経過した場合のAの陽性発色ラインの発色の変化を観察できる可能性がある $10^{7.3}$ EID₅₀を本実験で採用した。採卵鶏の飼養管理に関する技術的な指針(農林水産省2023)では、成鶏の適温域は15~25℃程度とされていることから、農場で鶏が死亡した後、発見されるまでの時間、死体はこの温度範囲で静置されることを想定し、インキュベーターの温度は20℃に設定した。10分間静置後、抗原を気管の内腔から除去し、更に20℃で静置した。0、8、24及び48時間後に綿棒で採取した気管スワブを、用法に従い反応を行い、検出の比較を行った。

3. 試験成績

1) 低温条件での測定がキットの反応に及ぼす影響の検証

4℃(冷蔵庫内)に静置して反応させた反応カセットは、室内温度で反応させた反応カセットと比較して、Aの陽性発色ラインが認められず、rの発色ラインの発色強度も減弱した。反応カセットを入れた保温ボックスを、冷蔵庫内に静置すると、Aとrの発色ラインの発色強度は反応カセットを直接室内温度に静置した場合と同等となった(図4)。



図4 低温条件での測定結果
反応カセットに $10^{4.9}$ EID₅₀の試料液を滴下した。

2) 試料液滴下量の増加がキットの反応に及ぼす影響の検証

検体滴下部へ滴下する検体の液量を20 μ Lから40 μ Lあるいは60 μ Lに増加させた場合、メンブレン全体が青くなるバックグラウンドの発色が認められた。40 μ LではAの陽性発色ラインが認められたが、rの発色ラインの発色強度は減弱した。発色ラインの明瞭性は滴下量に依存して低下した(図5)。



図5 滴下容量を増加させた場合の測定結果
反応カセットに20 μ L($10^{4.9}$ EID₅₀)、40 μ L($10^{5.2}$ EID₅₀)、60 μ L($10^{5.5}$ EID₅₀)の試料液を滴下した。

3) 抗原への鶏糞便混入がキットの反応に及ぼす影響の検証

抗原に鶏糞便を添加した条件では、鶏糞便の添加量に依存して発色強度が減弱することがrの発色ラインで認められ、0.19及び0.38g/mLの試料液でAの陽性発色ラインの発色がほとんど検出できず、0.76g/mLの試料液ではAの陽性発色ラインの発色は認められなかった(図6)。

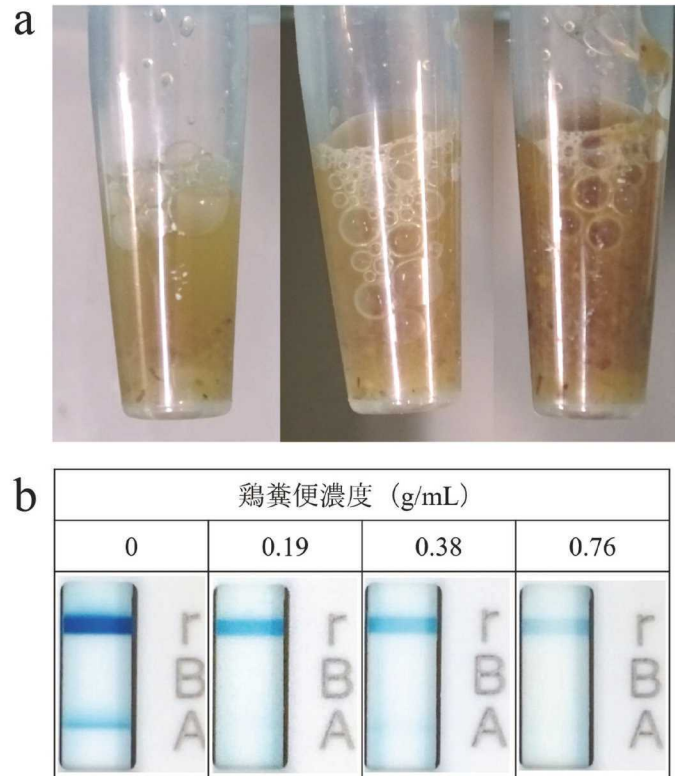


図6 a: 鶏糞便を添加した溶液
左から 0.19、0.38、0.76g/mL
b: 鶏糞便を添加した試料液の測定結果
反応カセットに $10^{5.3}EID_{50}$ の試料液を滴下した。

4) 死亡から長時間経過した鶏の気管からの採材がキットの反応に及ぼす影響の検証

8時間静置後に採取した気管スワブでは、0時間静置と比較してAの陽性発色ラインの発色強度がわずかに低下したが陽性は確認できた。24時間と48時間静置した気管スワブからはAの陽性ラインは認められなかった。rの発色ラインは気管を静置した時間に関係なく同等の発色であった(図7)。

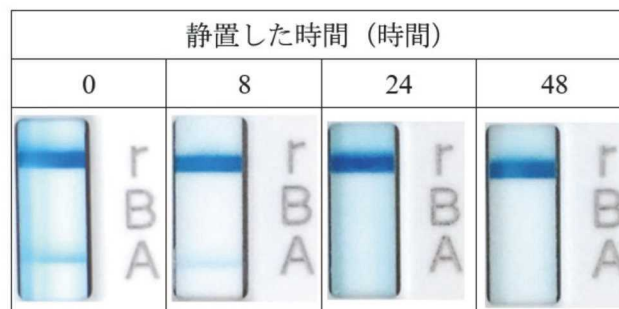


図7 20°Cで静置した気管から採材した検体の測定結果
組織片の内腔に試料液を $200\mu L$ (抗原量 $10^{7.3}EID_{50}$) 注入し、20°Cで10分間静置した。その後、抗原を気管の内腔から除去し、更に20°Cで0、8、24、48時間静置後、綿棒で気管スワブを採取し、用法に従い反応を行った。

4. 考察

低温条件で測定した場合、rの発色ラインの発色強度が顕著に低下した。この結果は、酵素反応や抗原抗体反応の速度の低下が要因と考えられた。保温ボックスに入れ反応温度を室内温度と同等に維持すると、発色ラインの発色強度は、反応カセットを直接室内温度で反応させた場合と同等となったことから、高病原性鳥インフルエンザが多く発生している冬季に農場で検査を実施する場合においても、簡易的に保温環境を準備することで、偽陰性と判定される可能性が低くなると考えられた。

キットに滴下する試料液の液量が増加した場合、バックグラウンドの発色が増し、Aの陽性発色ライン及びrの発色ライン共に発色強度が減弱した。液量が増加することにより抗原と試薬が適切に展開できず、メンブレンに残存する試薬によりバックグラウンドの発色が発生したことが考えられる。また、抗原が十分に展開されなくなるため、Aの陽性発色ラインの発色強度が弱くなると考えられる。

抗原に鶏糞便を添加した条件では、鶏糞便濃度に依存してAの陽性発色ラインとrの発色ラインは共に発色強度が減弱した。このことは、試料液中に夾雑物が混入することで、抗原抗体反応及び酵素反応が阻害された可能性が考えられるが、明確な要因は現時点では不明である。

0から48時間静置した気管から検出されるAの陽性発色ラインの発色強度は、静置時間に伴い減弱し、24時間及び48時間静置した気管スワブからはAの陽性発色ラインは認められなかった。一方、rの発色ラインには変化がなかった。この結果は、死後の時間経過に伴う組織の自己融解により、ウイルスのタンパク質抗原にも影響が及ぶため、キットの補足抗体及び検出抗体に結合できる抗原が少なくなったためと考えられた。

今回の結果から、適切な検査条件下で検査を実施できなかった場合、偽陰性の結果を招く可能性が示された。高病原性鳥インフルエンザの発生を見逃さないためには、キットの反応に影響を及ぼす要因を理解し、偽陰性の発生リスクを低減するよう適切に使用することが重要である。

5. 引用文献

農林水産省（2020）高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針. pp.16-19.（令和2年7月1日農林水産大臣公表。令和7年10月1日一部変更）

富士レビオ株式会社. エスプライン A インフルエンザ添付文書

農林水産省（2023）農林水産省通知5畜産第1066号“採卵鶏の飼養管理に関する技術的な指針”. 令和5年7月26日

[プロジェクト研究終了報告]

豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン及び豚サーコウイルス感染症不活化ワクチンの 豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討

木田萌子、一戸夏美、落合絢子、細田裕子、松本継海、榊基¹、曳地七星¹、森崎一葉、
長坂孝雄、大出水幹男、山崎雅人、山下麻依子、迫田義博²、山本欣也

(令和7年8月25日受付、令和7年8月27日受理)

Impact of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Modified Live Vaccines and Inactivated Porcine Circovirus Type 2 Vaccines on the Efficacy of Classical Swine Fever Attenuated Live Vaccine

Moeko KIDA, Natsumi ICHINOHE, Mariko OCHIAI, Yuko HOSODA, Tsugumi MATSUMOTO, Hajime SAKAKI, Nanase HIKICHI, Kazuha MORISAKI, Takao NAGASAKA, Mikio OIDEMIZU, Masato YAMAZAKI, Maiko YAMASHITA, Yoshihiro SAKODA, Kinya YAMAMOTO

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-22

Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 306-8535, Japan

(Received: 25th Aug 2025, Accepted: 27th Aug 2025)

Abstract

To control endemic classical swine fever (CSF), a live attenuated vaccine (GPE⁻ vaccine) using the GPE⁻ vaccine strain has been widely implemented in Japan, except Hokkaido. Studies conducted in foreign countries have found that porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2) co-infections can reduce the efficacy of CSFV vaccine, except the GPE⁻ vaccine strain. Furthermore, the administration of PRRSV modified live vaccines (MLVs) and inactivated PCV2 vaccines (PCV vaccines) may also negatively impact the efficacy of CSFV vaccine immunogenicity. However, no reports have explored the impact of these vaccines on the efficacy of the GPE⁻ vaccine. Thus, we investigated the effects of PRRSV-2 MLVs (containing Betaarterivirus suid 2 [PRRSV-2]), PRRSV-1 MLV (containing Betaarterivirus suid 1 [PRRSV-1]) and PCV vaccines on the immune efficacy of GPE⁻ vaccine in pigs. Pigs were assigned to test groups receiving either PRRSV-2 MLV, PRRSV-1 MLV, or PCV vaccine prior to the GPE⁻ vaccine or to the control group receiving only a GPE⁻ vaccine. Titers of neutralizing antibodies against CSFV (CSFV NA) were compared between the test and control groups. The CSFV NA titers of the test groups increased sufficiently to prevent disease despite vaccination with PRRSV MLV or PCV vaccine. Therefore, PRRSV-2 MLV, PRRSV-1 MLV, and PCV vaccines do not interfere with the immunogenicity of the subsequent GPE⁻ vaccine. However, a delayed increase in CSFV NA titers was observed in the test groups vaccinated with PRRSV-2 MLV at 1 or 2 weeks before GPE⁻ vaccine or with PRRSV-1 MLV at 1 week before GPE⁻ vaccine. Accordingly, careful monitoring of CSFV NA titers is recommended when the GPE⁻

¹ 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

Animal Products Safety Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

² 北海道大学大学院獣医学研究院

Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University

vaccine is administered following PRRSV MLV inoculation.

要旨

豚熱（CSF）の予防のため、我が国では北海道を除く 46 都府県の豚に GPE⁻ 株をワクチン株とする豚熱生ワクチン（GPE⁻ ワクチン）が接種されている。海外では GPE⁻ ワクチン以外の豚熱生ワクチン（CSF ワクチン）において、豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルス（PRRSV）や豚サーコウイルス 2 型（PCV2）感染が CSF ワクチンの有効性に影響を及ぼすことが報告されており、加えて、これらの感染症対策に使用されている豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン（PRRS ワクチン）や豚サーコウイルス感染症不活化ワクチン（PCV ワクチン）についても、CSF ワクチンの有効性に影響を及ぼすことを示唆する報告がされている。一方、PRRS ワクチンや PCV ワクチンが GPE⁻ ワクチンの有効性に及ぼす影響について報告されていない。そこで、PRRS ワクチン及び PCV ワクチンについて GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に与える影響を調べるため、Betaarterivirus suid2 (PRRSV-2) をワクチン株とする PRRS ワクチン（PRRSV-2 ワクチン）、Betaarterivirus suid1 (PRRSV-1) をワクチン株とする PRRS ワクチン（PRRSV-1 ワクチン）又は PCV ワクチンを接種した豚に対して GPE⁻ ワクチンを接種し、PRRS ワクチン及び PCV ワクチンを接種していない豚と豚熱ウイルス（CSFV）に対する中和抗体価（CSFV 中和抗体価）の推移を比較した。その結果、PRRS ワクチン又は PCV ワクチンを接種した豚において、CSFV 中和抗体価は十分に上昇し、これらのワクチンは GPE⁻ ワクチンによる豚の免疫獲得に影響を及ぼさないと考えられた。一方、PRRSV-2 ワクチンは接種間隔が 1 又は 2 週間の場合、PRRSV-1 ワクチンは接種間隔が 1 週間の場合、中和抗体価の上昇が遅れる傾向が認められたことから、PRRS ワクチンを接種した豚に GPE⁻ ワクチンを接種する際には中和抗体価の上昇の遅れに留意が必要であると考えられた。

緒言（背景）

平成 30 年 9 月に我が国で 26 年ぶりに CSF が発生し、令和元年 10 月から GPE⁻ 株を製造用株とする GPE⁻ ワクチンの接種が開始され、現在では北海道を除く 46 都府県の養豚場で接種されている。接種農場における GPE⁻ ワクチン接種後の免疫付与状況等確認検査において、ELISA 検査による免疫付与率が低い農場が確認されており、その原因として、母豚からの移行抗体、PRRSV 及び PCV2 感染等の影響が示唆されている（香川 2024; Kuwata ら 2025; 清水 2013; 下田ら 2024）。

海外で使用されている Chinese 株を製造用株とする CSF ワクチンでは、ワクチン接種時の高い移行抗体価以外にも、PRRSV、PCV2、マイコプラズマ等の豚の免疫を抑制する病原体に感染した豚において、ワクチンによる免疫応答が抑制されることが知られており（Suradhat ら 2006; Huang ら 2011）、PRRS ワクチンを接種した豚においても、CSF ワクチンの免疫応答が抑制されることが報告されている（Wang ら 2016）。また、CSF ワクチン（Lapinized Philippines Coronel 株）を接種した豚の血液から分離した末梢血単核球（PBMC）に PCV2 または UV で不活化した PCV2 を感作後、CSFV を感作させ、PBMC の増殖反応を測定したとき、感染性のある PCV2 を感作した場合と同様に、UV 不活化 PCV2 を感作させた場合も CSFV 特異的な PBMC の増殖反応が抑制されることが報告されており（Huang ら 2011）、不活化された PCV2 でも CSF ワクチンの有効性に影響を及ぼすおそれがある。

GPE⁻ ワクチンは、1969 年に国内で承認された。当時、国内では PRRS や豚サーコウイルス関連疾病は知られておらず、これらの疾病に対するワクチンは 1990 年代後半以降に承認されたことから、GPE⁻ ワクチンの承認時からこれまで、これらのワクチンが GPE⁻ ワクチンの有効性に及ぼす影響は検討されてこなかった。

豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針において、農林水産省は、CSF ワクチンの開発・利用等について、更に研究・検討を進めることとされており、GPE⁻ ワクチンの現在の養豚現場における適切な使

用方法について調査及び情報提供することは喫緊の課題である。そこで、令和3～4年度及び令和5～6年度に実施したプロジェクト研究において、PRRS ワクチン及び PCV ワクチンの接種による GPE⁻ ワクチンの有効性への影響を検討した。

目的

PRRS ワクチン接種豚及び PCV ワクチン接種豚における GPE⁻ ワクチンの有効性を調べ、適切かつ効果的な GPE⁻ ワクチンの使用を推進する。

研究成果

1. PRRS ワクチンの GPE⁻ ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討

(1) PRRSV-2 ワクチンの GPE⁻ ワクチンへの影響の検討

試験実施時に国内で承認されていた PRRSV-2 ワクチン 2 製剤を使用した。試験には PRRSV 及び CSFV に対する移行抗体を持たない 3 週齢の SPF 豚を使用し、以下の試験にも同じ条件の豚を使用した。試験群 A (試験 1 及び 2 とともに 3 頭)、試験群 B (試験 1 及び 2 とともに 3 頭) 及び対照群 (試験 1 は 3 頭、試験 2 は 4 頭) を設定し、試験群 A 及び B にはそれぞれ異なる PRRSV-2 ワクチンを 3 週齢時に接種し、その後対照群を含めた全頭に GPE⁻ ワクチンを接種した。接種は各製剤の用法及び用量に従った。試験群 A 及び B の PRRSV-2 ワクチン及び GPE⁻ ワクチンの接種間隔は、試験 1 では 1 週間、試験 2 では 2 週間とした。PRRSV-2 ワクチン接種直前から 10 週間、経時的に採血を行い、CSFV 中和抗体価及び PRRSV ELISA 抗体の測定を行った。採血のスケジュールは、試験 1 では PRRSV-2 ワクチン接種日から 0, 2, 4, 7, 8, 9, 11, 14 日目まで採血後、7 日間隔で試験終了日まで採血を行った。試験 2 では PRRSV-2 ワクチン接種日から 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 15, 16, 18, 21 日目まで採血後、7 日間隔で試験終了日まで採血を行った。なお、CSFV 中和抗体価測定には、北海道大学の迫田義博教授から分与された vCSFV GPE⁻/HiBiT 株を使用した方法を用いた (Tetsuo ら 2020)。以降の試験の CSFV 中和抗体価測定はすべてこの方法を使用した。

試験 1 及び 2 の群毎の CSFV 中和抗体価の推移を Fig.1 に示した。CSFV 中和抗体価は、両試験とも

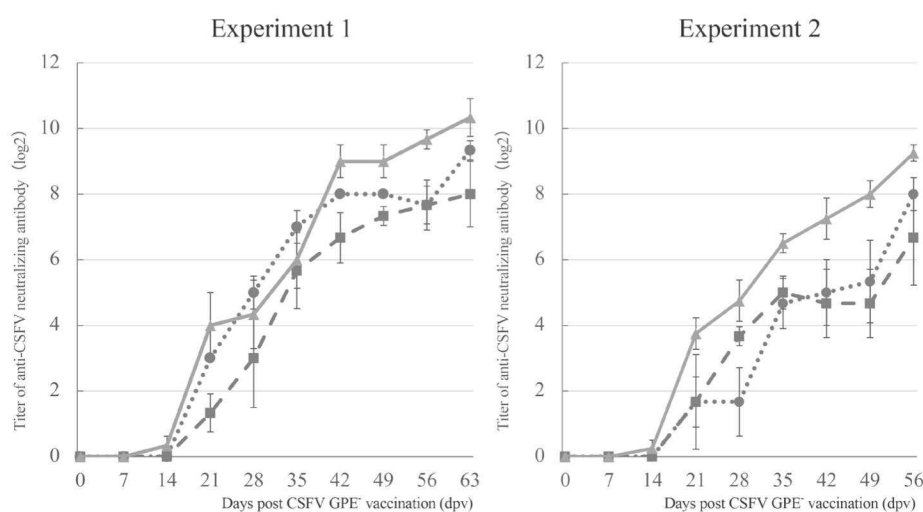


Fig. 1 Averages of neutralizing antibody titers against CSFV in each group in Experiment 1 and 2. The averages of neutralizing antibody titers against CSFV in all groups were up to 64 (2^6) at the end of experiments.

The dotted line represents the mean of the neutralizing antibody in Test group A, the dashed line represents the mean of Test group B and the solid line represents the mean of Control group. Error bars represent standard deviation of each group.

GPE⁻ ワクチン接種後 35 日目までに全頭が 2 倍以上、試験終了時には 32 倍以上まで上昇し、各群の平均値は 64 倍以上となった。試験群 A、試験群 B 及び対照群間で有意差は認められなかったことから、PRRSV-2 ワクチンは GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさないことが確認された。しかし、両試験において、試験群 A 及び B は対照群と比較して CSFV 中和抗体価の上昇が遅れる傾向が認められ、特に、接種間隔が 2 週間の試験 2 において、この傾向が強く認められたことから、PRRSV-2 ワクチンを接種した豚では、GPE⁻ ワクチンによる中和抗体産生が一時的に抑制される可能性が示唆された。

PRRSV ELISA 抗体については、試験 2 の試験群 B の 1 個体を除き、試験群の全頭が陽転した (Table.1, 2)。GPE⁻ ワクチン接種日 (PRRSV-2 ワクチン接種後 14 日目) に採取した血清から RNA を抽出し、PRRSV-2 の ORF6 を検出する qPCR (Revilla-Fernández ら 2005) を実施したところ、PRRSV ELISA 抗体陽性とならなかった個体も含む試験 2 の両試験群の全頭で陽性となったことから、PRRSV ELISA 抗体が陽転しなかった個体についても PRRSV-2 ワクチンが接種されていたことが確認された。PRRS ワクチン接種による PRRSV ELISA 抗体の獲得には約 2 週間かかるという報告 (Meier ら 2003) のとおり、試験 1 では両試験群の全頭が PRRSV-2 ワクチン接種後 11 日目までに、試験 2 では 1 個体を除く両試験群の全頭が接種後 15 日目までに PRRSV ELISA 抗体が陽転し、製剤の違い及び PRRSV-2 ワクチンと GPE⁻ ワクチンの接種間隔の違いによる陽転のタイミングに有意な差は認められなかった。

これらのことから、PRRSV-2 ワクチンの接種は GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさないが、

Table.1 Antibody against PRRSV measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit in Experiment 1.

Antibody against PRRSV of all pigs in Test group A and B turned positive by 11 days post PRRSV-2 MLV vaccination (4 dpv). And all pigs in Control group were negative through the experiment.

+ : S/P value \geq 0.4. Positive. - : S/P value < 0.4. Negative.

Group	Pig #	Days post PRRSV-2 MLV vaccination															
		0	2	4	7	8	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
		Days post CSFV GPE ⁻ vaccination (dpv)															
		-7	-5	-3	0	1	2	4	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Test A	#1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test B	#1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control	#1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table.2 Antibody against PRRSV measured by ELISA kit in Experiment 2.

Antibody against PRRSV of all pigs in Test group A turned positive by 15 days post PRRSV-2 MLV vaccination (1 dpv) and all pigs in Control group were negative through the experiment. PRRSV ELISA antibody of pig #1 and #2 in Test group B became positive at the day of GPE⁻ vaccination, but pig #3 in Test group B was negative through the experiment (S/P value was raised to 0.22). Using qPCR to detect ORF6 of PRRSV-2, the PRRSV-2 gene was detected in RNA extracted from the serum of the pig 14 days post PRRSV-2 MLV vaccination (0 dpv) (data not shown).

+ : S/P value \geq 0.4. Positive. - : S/P value < 0.4. Negative.

Group	Pig #	Days post PRRSV-2 MLV vaccination																	
		0	2	4	7	9	11	14	15	16	18	21	28	35	42	49	56	63	70
		Days post CSFV GPE ⁻ vaccination (dpv)																	
		-14	-12	-10	-7	-5	-3	0	1	2	4	7	14	21	28	35	42	49	56
Test A	#1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Test B	#1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	#1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CSFV 中和抗体価の上昇に遅れが生じる可能性があり、留意が必要であると考えられた。また、GPE⁻ ワクチンは、PRRSV-2 ワクチンによる抗体応答に影響を及ぼさないと考えられた。一方で、PRRSV-2 ワクチン接種 1 週間後に GPE⁻ ワクチンを接種した試験 1 での PRRSV ELISA 抗体の陽転時期は、PRRSV-2 ワクチン接種 2 週間後に GPE⁻ ワクチンを接種した試験 2 での PRRSV ELISA 抗体の陽転時期より早まる傾向が観察されたことから、GPE⁻ ワクチンによる PRRSV-2 ワクチンの有効性への影響について今後検討する必要があると考えられた。

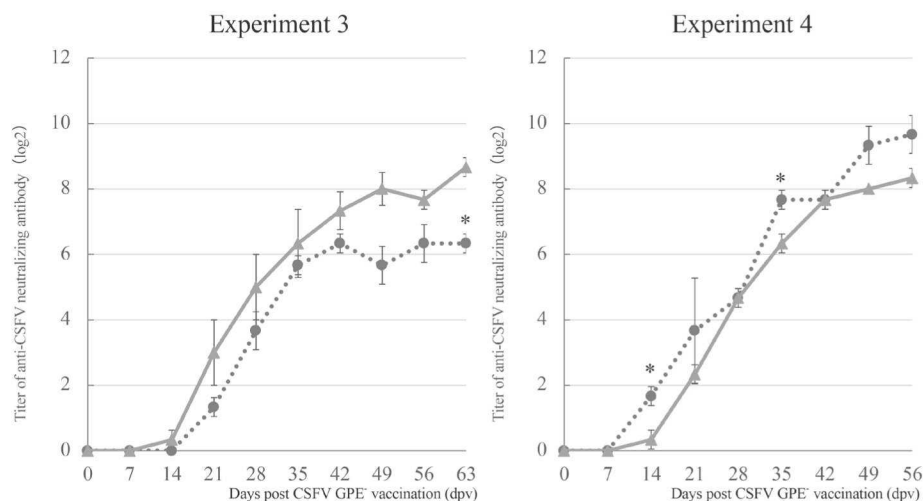


Fig. 2 Averages of neutralizing antibody titers against CSFV in each group in Experiment 3 and 4. The averages of neutralizing antibody titers against CSFV in all groups were up to 64 (2^6) at the end of experiments.

The dotted line represents the mean of the neutralizing antibody in Test group and the solid line represents the mean of Control group.

Error bars represent standard deviation of each group.

* : $p \leq 0.05$

Table 3 Antibody against PRRSV measured by ELISA kit in Experiment 3.

Antibody against PRRSV of all pigs in Test group turned positive by 11 days post PRRSV-1 MLV vaccination (4 dpv). And all pigs in Control group were negative through this experiment.

+ : S/P value ≥ 0.4 . Positive. - : S/P value < 0.4 . Negative.

Group	Pig #	Days post PRRSV-1 MLV vaccination															
		Days post CSFV GPE ⁻ vaccination (dpv)															
		0	2	4	7	8	9	11	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Test	#1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	#2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	#3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Control	#1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	#2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Table 4 Antibody against PRRSV measured by ELISA kit in Experiment 4.

Antibody against PRRSV of all pigs in Test group turned positive by 11 days post PRRSV-1 MLV vaccination (3 dpv). And all pigs in Control group were negative through this experiment.

+ : S/P value ≥ 0.4 . Positive. - : S/P value < 0.4 . Negative.

Group	Pig #	Days post PRRSV-1 MLV vaccination															
		Days post CSFV GPE ⁻ vaccination (dpv)															
		0	2	4	7	9	11	14	15	16	18	21	28	35	42	49	56
Test	#1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control	#1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(2) PRRSV-1 ワクチンの GPE⁻ 生ワクチンへの影響の検討

国内で承認されている PRRSV-1 ワクチン 1 製剤を使用した。試験には試験群 (3 頭) 及び対照群 (3 頭) を設定し、試験群には PRRSV-1 生ワクチンを 3 週齢時に接種し、その後対照群を含めた全頭に GPE⁻ ワクチンを接種した。接種は各製剤の用法及び用量に従った。PRRSV-1 ワクチン及び GPE⁻ ワクチンの接種間隔は、試験 3 では 1 週間、試験 4 では 2 週間とした。PRRSV-1 ワクチン接種直前から 10 週間、(1) と同じスケジュールで採血を行い、CSFV 中和抗体価及び PRRSV ELISA 抗体の測定を行った。

試験 3 及び 4 の群毎の CSFV 中和抗体価の推移を Fig.2 に示した。CSFV 中和抗体価は、GPE⁻ ワクチン接種後 28 日目までに全頭が 2 倍以上、試験終了時には 64 倍以上まで上昇した。このことから、PRRSV-1 ワクチンの接種は GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさないことが確認された。しかし、試験 4 の試験群では対照群と同等の CSFV 中和抗体価の上昇が認められた一方、試験 3 の試験群では対照群と比較して CSFV 中和抗体価の上昇が遅れる傾向が認められたことから、接種間隔が 1 週間の場合、PRRSV-1 ワクチンを接種した豚における GPE⁻ ワクチンによる中和抗体産生が一時的に抑制される可能性があり、これは接種間隔を延長することで影響が軽減される可能性が示唆された。

PRRSV ELISA 抗体については、PRRSV-1 ワクチンを接種した両試験群の全頭が、PRRSV-1 ワクチン接種後 11 日目までに陽転したことから (Table.3, 4)、PRRSV-1 ワクチンと GPE⁻ ワクチンの接種間隔の違いによる陽転のタイミングに差は認められなかった。

これらのことから、PRRSV-1 ワクチンの接種は GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさないが、接種間隔が 1 週間の場合は CSFV 中和抗体価の上昇が遅れが生じる可能性があるため、留意が必要であり、この上昇の遅れは接種間隔を延長することで改善される可能性があると考えられた。また、GPE⁻ ワクチンは、PRRSV-1 ワクチンによる抗体応答に影響を及ぼさないと考えられた。

2. PCV ワクチンの GPE⁻ ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討

国内で承認された単味の PCV ワクチン 4 製剤を使用した。試験には試験群 1 ~ 4 の 4 群、対照群

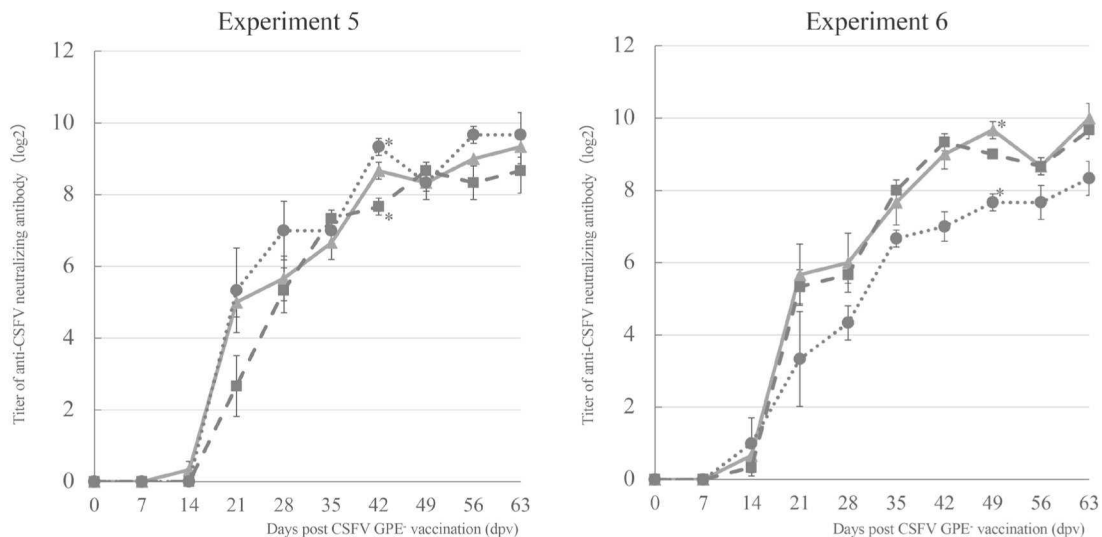


Fig. 3 Averages of neutralizing antibody titers against CSFV in each group in Experiment 5 and 6. The averages of neutralizing antibody titers against CSFV in all groups were up to 256 (2^8) at the end of experiments.

The dotted line represents the mean of the neutralizing antibody in Test group 1 (Experiment 5) and Test group 3 (Experiment 6), the dashed line represents the mean of Test group 2 (Experiment 5) and Test group 4 (Experiment 6) and the solid line represents the mean of Control group A-1 (Experiment 5) and Control group A-2 (Experiment 6).

Error bars represent standard deviation of each group.

*: $p \leq 0.05$

A-1 及び A-2 の 2 群及び対照群 B-1 ～ B-4 の 4 群を設定し、各群 3 頭ずつとした。3 週齢時に全ての試験群及び対照群 B に PCV ワクチンを接種し、1 週間後に全ての試験群及び対照群 A に GPE⁻ ワクチンを接種した。試験群 1 と対照群 B-1、試験群 2 と対照群 B-2、試験群 3 と対照群 B-3 及び試験群 4 と対照群 B-4 にはそれぞれ同じ PCV ワクチンを接種した。接種は各製剤の用法及び用量に従った。PCV ワクチン接種直前から 10 週間、経時的に採血を行い、CSFV 中和抗体価及び PCV2 ELISA 抗体価の測定を行った。採血のスケジュールは、PCV ワクチン接種日から 0, 2, 4, 7, 8, 9, 11, 14 日目まで採血後、7 日間隔で試験終了日まで採血を行った。なお、1 回に飼養できる頭数が限られていたため、試験群 1 及び 2、対照群 A-1、対照群 B-1 及び B-2 を試験 5、試験群 3 及び 4、対照群 A-2、対照群 B-3 及び B-4 を試験 6 として、それぞれ別の期間に実施した。

全ての試験群及び対照群 A について、群ごとの CSFV 中和抗体価の推移を Fig.3 に示した。いずれの PCV ワクチンを接種した試験群でも、対照群 A-1 及び A-2 と同じく、GPE⁻ ワクチン接種後 21 日目に全頭が 2 倍以上、試験終了時には全頭 128 倍以上まで上昇した。なお、CSFV 中和抗体価が全頭 128 倍以上の高値となった後の GPE⁻ ワクチン接種後 49 日目に、試験群 3 と対照群 A-2 の中和抗体価に有

Table 5 Antibody against PCV2 measured by ELISA kit in Experiment 5.

Antibody against PCV2 of all pigs in Test group 1 and Control group B-1 turned positive by 28 days post PCV vaccination (21 dpv).

Antibody against PCV2 of all pigs in Test group 2 and Control group B-2 turned positive by 35 days post PCV vaccination (28 dpv).

All pigs in Control group A-1 were negative at the start and end of the experiment (data not shown).

+ : S/P value \geq 0.5. Positive, - : S/P value < 0.5. Negative.

Group	Pig #	Days post PCV vaccination										
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
		Days post CSFV GPE ⁻ vaccination (dpv)										
		-7	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Test group 1	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Control group B-1	#1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Test group 2	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Control group B-2	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Table 6 Antibody against PCV2 measured by ELISA kit in Experiment 6

Antibody against PCV2 of all pigs in Test group 3 and Control group B-3 turned positive by 56 days post PCV vaccination (49 dpv).

Antibody against PCV2 of all pigs in Test group 4 and Control group B-4 turned positive by 28 days post PCV vaccination (21 dpv).

All pigs in Control group A-2 were negative at the start and end of the experiment (data not shown).

+ : S/P value \geq 0.5. Positive, - : S/P value < 0.5. Negative.

Group	Pig #	Days post PCV vaccination										
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
		Days post CSFV GPE ⁻ vaccination (dpv)										
		-7	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63
Test group 3	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Control group B-3	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Test group 4	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Control group B-4	#1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	#3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

意な差が認められたが、それ以降の時点では、差は認められなかった。また、全ての試験群及び対照群 B の全頭で PCV2 ELISA 抗体が陽転し、GPE⁻ ワクチン接種の有無で陽転のタイミングに差はなかった (Table 5, 6)。なお、全ての対照群 A の全頭で、試験開始時と終了時、PCV2 ELISA 抗体は陰性であった。

これらのことから、接種間隔が 1 週間の場合、PCV ワクチンの接種は GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさないと考えられた。また、GPE⁻ ワクチンの接種は PCV ワクチンによる抗体応答に影響を及ぼさないと考えられた。

3. まとめ

今回得られた試験結果から、PRRS ワクチン及び PCV ワクチンは GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさず、GPE⁻ ワクチンも PRRS ワクチン及び PCV ワクチンによる抗体応答に影響を及ぼさないと考えられた。

今回の検討において、PCV ワクチンによる GPE⁻ ワクチンへの影響を検討した試験 5 及び 6 では、試験終了時までに試験群 1 ~ 4 の全頭で CSFV 中和抗体価が 128 倍以上まで上昇した。また、PRRSV-2 ワクチン及び PRRSV-1 ワクチンによる影響を検討した試験 1 ~ 4 について、試験群のほとんどの個体は 128 倍以上まで上昇したが、32 倍 (PRRSV-2 ワクチンによる影響を検討した試験 2 の試験群 B の 2 個体) 及び 64 倍 (PRRSV-2 ワクチンによる影響を検討した試験 1 の試験群 B の 1 個体及び PRRSV-1 ワクチンによる影響を検討した試験 3 の試験群の 2 個体) の個体も確認された。現在流行している遺伝子型 2.1 型の豚熱ウイルス株を用いた攻撃試験において、GPE⁻ ワクチンを接種した豚は、CSFV 中和抗体価が 8 倍で発症防御したことが報告されていることから (Yamashita ら 2025)、32 倍及び 64 倍の中和抗体価は十分な中和抗体価であると考えられる。しかしながら、これらの抗体価の豚が、豚の肥育期間 (約 6 か月間) を通して十分な中和抗体価が維持できるのか、更には母豚となった場合に十分な移行抗体を子豚に付与できるのか懸念されることから、PRRSV ワクチンによる GPE⁻ ワクチンへの影響については、より長期間の試験 (肥育豚を想定した 6 か月間の試験や産子の移行抗体まで追跡可能な 12 か月間の試験等) による検討も必要と考えられた。

また、GPE⁻ ワクチンは、現在流行している遺伝子型 2.1 型の豚熱ウイルス株に対して、CSFV 中和抗体が産生される前の接種 3 日後には発病予防効果が得られ、5 日後には完全な防御効果が得られることが報告されている (Yamashita ら 2025)。今回の試験では、一般的に GPE⁻ ワクチンの有効性の評価に使用されている CSFV 中和抗体価を評価指標として設定したが、細胞性免疫も大きな役割を果たしていることから、今後、PRRSV ワクチンによる GPE⁻ ワクチンへの影響は、細胞性免疫についても検討が必要と考えられた。

PCV ワクチンについては、試験 6 において、GPE⁻ ワクチン接種後 49 日目に試験群 3 と対照群 A-2 の CSFV 中和抗体価に有意な差が認められた。GPE⁻ ワクチン接種後 49 日目には中和抗体価は全頭 128 倍以上の高値となっており、また、それ以降の時点では差が認められなかったことから、GPE⁻ ワクチンによる免疫獲得に影響を及ぼさないと考えた。しかし、試験群 3 の中和抗体価は試験期間を通じて、試験群 4 及び対照群 A-2 と比べて低く推移しており、今後その要因について検討が必要と考えられた。

4. 研究成果の公表

(1) 国内誌等発表

① 「豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) 生ワクチンの豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」動物医薬品検査所 HP (https://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/pdf/kenkuyuu_20231020.pdf)

② 木田萌子、落合絢子、曳地七星、榊基、細田裕子、森崎一葉、一戸夏美、山崎雅人、長坂孝雄、大

出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）生ワクチンの豚熱（CSF）生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」ALL about SWINE 第 64 号 p31-36

（2）口頭発表

- ①木田萌子、落合絢子、曳地七星、榊基、細田裕子、森崎一葉、一戸夏美、山崎雅人、長坂孝雄、大出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「PRRS 生ワクチンの豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」第 166 回日本獣医学会学術集会（2023 年 9 月）
- ②木田萌子、落合絢子、曳地七星、榊基、細田裕子、森崎一葉、一戸夏美、山崎雅人、長坂孝雄、大出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「PRRS 生ワクチンの豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」第 64 回全国家畜保健衛生業績発表会（2023 年 9 月）
- ③木田萌子、落合絢子、曳地七星、榊基、細田裕子、森崎一葉、一戸夏美、山崎雅人、長坂孝雄、大出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「PRRS 生ワクチンの豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」日本豚病臨床研究会緊急セミナー「迫田先生と考える令和の豚熱対策」（共同研究者である北海道大学迫田義博先生が本研究内容を紹介）（2023 年 10 月）
- ④木田萌子、落合絢子、一戸夏美、曳地七星、榊基、細田裕子、山崎雅人、長坂孝雄、大出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「PRRS 生ワクチンの豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」第 167 回日本獣医学会学術集会（2024 年 9 月）
- ⑤木田萌子、一戸夏美、落合絢子、細田裕子、松本継海、山崎雅人、長坂孝雄、大出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「豚サーコウイルス感染症不活化ワクチンの豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」第 168 回日本獣医学会学術集会（2025 年 9 月発表予定）
- ⑥一戸夏美、木田萌子、落合絢子、細田裕子、松本継海、山崎雅人、長坂孝雄、大出水幹男、山下麻依子、迫田義博、山本欣也「豚サーコウイルス感染症不活化ワクチン及び豚サーコウイルス 2 型感染の豚熱生ワクチンの有効性に及ぼす影響の検討」第 66 回全国家畜保健衛生業績発表会（2025 年 9 月発表予定）

引用文献

Huang, Y., Pang, F.V., Lin, C., Tsai, Y., Chia, M., Deng, M., Chang, C. & Jeng, C. (2011) Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection decreases the efficacy of an attenuated classical swine fever virus (CSFV) vaccine. *Veterinary Research* **42**:115.

香川光生 (2024) PRRS の感染が CSF ワクチンに及ぼす影響：慢性疾病対策は CSF 対策につながる。養豚界 59(10), 730

Kuwata, K., Otsu, K., Inoha, S., Kimura, Y., Aoki, H. & Sakoda, Y. (2025) Negative impact of porcine circovirus type 2 infection on the efficacy of classical swine fever vaccine in a field farm. *Journal of Veterinary Medical Science* **87**(5):509-516.

Meier, WA., Galeota, J., Osorio, FA., Husmann, RJ., Schnitzlein, WM. & Zuckermann, FA. (2003) Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* **309**:18-31.

Revilla-Fernández, S., Wallner, B., Truschner, K., Benczak, A., Brem, G., Schmoll, F., Mueller, M. & Steinborn, R. (2005) The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *Journal of Virological Methodss.* **126**(1-2):21-30.

清水悠紀臣 (2013) 日本における豚コレラの撲滅, 動衛研研究報告第 119 号, 1-9.

下田智彦、入江拓也、戸塚麻喜、川島豪、市川隆久、迫田義博 (2024) 豚繁殖・呼吸障害症候群陰性の農場における豚熱ワクチン接種時の抗体応答に移行抗体が与える影響 日本獣医師会雑誌 77, e81-e88.

Suradhat, S., Kedsangsakonwut, S., Sada, W., Buranapraditikun, S., Wongsawang, S. & Thanawongnuwech, R. (2006) Negative impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection on the efficacy of classical swine fever vaccine. *Vaccine* **24**, 2634-2642.

Tetsuo, M., Matsuno, K., Tamura, T., Fukuhara, T., Kim, T., Okamatsu, M., Tautz, N., Matsuura, Y. & Sakoda, Y. (2020) Development of a High-Throughput Serum Neutralization Test Using Recombinant Pestiviruses Possessing a Small Reporter Tag. *Pathogens* **9**(3), 188. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030188>

Wang, X., Mu, G., Dang, R. & Yang, Z. (2016) Up-regulation of IL-10 upon PRRSV vaccination impacts on the immune response against CSFV. *Veterinary Microbiology* **197**:68-71.

Yamashita, M., Iwamoto, S., Ochiai, M., Sudo, K., Nagasaka, T., Saito, A., Kozasa, T., Omatsu, T., Mizutani, T. & Yamamoto, K. (2025) Efficacy of GPE⁻ strain live attenuated vaccine and CP7_E2alf strain recombinant live vaccine (marker vaccine) against Japanese epidemic classical swine fever virus isolated in 2019 and DIVA discrimination ability of the marker vaccine. *Research in Veterinary Science* **182**, 105484.

[プロジェクト研究終了報告]

動物分野における細菌の全ゲノム解析を用いた分子疫学的研究

小澤真名緒、平岡ゆかり、原田咲、熊川実旺、細井悠太、赤間亮子、松田真理、
川西路子、嶋崎洋子、関口秀人、川野智、小島明美、岩本聖子

(令和7年9月8日受付、令和7年12月12日受理)

Molecular epidemiological studies using whole-genome analysis of bacteria isolated from animals

Manao OZAWA, Yukari HIRAOKA, Saki HARADA, Mio KUMAKAWA, Yuta HOSOI,
Ryoko AKAMA, Mari MATSUDA, Michiko KAWANISHI, Yoko SHIMAZAKI, Hideto
SEKIGUCHI, Motoshi KAWANO, Akemi KOJIMA, Shoko IWAMOTO

National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2-1-22

Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 306-8535, Japan

(Received: 8th Sep 2025, Accepted: 12 Dec 2025)

Abstract

The advent of next-generation sequencing (NGS) has facilitated the acquisition of large amounts of genetic data in microbial research. NGS can detect pathogens, eliminating the need for culture, and enables high-resolution genomic comparisons, making it useful for identifying the origins of pathogens. It is also a powerful tool for tracking changes in antimicrobial resistance and pathogenicity. In this study, we comprehensively identified genes conferring antimicrobial resistance and virulence in animal-derived, antimicrobial-resistant, and pathogenic bacteria through whole-genome analysis. Furthermore, we confirmed the genetic relationships of each isolate using phylogenetic-tree analysis based on core genome single-nucleotide polymorphisms. We also obtained complete genome sequences of the plasmids carried by the isolates through hybrid assembly. Based on the antimicrobial resistance genes and plasmid types identified, we inferred the mechanisms of the co-selection of antimicrobial resistance by plasmids and the origin of the plasmids. The findings of this study helped us determine the mechanisms of the emergence and transmission of antimicrobial-resistant and pathogenic bacteria.

要旨

次世代シーケンサー（NGS）の登場により、微生物研究では大量の遺伝子データが得られるようになった。NGSは培養不要で病原体を検出でき、ゲノム比較も高解像度で可能なため、病原体の由来の特定に有効であるとともに、耐性や病原性の変化を追跡する強力なツールとしても活用されている。本研究では、動物由来薬剤耐性菌及び病原細菌について、全ゲノム解析によって菌の保有する薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子を網羅的に検出した。また、コアゲノム SNPs (cgSNPs) に基づく系統樹解析により、各株の遺伝的な関係を確認した。さらに、ハイブリッドアセンブルによって株が保有するプラスミドの完全長の塩基配列を取得し、保有する薬剤耐性遺伝子やプラスミド型から、プラスミドによる共選択機構やプラスミドの由来の推定を行った。これらの結果から、薬剤耐性菌、病原細菌の発生・伝播機序の推定を行うことができた。

緒言

近年、次世代シーケンサー（NGS）の登場により、得られる遺伝子データの量が急速に上昇している。多細胞生物と比較してゲノムサイズが小さく、比較的シンプルなデータ解析を行う微生物研究において、全ゲノムを対象とできる NGS は特に有用とされている。そのメリットとしては、病原体の検出は事前培養していないサンプルからも可能であり、ゲノム同士の比較も従来の方法と比較してより高解像度であり、ゲノム中の全ての塩基を追跡することが可能であることから、病原体の由来の特定に大きな力を発揮する。また、薬剤耐性、病原性の変化を追跡するための強力なツールでもある。

薬剤耐性菌の出現と伝播は世界的に重要な問題となっており、ワンヘルスの考えに基づく薬剤耐性菌対策が喫緊の課題となっている。ゲノム情報は高精度な遺伝情報であり、米国食品医薬品局（FDA）では 50 万株以上の食中毒菌（サルモネラ等）のデータベース（Genome Traker, <https://www.fda.gov/food/whole-genome-sequencing-wgs-program/genometraker-network>) を構築し、このゲノム情報を利用して有効な感染症対策の立案を進めている。また、国内においても、国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所の病原体ゲノム解析研究センターが中心となり、薬剤耐性菌ゲノム情報を収集し、それを統合ゲノムデータベース GenEpid-J に格納している (<https://gph.niid.go.jp/genepid-j/release>)。現在、4000 株以上の薬剤耐性菌株から染色体 DNA 配列と、8000 以上のプラスミドのドラフト配列を格納済みである。また、同研究所の薬剤耐性研究センターが構築している薬剤耐性菌バンク (<https://www.jarbb.jp>) においても、薬剤耐性菌のゲノム情報の収集が行われている。

動物や魚類由来の病原細菌についても、発生・伝播機序の解明や病原性及び抗原性等の解析にゲノム解析の技術が用いられてきている。豚丹毒菌の解析においては、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のグループが、全ゲノム解析の結果に基づき、野外株と生ワクチン株を識別する PCR を開発し現場で用いられてきている状況であり (Shiraiwa ら 2015)、当所としてもワクチン株と野外株の性状等について検討していく必要がある。また、近年、海面養殖魚から分離された新しい血清型の *Lactococcus garvieae* について、血清型 I 型及び II 型のワクチンが効かないという報告があり (南ら 2023)、東京海洋大学のグループがこの新しい血清型の株の全ゲノム解析を進めているところである (Mahmoud ら 2023)。

以上のように、NGS を技術基盤としたゲノムデータベースを公衆衛生上の課題解決に活用する動きが加速する状況の中、家畜衛生分野については、当所プロジェクト研究として 2018 年度から 2020 年度まで実施した「次世代シーケンサーを用いた家畜衛生分野における細菌及びウイルスゲノム解析技術に関する研究」(五藤ら 2021) において、家畜由来の薬剤耐性菌や病原細菌について、基本的な解析技術を確立し、各種分子疫学的解析を行ってきた。しかし、NGS データについては、データの量が膨大であり、解析技術も多岐にわたるため、必ずしも得られたゲノムデータがすべて生かされているとは言えない状況にある。そのため、さらなる分子疫学的な解析を進めていくことが求められている。

目的

本プロジェクト研究の目的は、①家畜衛生分野における細菌の NGS を用いて取得したゲノム情報を蓄積し、②薬剤耐性遺伝子、病原遺伝子の検出、各種分子疫学的解析を行うことにより薬剤耐性菌、病原細菌の発生・伝播機序を推定し、③根拠に基づいたリスク管理措置策定のための基礎資料を提供することである。さらに、病原細菌については、病原性及びワクチンの有効性についての検討を行う。

研究成果

1. 薬剤耐性菌の解析

(1) 健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子の解析

2020年及び2021年に分離されたコリスチン（CL）のMIC $2\mu\text{g/mL}$ 以上の健康家畜由来大腸菌（牛：3株、豚：10株、鶏1株）及びサルモネラ（鶏：154株）について、Mahazuら（2024）のmultiplex PCR法によりコリスチン（CL）耐性遺伝子（*mcr-1*～*mcr-10*）を検出した。その結果、大腸菌では、*mcr-1*が牛から1株、豚から10株、鶏から1株、*mcr-3*が豚から1株、*mcr-5*が牛由来から1株検出された。なお、豚由来の*mcr-3*は、*mcr-1*保有株から検出された（図1）。一方サルモネラからはいずれの*mcr*遺伝子も検出されなかった。これらの株のうち、CL耐性遺伝子保有株について、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を行った。Phylogroupはヒトにおいては常在菌の分類とされるB1型（7株）が最も多く、次いでA型が（5株）で多かった。一方、ヒトにおいて腸管外病原性株とされるB2型は1株のみであった。Sequence Type（ST）はすべての株で異なっていた。また、2021年に分離された*mcr-1*保有株6株の内5株は、プラスミドの型別を行うPlasmidFinder（<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>）により、IncI2プラスミドを保有することがわかった。

健康家畜由来株におけるコリスチン耐性遺伝子の保有割合が増加している傾向などは確認されなかったが、これまで病畜由来のサルモネラでは検出されていたものの、2020年に健康な家畜由来大腸菌から初めて*mcr-3*遺伝子が確認されたことから、今後、その遺伝子学的性状や検出動向も注視が必要である。

(2) 健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子（*mcr-5*）保有プラスミドの解析

2010年から2015年に健康家畜（牛、豚、鶏）から分離された大腸菌のうち、*mcr-5*遺伝子を保有する26株についてハイブリッドアセンブルによって*mcr-5*が乗っている環状プラスミドの配列を取得し、そこに乗っている耐性遺伝子の検出及びInc型の決定を行った（表1）。プラスミドに乗っている耐性遺伝子の数は1から11とバリエーションがあったが、*mcr-5*のみが乗っているIncFIIのプラスミド

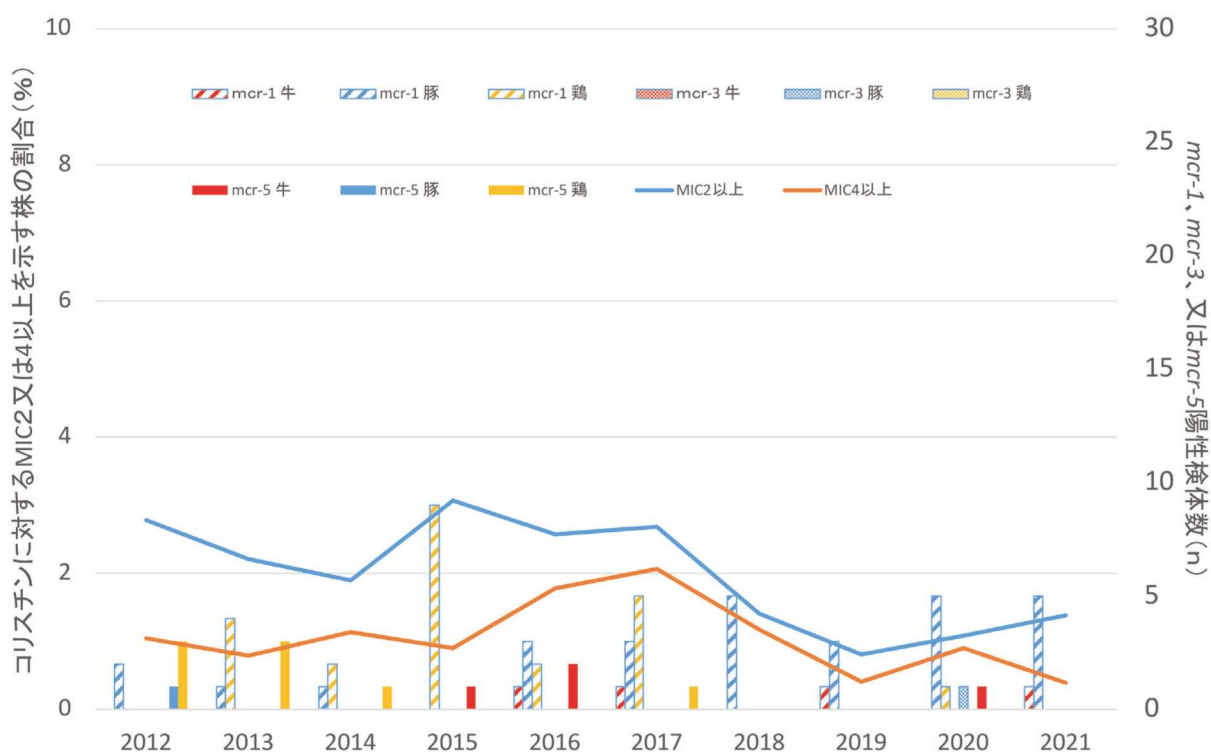


図1 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌
コリスチン耐性遺伝子（*mcr-1*～*mcr-5*）の検出

表1 *mcr-5* 保有プラスミド

Isolates	Source	Contig length	Resistance genes	Plasmid types	No. of resistance genes
23-Ec-B-230	Bovine	11623	<i>mcr-5.1</i>	ColRNAI_1	1
24-Ec-P-72	Porcine	45345	<i>mcr-5.1</i>	IncX1	1
27-Ec-B-117	Bovine	60037	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pCoo)	1
23-Ec-B-2	Bovine	63337	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pCoo)	1
25-Ec-B-35	Bovine	68021	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pCoo)	1
23-Ec-B-246	Bovine	70101	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
23-Ec-B-111	Bovine	70125	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
26-Ec-B-165	Bovine	70554	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
27-Ec-P-20	Porcine	74286	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
22-Ec-B-66	Bovine	75139	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
26-Ec-B-19	Bovine	77816	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(29)	1
23-Ec-B-216	Bovine	77825	<i>mcr-5.1</i>	IncFII(pHN7A8)	1
22-Ec-B-4	Bovine	100633	<i>mcr-5.1</i>	IncFIB(AP001918),IncFII(pHN7A8)	1
24-Ec-B-164	Bovine	21222	<i>mcr-5.1,mcr-5.1</i>	ND	2
22-Ec-P-33	Porcine	66256	<i>bla_{TEM-1B},mcr-5.1</i>	IncFII_1	2
24-Ec-B-164	Bovine	70418	<i>bla_{TEM-1B},mcr-5.1</i>	IncFII(pCoo)	2
24-Ec-B-162	Bovine	73079	<i>bla_{TEM-1B},mcr-5.1</i>	IncFII(pCoo)	2
23-Ec-C-40	Chicken	128849	<i>mcr-5.1,tet(A)</i>	IncFIB(AP001918)_1	2
27-Ec-P-94	Porcine	73426	<i>aph(3'')-Ib,aph(6)-Id,mcr-5.1,floR</i>	IncFII(pCoo)	4
27-Ec-P-95	Porcine	73432	<i>aph(3'')-Ib,aph(6)-Id,mcr-5.1,floR</i>	IncFII(pCoo)	4
24-Ec-C-191	Chicken	127138	<i>tet(A),mcr-5.1,qnrS1,sitABCD</i>	IncFIB(AP001918)	4
22-Ec-C-148	Chicken	127186	<i>tet(A),mcr-5.1,qnrS1,sitABCD</i>	IncFIB(AP001918)	4
23-Ec-C-90	Chicken	128475	<i>tet(A),mcr-5.1,qnrS1,sitABCD</i>	IncFIB(AP001918)	4
24-Ec-C-143	Chicken	130648	<i>aph(3'')-Ia,tet(A),mcr-5.1,sitABCD</i>	IncFIB(AP001918)	4
25-Ec-C-36	Chicken	129772	<i>tet(A),mcr5.1,qnrS1,sitABCD,,dfrA14</i>	IncFIB(AP001918)	5
24-Ec-P-72	Porcine	142733	<i>aadA1,aadA2,bla_{TEM-1B},tet(A),mcr-5.1,cmlA1,sul3,dfrA12</i>	IncFIB(AP001918)	8
26-Ec-B-209	Bovine	211953	<i>aph(3'')-Ia,aph(3'')-Ib,aph(6)-Id,bla_{TEM-1B},bla_{CTX-M-2},tet(B),mcr-5.1,catA1,sul2</i>	IncHI1B(R27)_1_R27	9
22-Ec-P-12	Porcine	155101	<i>aadA2,aph(3'')-Ib,aph(6)-Id,ant(3'')-Ia,bla_{TEM-1B},mcr-5.1,cmlA1,floR,sul3,dfrA1,dfrA12</i>	IncFII(pCoo)_1_pCoo,IncN1,IncX1_1	11

(60Kb ~ 77Kb) が牛由来株 9 株及び豚由来株 1 株から検出された (表 1 の灰色部分)。また、*mcr-5* 及び β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{TEM-1B}*) が乗った IncFII のプラスミド (66Kb ~ 73Kb) が牛由来株 2 株及び豚由来株 1 株から (表 1 のオレンジ色部分)、*mcr-5* の他にテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet(A)*)、フルオロキノロン耐性遺伝子 (*qnrS1*) 等が乗っているプラスミド (127Kb ~ 130Kb) が鶏由来株 5 株から (表 1 の緑色部分)、*mcr-5* の他にアミノグリコシド耐性遺伝子 (*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id*) 及びフロルフェニコール耐性遺伝子 (*floR*) が乗っているプラスミド (73Kb) が豚由来株 2 株から (表 1 の黄色部分) 検出された。以上の結果より、種に特異的なプラスミドが広まっている可能性及び牛と豚で共通のプラスミドが広まっている可能性が示唆された。

(3) 豚由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の解析

2018 年から 2022 年にかけて、と畜場の豚から分離された家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (LA-MRSA) について、全ゲノム解析を実施した。遺伝子型は、ST398 が 65.9% (58/88 株)、ST5 が 27.3% (24/88 株) であり、ST398 が大勢を占めた。ST398 の *spa* 型は t034 が 82.8% (48/58 株)、SCC*mec* 型は Vc 型が 68.9% (40/58 株) と主であり、91.4% (53/58 株) の株は、亜鉛耐性遺伝子 (*czrC*) を保有していた。(図 2)。

LA-MRSA は、多くの系統の抗菌剤に対する耐性遺伝子を保有し、ST398 分離株は、全 58 株 (100%) が 1 つまたは 2 つのテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet(K)*、*tet(L)*、*tet(M)*) を有していたのに対し、ST5 分離株は 24 株中 14 株 (58.3%) のみがテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet(K)*、*tet(L)*) の 1 つを有しており、いずれも *tet(M)* を有していなかった (図 3 (A))。マクロライド耐性遺伝子に関しては、ST398 分離株の 25 株 (43.1%) が 1 つの耐性遺伝子 *erm(A)* または *erm(C)* を有していたのに対し、ST5 分離株では 17 株 (70.8%) が *erm(C)* を有していたが、いずれも *erm(A)* を有していなかった (図 3 (B))。

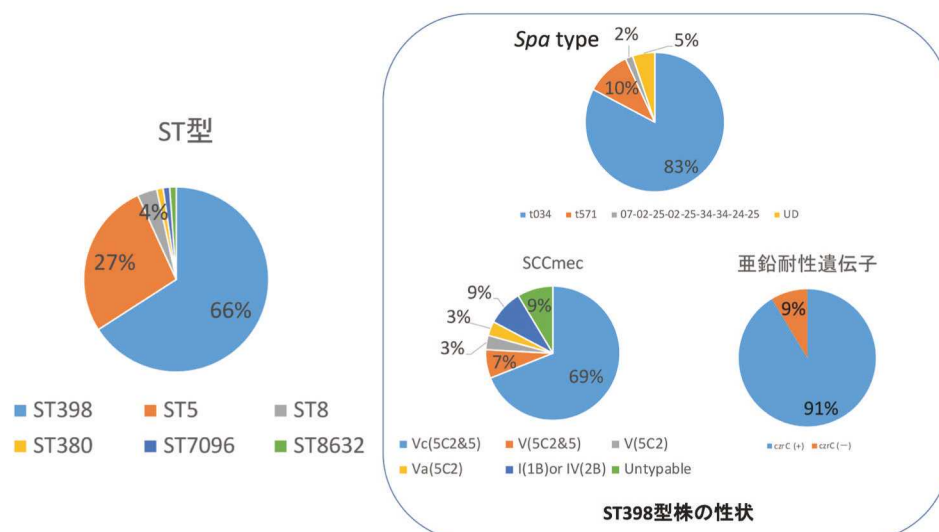


図 2 豚由来の MRSA の性状

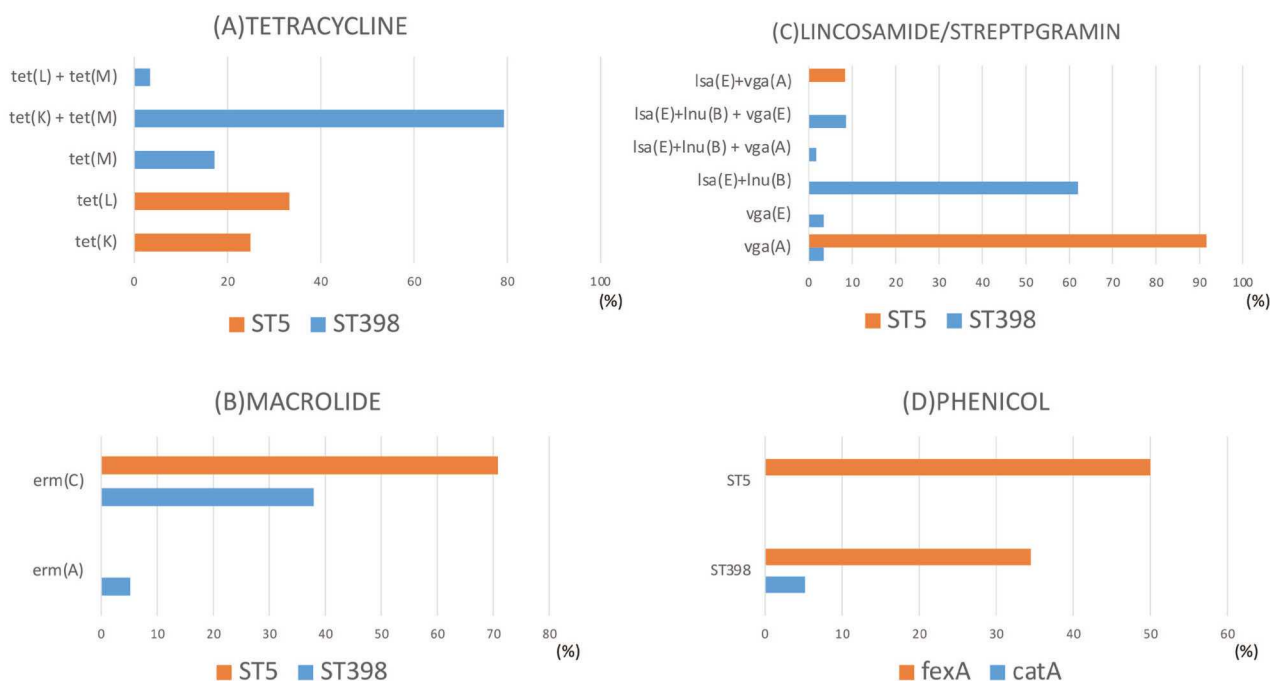


図 3 豚由来 MRSA が保有する薬剤耐性遺伝子 (ST398 VS ST5)

リンコサミド/ストレプトマイシン耐性遺伝子については、ST398 分離株の 62.1% が *Isa(E)+Inu(B)* を有し、ST5 分離株は *vga(A)* 遺伝子の 100% を保有し、2つの分離株 (8.3%) も *Isa(E)+vga(A)* 遺伝子を保有していた (図 3 (C))。

ST398 および ST5 は、それぞれ 20 株 (34.5%) および 12 株 (50%) の分離株において、フェニコール耐性遺伝子 *fexA* を有していた。*catA* 遺伝子は ST398 分離株のみで、ST5 分離株は保有していなかった。以上のように ST398 株と ST5 株では保有する耐性遺伝子に違いが認められた (図 3 (D))。また、先に述べたように ST398 分離株の 91.4% が亜鉛耐性遺伝子を保有していた (図 2) 結果と合わせると、多剤耐性および亜鉛耐性に関連する共選択圧が LA-MRSA の持続性に大きく寄与している可能性を示した。

cgSNPs 解析の結果、豚由来の ST398 株と ST5 株はヒト由来の MRSA とは異なるクラスターに分類

された (図4 及び5)。また両 ST の株は、免疫回避遺伝子 (*scn*、*sak*、*chp*) を欠いていた。以上のことから、豚由来 LA-MRSA がヒトに伝播し、現在の臨床現場で問題となる可能性は今のところ低いが、

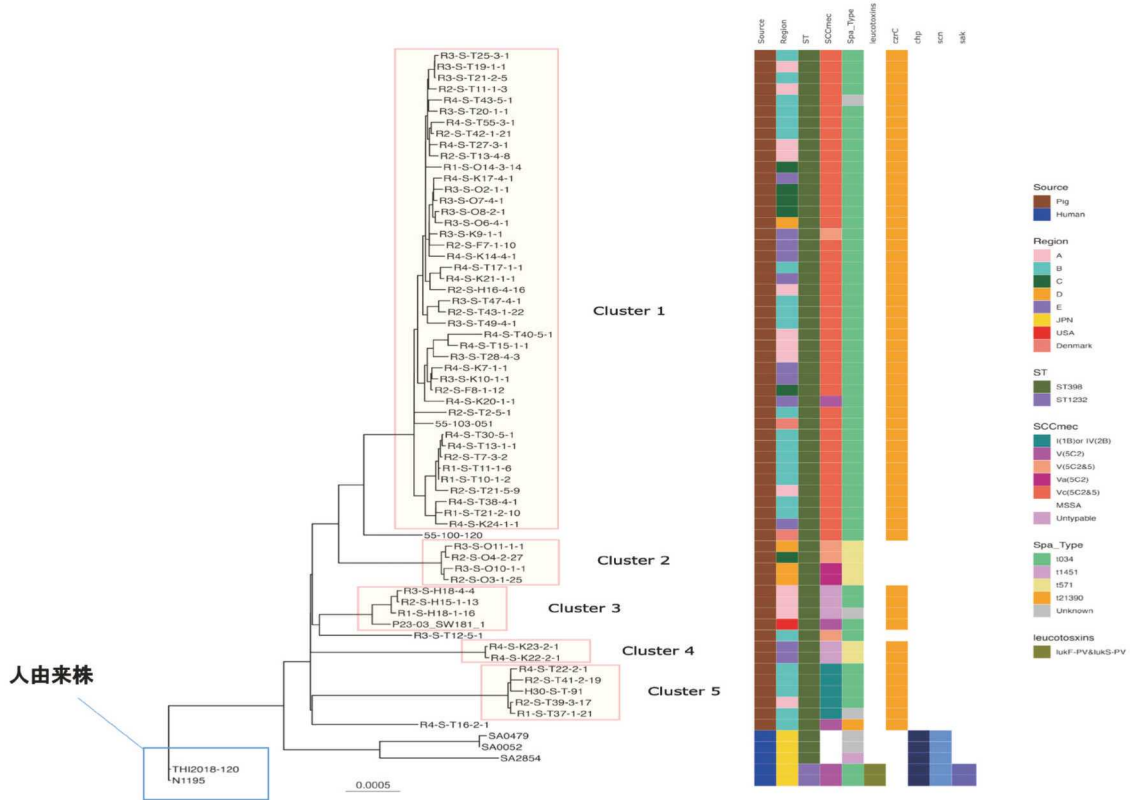


図4 cgSNPs解析_ST398

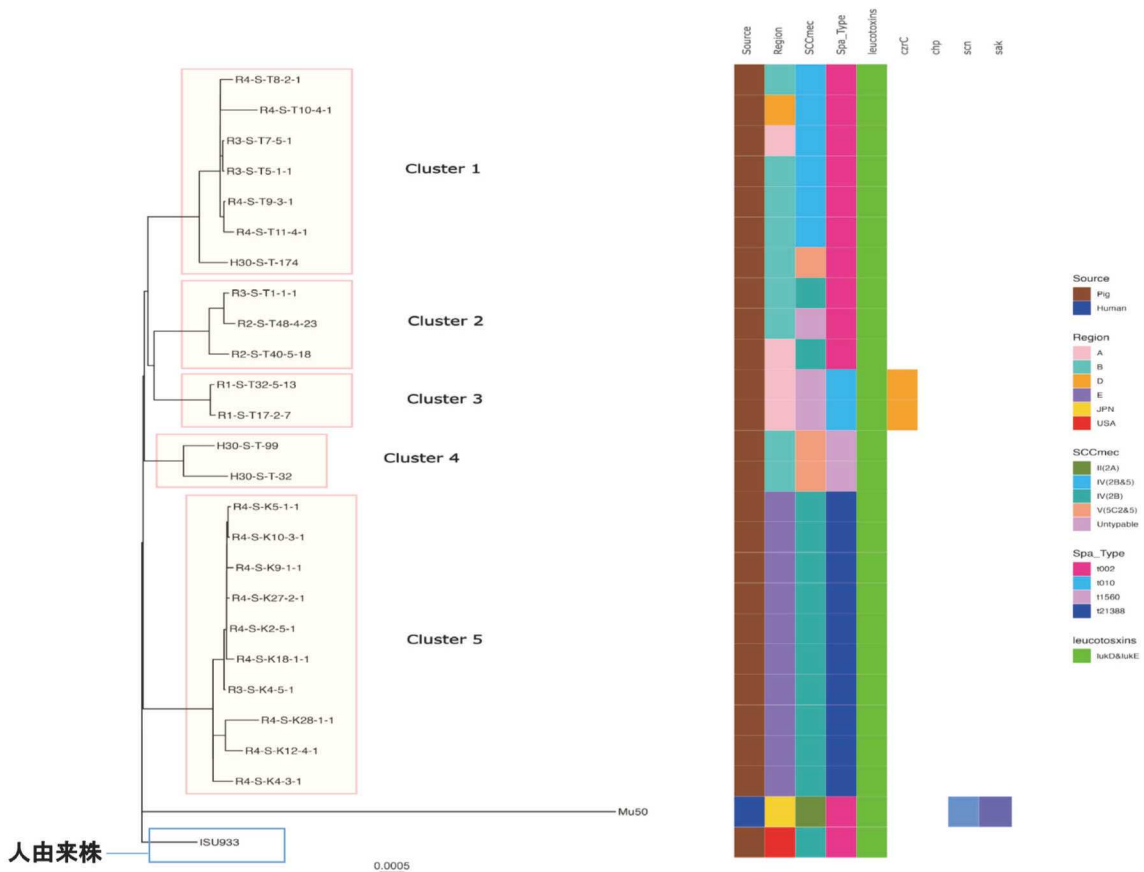


図5 cgSNPs解析_ST5

その伝播を防ぐためには、抗菌剤の慎重な使用の徹底、亜鉛の使用は、必要最小限の量を含む飼料としての使用に制限すること、そして、豚由来 LA-MRSA をヒトに伝播させないように手洗い、消毒等の衛生対策を徹底することが必要であると考えられた。

(4) 豚由来大腸菌における共選択機構の解析

2004年から2007年に健康豚から分離されたテトラサイクリン耐性大腸菌のうち、接合伝達試験で複数の耐性遺伝子が伝達された株を用いて、供与株と接合伝達株の保有するプラスミドをハイブリッドアセンブルにより検出した(表2)。供与株からは、伝達された耐性に対応した遺伝子を持つプラスミドが検出された。また、そのうち3株については供与株と接合伝達株の保有するプラスミドを比較したところ、塩基配列がほぼ一致した(カバー率100%、一致率99.97~100%) (図6)。以前の報告で統計

表2 プラスミドによる耐性遺伝子の伝達

供与株	供与株の保有遺伝子	伝達された遺伝子	供与株のプラスミドが保有する遺伝子	伝達されたプラスミドが保有する遺伝子
16-Ec-P-53	<i>aph(3')-Ia, tet(A), dfrA5</i>	<i>aph(3')-Ia, tet(A), dfrA5</i>	<i>aph(3')-Ia, tet(A), dfrA5</i>	-
17-Ec-P-49	<i>aadA5, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, bla_{TEM-1B}, mph(A), tet(B), catA1, sul1, sul2, dfrA17</i>	<i>aadA5, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, bla_{TEM-1B}, mph(A), tet(B), catA1, sul1, sul2, dfrA17</i>	<i>aadA5, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, bla_{TEM-1B}, mph(A), tet(B), catA1, sul1, sul2, dfrA17</i>	<i>aadA5, aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, bla_{TEM-1B}, mph(A), tet(B), catA1, sul1, sul2, dfrA17</i>
17-Ec-P-82	<i>bla_{TEM-1B}, mcr-5.1, catA1, tet(B)</i>	<i>bla_{TEM-1B}, mcr-5.1, catA1, tet(B)</i>	<i>tet(B), catA1</i>	-
			<i>bla_{TEM-1B}, mcr-5.1</i>	-
17-Ec-P-86	<i>aadA1, aadA2, aph(3')-Ia, bla_{TEM-1B}, mcr-5.1, tet(A), cmlA1, sul3</i>	<i>aadA1, aadA2, aph(3')-Ia, tet(A), cmlA1, sul3</i>	<i>aadA2, aph(3')-Ia, tet(A), cmlA1, sul3</i>	-
18-Ec-P-42	<i>aadA1, aadA2, tet(A), cmlA1, sul3</i>	<i>aadA1, aadA2, tet(A), cmlA1, sul3</i>	<i>aadA2, tet(A), cmlA1, sul3</i>	<i>aadA2, tet(A), cmlA1, sul3</i>
19-Ec-P-07	<i>aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, mcr-5.1, tet(A)</i>	<i>aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, mcr-5.1, tet(A)</i>	<i>aph(6)-Ia, aph(3'')-Ib, mcr-5.1, tet(A)</i>	-
19-Ec-P-66	<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM-1B}, tet(A), tet(M), cmlA1, sul3, dfrA12</i>	<i>aadA1, aadA2, bla_{TEM-1B}, tet(A), tet(M), cmlA1, sul3, dfrA12</i>	<i>aadA2, bla_{TEM-1B}, tet(A), tet(M), cmlA1, sul3, dfrA12</i>	<i>aadA2, bla_{TEM-1B}, tet(A), tet(M), cmlA1, sul3, dfrA12</i>

赤字:テトラサイクリン系耐性遺伝子とフェニコール系耐性遺伝子が同時に伝達

緑字:アミノグリコシド系耐性遺伝子とβ-ラクタム系耐性遺伝子が同時に伝達

青字:アミノグリコシド系耐性遺伝子とコリスチン耐性遺伝子が同時に伝達

○:Donorの保有遺伝子、伝達された遺伝子、Donorのプラスミドが保有する遺伝子(または伝達されたプラスミドが保有する遺伝子)が完全に一致

○:Donorの保有遺伝子、伝達された遺伝子、Donorのプラスミドが保有する遺伝子(または伝達されたプラスミドが保有する遺伝子)が概ね一致

アミノグリコシド系耐性遺伝子: *aadA2, aadA5, aph(3')-Ia, ant(3'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Ia*, β-ラクタム系耐性遺伝子: *bla_{TEM-1B}*, テトラサイクリン系耐性遺伝子: *tet(A), tet(B), tet(M)*, コリスチン耐性遺伝子: *mcr-5*, フェニコール系耐性遺伝子: *catA1, cmlA1*, スルホンアミド系耐性遺伝子: *sul1, sul2, sul3*, トリメトプリム系: *dfrA5, dfrA12, dfrA17*

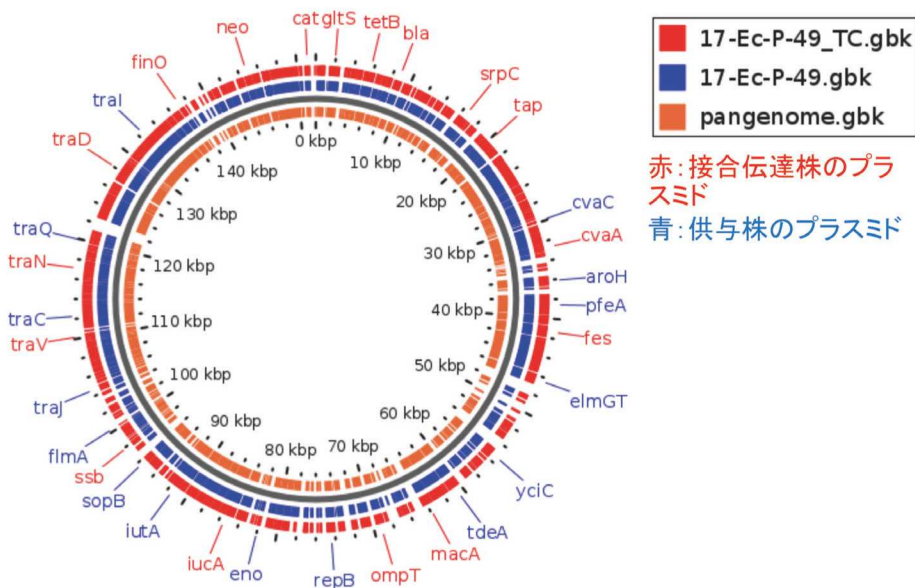


図6 供与株と接合伝達株が保有するプラスミドの比較

的に有意な関係が認められた (Makita ら 2016)、テトラサイクリン系の使用とクロラムフェニコール耐性選択及びβ-ラクタム系薬剤の使用とジヒドロストレプトマイシン耐性選択について注目したところ、この解析によりテトラサイクリン系耐性遺伝子とフェニコール系耐性遺伝子及びβ-ラクタム系耐性遺伝子とアミノグリコシド系耐性遺伝子が同じプラスミドに乗って同時に伝達されていたことが今回の解析で明らかになった。また、コリスチン耐性遺伝子がアミノグリコシド系耐性遺伝子と同じプラスミドに乗って同時に伝達されていた。これらの結果から、複数の耐性遺伝子が同一のプラスミドに乗って伝達され、共選択に関与していることが示唆された。抗菌剤の使用にあたっては、プラスミド等の可動性伝達因子について考慮し、同時に薬剤耐性遺伝子が伝達されている抗菌剤の組み合わせについては、共選択の可能性も考慮して慎重に抗菌剤を選択する必要があると考えられた。

(5) 病気の犬猫由来第3世代セファロスポリン耐性株の性状調査

2017年から開始された愛玩動物由来耐性菌モニタリングにより病気の犬猫由来大腸菌で第3世代セファロスポリン系抗菌剤耐性株 (CTX 耐性株) が家畜より高率に確認された。2021年以前に分離された株のゲノム解析により、CTX-M型遺伝子を保有していた犬由来24株、猫由来13株のうち、犬由来19株 (79.2%) 及び猫由来12株 (92.3%) でプラスミドからCTX-M型遺伝子が確認された。また、ゲノム解析を行った株全体において、ST型-血清型-系統発生群ではST131-O25:H4-B2が最も多く、CTX-M型遺伝子では *bla*_{CTX-M-27} が最も多く認められた。

CTX-M型遺伝子保有プラスミドを詳細に解析した結果 *bla*_{CTX-M-27} は、薬剤耐性遺伝子 *aadA5*、*aph(6)-Id*、*aph(3'')-Ib*、*sul*、*sul2*、*tet(A)*、*dfrA17*、*mph(A)* を保有する IncF 型プラスミドと、その他の薬剤耐性遺伝子を全く保有しない IncF 型プラスミドの2つのタイプのプラスミド上にあることが確認された。*bla*_{CTX-M-15} は、CTX-M27型と同様、薬剤耐性遺伝子 *aadA5*、*aph(6)-Id*、*aph(3'')-Ib*、*sul*、*sul2*、*tet(A)*、*dfrA17*、*mph(A)* を保有する IncF 型プラスミドの他、様々な薬剤耐性遺伝子保有のパターンを示す IncF 型、IncI 型プラスミドに、*bla*_{CTX-M-14} は、その他の薬剤耐性遺伝子を全く保有しない IncB/O/K/Z、IncI1、又は IncF 型プラスミド上にあることが確認された (表3)。

愛玩動物で多く確認された *bla*_{CTX-M-27} を保有する IncF プラスミドは、海外ではヒト医療分野からも検出されていることから愛玩動物分野における抗菌剤の慎重使用の徹底の他、基本的な衛生管理が重要と考えられた。

表3 病気の犬猫由来 CTX-M 型遺伝子保有プラスミドの性状

β-lactamase	number of plasmids	plasmid type	Resistance genes and antimicrobial agent classes							
			Aminoglycoside			Quinolone	Sulfonamide	Tetracycline	Trimethoprim	Macrolide
<i>bla</i> _{CTX-M-27}	8	IncF	<i>aadA5</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA17</i>	<i>mph(A)</i>
<i>bla</i> _{CTX-M-27}	4	IncF								
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1	IncF	<i>aadA5</i>	<i>aph(6)-Id</i>	<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA17</i>	<i>mph(A)</i>
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1	IncF						<i>tet(A)</i>		
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1	IncI								
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	1	IncF	<i>aac(3)-IIa</i>			<i>qnrB4</i>	<i>sul1</i>		<i>dfrA17</i>	
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	7	IncB/O/K/Z, IncI1, IncF								

2. 動物由来病原細菌の解析

(1) *Actinobacillus pleuropneumoniae* 野外分離株の解析

2018年及び2021年に病気の豚から分離された59株を用いた。これらの株について全ゲノムシーケンシングによってドラフトゲノム配列を取得し、毒素遺伝子と薬剤耐性遺伝子の検出を行った。さらに、cgSNPsに基づく系統樹の作成によって株間の遺伝的関係を調査した。その結果、血清型2（71.2%）が最も多く、これまでの報告と同様であったが（Moriokaら2008）、血清型6（13.6%）及び血清型15（6.8%）が増加し、血清型1（1.7%）及び血清型5（3.4%）は減少していた。分離株数の変化は、日本では、血清型1・2・5型を対象としたワクチンが主に使用されており、ワクチン接種が野外株の流行に影響を与えた可能性を示唆した。Apx毒素遺伝子の保有は、既報と同様であった（Freyら1993）。系統樹では、株は血清型ごとにクラスターに分かれていた（図7）。血清型2では2つのクラスターが形成され、各クラスター内で同じ地域内で近縁な株が分布していた（図8）。耐性遺伝子は、テトラサイクリン耐性が最も多く（32.2%）、次いでサルファ剤耐性（15.3%）、アミノグリコシド耐性（11.9%）であった。62.5%の株は、第一次選択薬のフロルフェニコール耐性遺伝子をはじめいずれの耐性遺伝子も保有していなかった。以上のように、全ゲノム解析結果から、毒素遺伝子と薬剤耐性遺伝子を網羅的に検出し、株間の遺伝的な関連性を把握することができた。既存のワクチンの製造用株と遺伝的性状が異なる株が広まっている可能性はあるが、薬剤感受性試験により治療効果のある薬剤を選択することが可能であると考えられた。

(2) *Lactococcus garvieae* 野外分離株の解析

2021年に病気のブリから分離された*L. garvieae*40株を用いた。全ゲノム解析により、病原性遺伝子と抗菌剤耐性遺伝子の存在、及び分離株間の遺伝的関係を調べた。その結果、血清型II（現在は*Lactococcus formosensis*）が（82.5%）が最も多く、次いで血清型I（17.5%）が多かった。新しい血清型とされている血清型IIIは認められなかった。血清型Iと血清型IIが持つ病原性遺伝子のパターンには

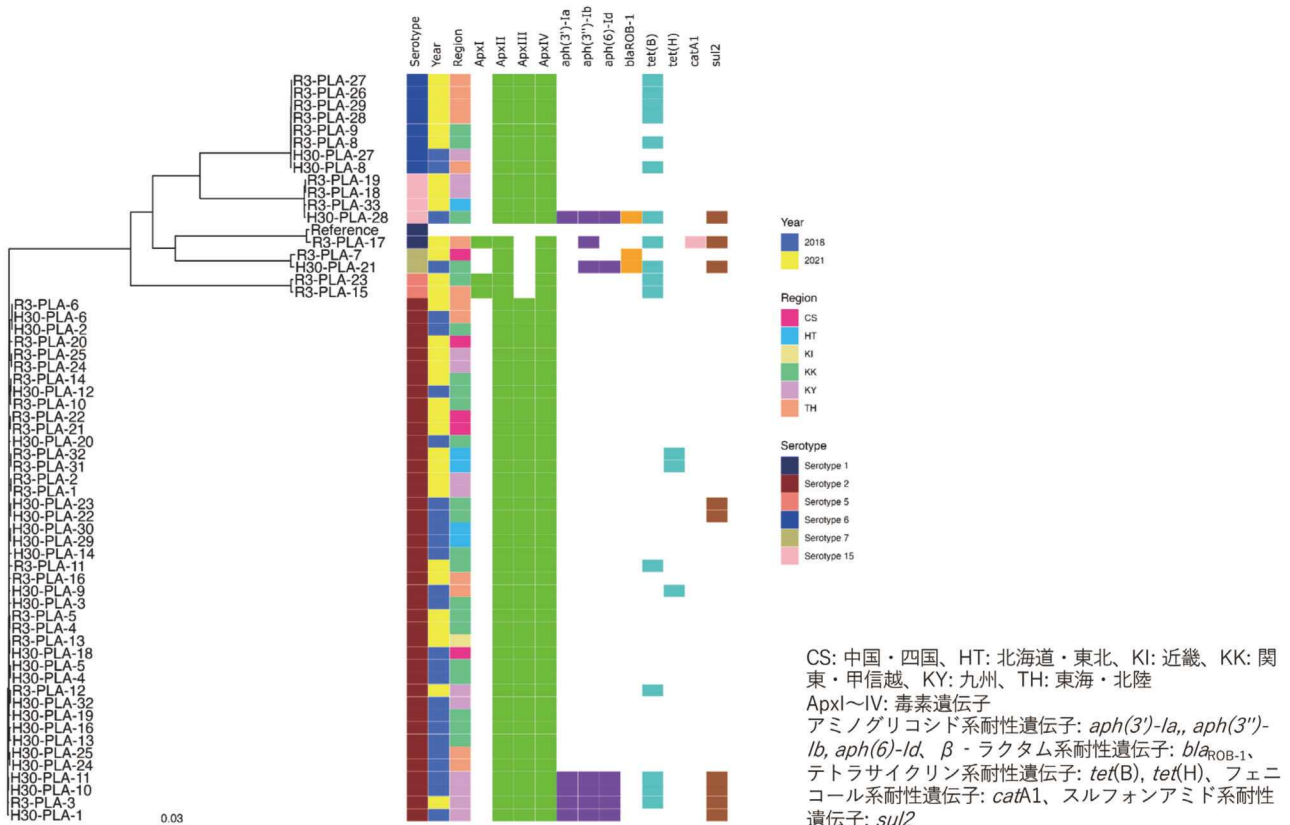


図7 *A. pleuropneumoniae* の各種性状

違いがあった。リンコマイシンに対する耐性が最も多く(85.0%)、次いでエリスロマイシン耐性(12.5%)であった。以前の調査と比較して、テトラサイクリンとエリスロマイシンの耐性率は減少し、リンコマ

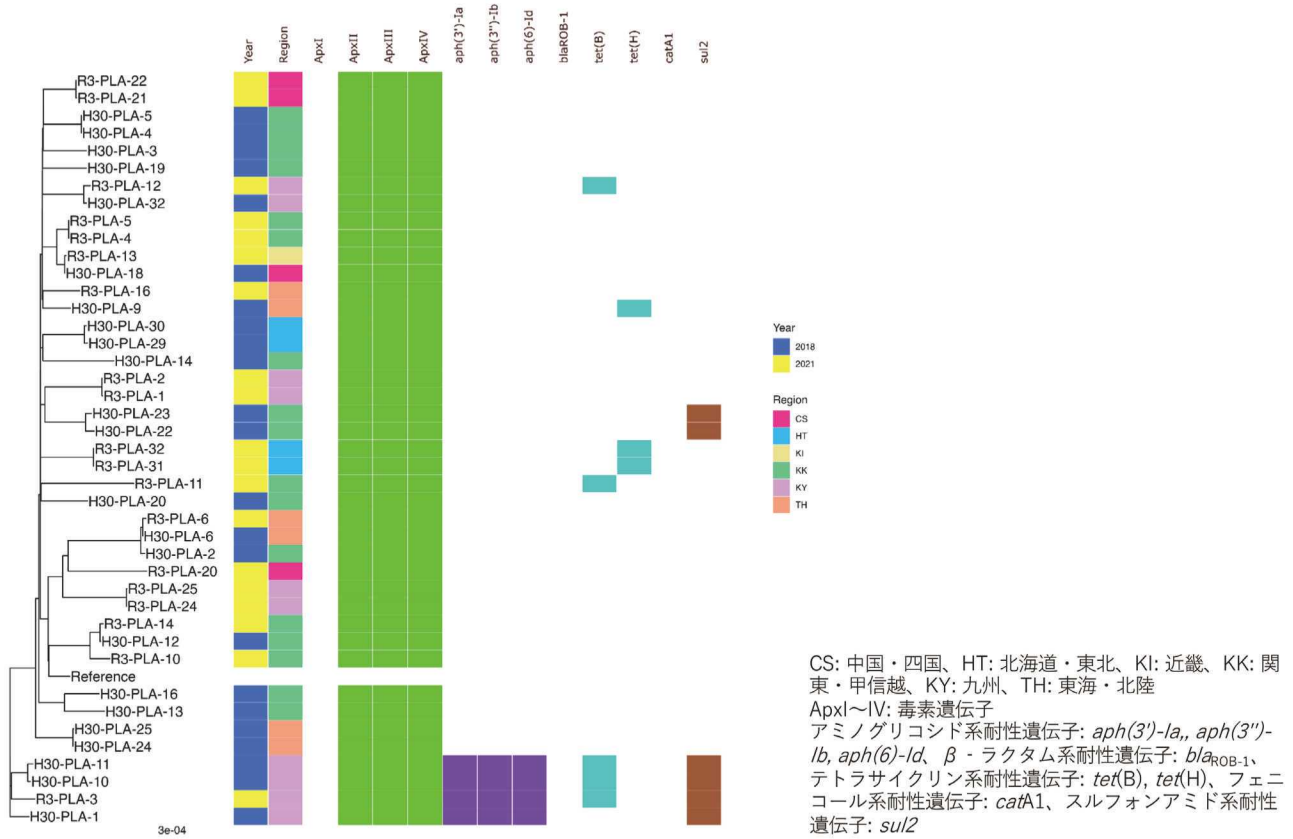


図8 *A. pleuropneumoniae* (血清型2) の各種性状

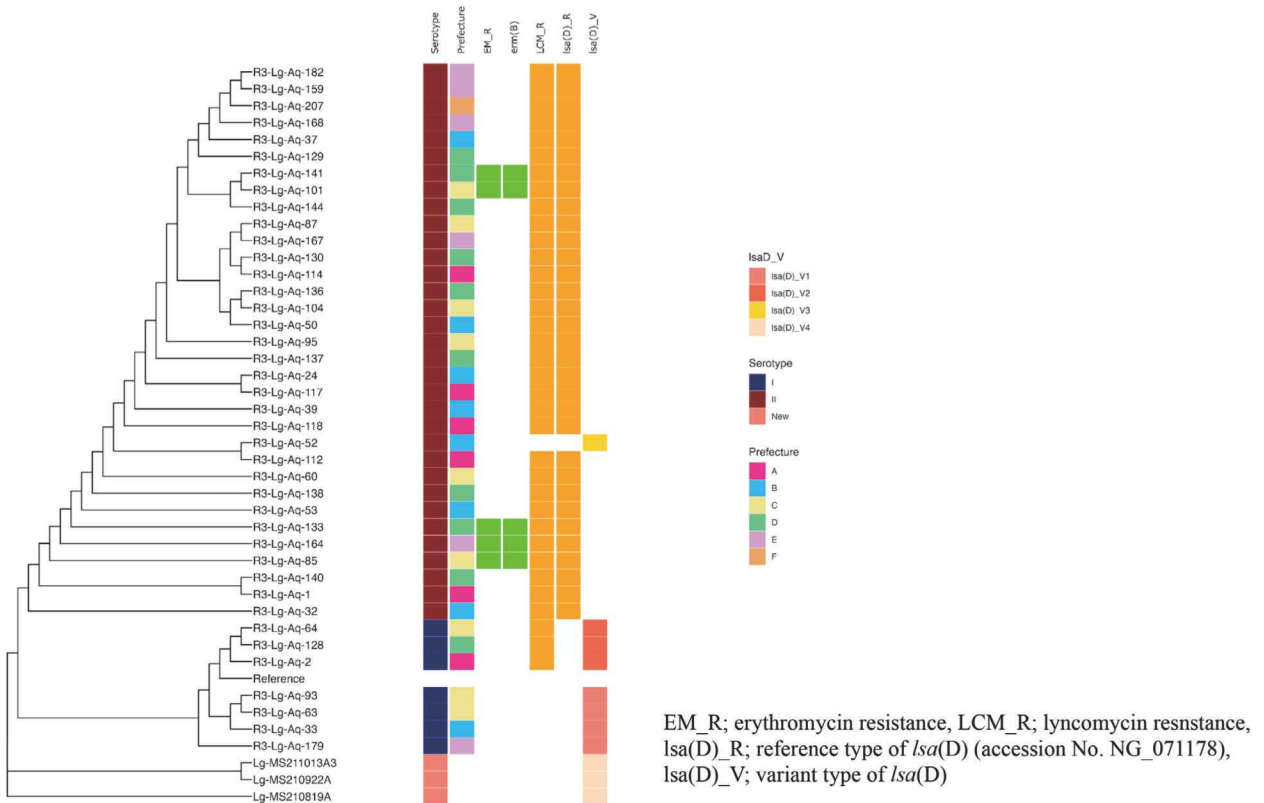


図9 *L. garvieae* の各種性状

イシンの耐性率は増加していた。すべてのエリスロマイシン耐性分離株は *erm*(B) を保有していた。cgSNPs に基づく系統樹は、分離株が血清型ごとにクラスター化されていることを示した (図9)。クラスター内では、同じ県内で関連する分離株が見つかった。血清型 II の株のみの系統樹では、エリスロマイシン耐性で *erm*(B) を保有する株が一つのクラスターにまとまっていた (図10)。 *erm*(B) 遺伝子はプラスミド上に乗っていた。以前に報告されている、血清型 I の株が持っているプラスミド (pKL0018) と血清型 II の株が持っているプラスミド (pkh2101) の配列と、今回解析した血清型 II の株が持っているプラスミド (pLg85 及び pLg133) の配列を比較した結果、血清型 II の株が持っているプラスミドの配列はほぼ一致したが (カバー率 98%、一致率 100%)、血清型 I の株が持っているプラスミドとは異なっていた (図11)。また、血清型 I の株が持っているプラスミドにはエリスロマイシン耐性遺伝子と

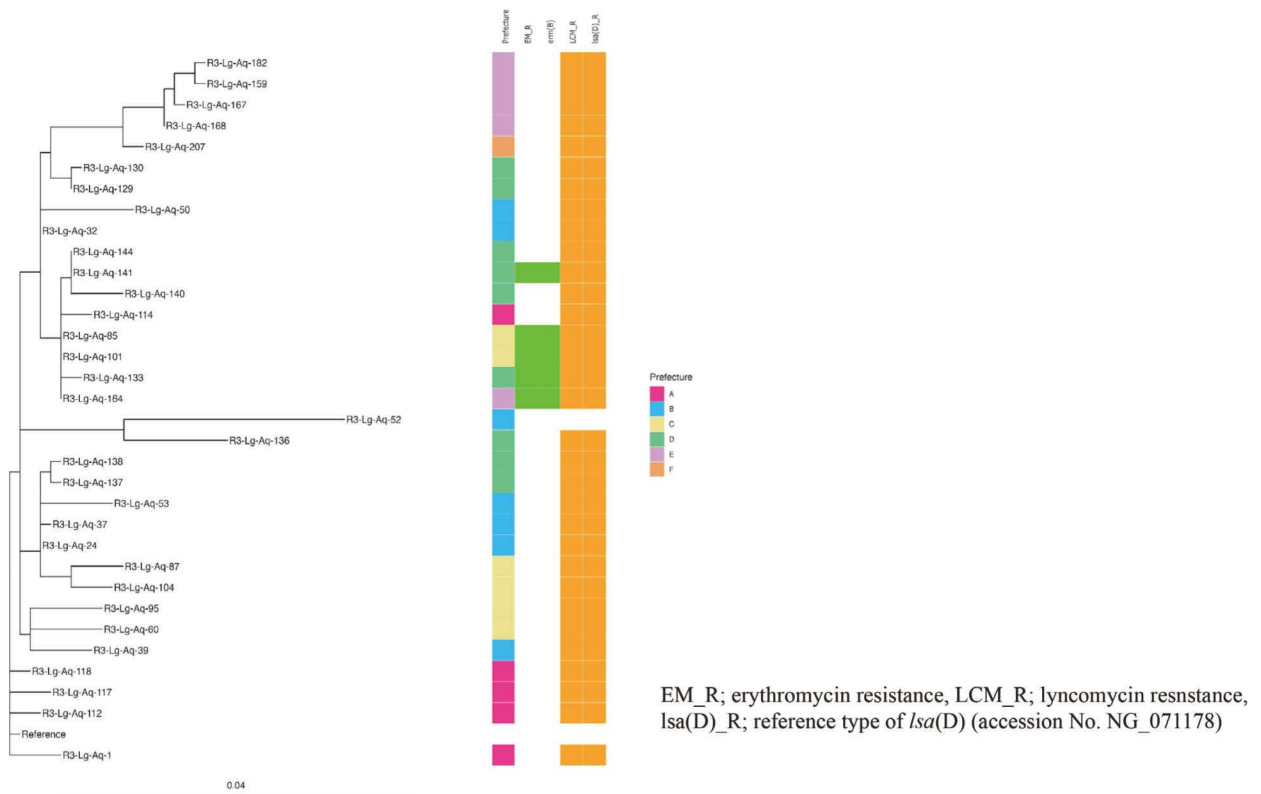


図10 *L. garvieae* (血清型 II) の各種性状

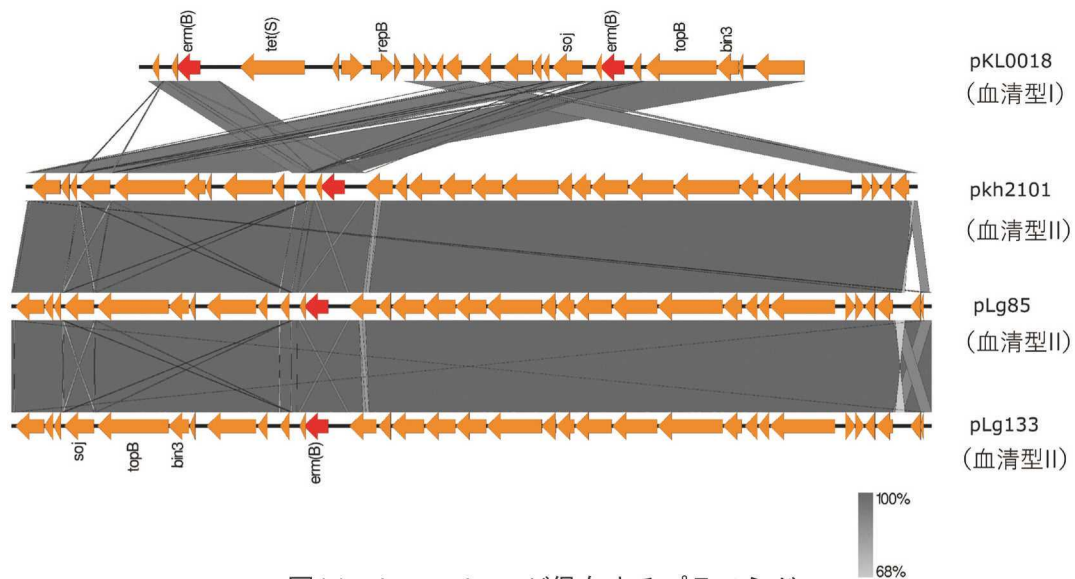


図11 *L. garvieae* が保有するプラスミド

テトラサイクリン耐性遺伝子を保有していたのに対し、血清型 II が持っているプラスミドはエリスロマイシン耐性遺伝子のみを保有していた。これらの結果から、血清型 I 株の減少は、テトラサイクリンおよびエリスロマイシン耐性の減少に関連していると考えられた。新たな血清型は検出されなかったが、今後の動向に注意が必要である。リンコマイシンの耐性率は高かったが、テトラサイクリン、アンピシリン、フロルフェニコールに対する耐性は認められず、感受性試験により適切な抗菌剤を選択できることが示唆された。

(3) 豚丹毒菌生ワクチン株（小金井 65-0.15 株）と野外分離株の識別

2014 年から 2017 年に 1 か所のと畜場及び 3 か所の家畜保健衛生所で分離された、慢性症例由来で SNP-based PCR (Shiraiwa ら、2015) 陽性の 51 株を用いた。全ゲノムシーケンスによってドラフトゲノム配列を取得し、それらの配列について、豚丹毒生ワクチンの製造用株である小金井 65-0.15 株（以下、「小金井株」とする。）を参照として SNP 等の変異の検出及び cgSNPs による系統樹の作成を行った。さらに、小金井株を寒天培地で継代し、SNP 数の変化を調べた。その結果、明確ではないが大きく 2 つのクラスターに分類された（図 12）。小金井株と同じクラスター（クラスター 2）には 40 株、もう 1 つのクラスター（クラスター 1）には 11 株が属していた。SNP の詳細な比較では、小金井株と比較して、SNP が 0 であった株は 1 株のみであった。その他の株は SNP 数が 1～22 であった（表 4）。SNP の場所はほぼランダムであったが、クラスター 1 に属する 11 株中 10 株は、小金井株の 1221546 番目の塩基に SNP があり、その 10 株中 5 株では 1338240 番目の塩基に SNP があった。また 11 株中 4 株で 62473 番目の塩基に SNP 及び 582057 番目の塩基に欠失が認められた。

さらに、小金井株を寒天培地で継代し、SNP 数の変化を調べた。寒天平板で 30 代まで継代を行い、5 代ごとに SNP を確認したところ、15 代目で初めて SNP が 2 か所検出され、20 代目でも 2 か所のままであったが、30 代目で 1 か所増えて 3 か所となった。この変異 3 か所のうち 2 か所は、クラスター 1 の株で認められた 62473 番目の塩基の SNP 及び 502057 番目の塩基の欠失と同一であった。

野外株の SNP 数のバリエーションは 0～22 と大きなものではなかったが、系統樹解析では小金井株の属するクラスター 2 とそれ以外のクラスター 1 の 2 つに分かれた。このクラスターはあまり明確ではなかったが、クラスター 1 の株の中には継代によって生じると考えられる変異があったことから、由来は不明であるが、クラスター 1 の株は豚の体内や環境中等での継代によって変異が蓄積した株であると考えられた。また、肥育豚においてワクチン接種から出荷までの肥育期間の間には多くの SNP が生じ

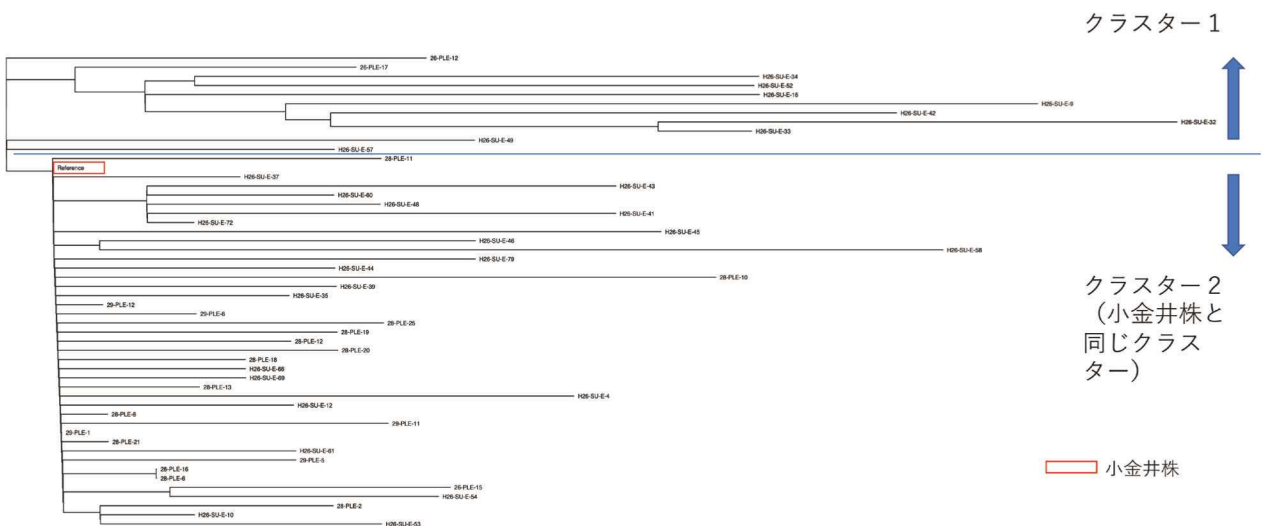


図12 豚丹毒菌野外株の cgSNPs に基づく系統樹

表 4 SNP 等の変異

	SNP	Insertion	Deletion	Complex	Total		SNP	Insertion	Deletion	Complex	Total
29-PLE-1	0	0	0	0	0	28-PLE-25	7	0	0	0	7
28-PLE-8	1	0	0	0	1	28-PLE-11	7	0	2	0	9
28-PLE-21	1	0	1	0	2	H26-SU-E-53	7	0	2	0	9
29-PLE-12	1	0	1	0	2	29-PLE-11	7	1	2	0	10
28-PLE-6	2	0	2	0	4	H26-SU-E-48	7	0	3	0	10
28-PLE-16	2	0	2	0	4	H26-SU-E-54	8	0	0	0	8
29-PLE-6	3	0	0	0	3	26-PLE-15	8	0	1	0	9
H26-SU-E-10	3	0	0	0	3	26-PLE-17	8	0	1	0	9
H26-SU-E-72	3	0	2	0	5	26-PLE-12	8	2	2	1	13
28-PLE-13	3	1	1	0	5	H26-SU-E-46	9	1	0	0	10
H26-SU-E-37	4	0	0	0	4	H26-SU-E-79	9	1	0	0	10
28-PLE-18	4	0	1	0	5	H26-SU-E-45	9	0	1	2	12
H26-SU-E-66	4	1	0	0	5	H26-SU-E-41	10	0	2	1	13
H26-SU-E-69	4	0	1	0	5	H26-SU-E-49	11	1	1	0	13
H26-SU-E-57	4	0	1	2	7	H26-SU-E-4	11	1	2	0	14
28-PLE-12	5	0	0	0	5	H26-SU-E-43	12	1	2	0	15
29-PLE-5	5	0	1	0	6	H26-SU-E-16	13	0	2	1	16
H26-SU-E-35	5	0	1	0	6	28-PLE-10	14	0	1	0	15
H26-SU-E-12	5	2	0	0	7	H26-SU-E-33	14	0	1	0	15
H26-SU-E-61	5	0	2	0	7	H26-SU-E-42	14	0	2	2	18
H26-SU-E-44	6	0	0	0	6	H26-SU-E-52	15	0	0	0	15
28-PLE-2	6	1	0	0	7	H26-SU-E-34	16	0	0	0	16
28-PLE-19	6	0	1	0	7	H26-SU-E-58	19	1	3	0	23
H26-SU-E-39	6	0	1	0	7	H26-SU-E-9	22	0	1	0	23
28-PLE-20	6	1	1	0	8	H26-SU-E-32	22	0	1	0	23
H26-SU-E-60	6	0	4	0	10						

クラスター 1 (小金井株と異なるクラスター)

ないという報告 (Ohno ら 2023) 及び 30 代継代して SNP が 3 か所しか生じなかったことから、クラスター 1 の株については、小金井株から派生した可能性は否定できないものの、生ワクチンの接種とは直接関係なく、環境中等で継代された株が豚に感染して発症した症例から分離されたものと考えられた。

3. 蓄積した全ゲノムデータからの解析

mcr 保有大腸菌、食鳥処理場由来サルモネラ、と畜場及び食鳥処理場由来カンピロバクター、豚由来 MRSA、犬猫由来 ESBL 産生大腸菌等について、第二世代シーケンサーによってドラフトゲノム配列を取得し、ゲノムデータベース (Japanese Veterinary Epidemiology and Genomics, JVEG) にデータを入力した。2020 年以降のトータルの解析数は、染色体または全 DNA が約 2100 サンプル、プラスミドが約 300 サンプルとなった。

解析を行った食鳥処理場由来大腸菌 453 株について解析結果を集計したところ、大腸菌の Phylogroup はヒトにおいては常在菌の分類とされる B1 型 (37%) が最も多く、次いで A が (30.5%) が多かった (図 13)。一方、ヒトにおいて腸管外病原性株とされる B2 (1.9%) および D (6.6%) の割合は小さかった。ST は Unknown を含め 131 種類に分かれ、ST10 が一番多く (7.1%)、次いで ST117 (6.4%) であった。また、血清群は O 型では 95 種類に分かれて O8 が一番多く (4.4%)、次いで O88 (4.0%) であった。系統解析では、腸管外病原性株の割合は少なかった。ST 及び血清型からは、大腸菌は多岐にわたるものであった。

薬剤耐性遺伝子については、薬剤排出ポンプに関与する遺伝子である *mdf(A)* (63.1%)、アミノグリコシド耐性遺伝子である *aph(6)-Id* (38.9%)、次いで *aph(3'')-Ib* (38.0%)、サルファ剤耐性遺伝子である *sul2* (32.5%)、テトラサイクリン系耐性遺伝子である *tet(A)* (35.8%)、*tet(B)* (13.7%) の保有率が高かった。

また、ヒト医療上重要な薬剤である第 3 世代セファロスポリンに関する耐性遺伝子は *bla_{CMY-2}* が 5 株、*bla_{CTX-M-14}* が 4 株、*bla_{CTX-M-55}* が 2 株、*bla_{CTX-M-2}* が 2 株、*bla_{CTX-M-1}* が 1 株、*bla_{CTX-M-15}* が 1 株のみ確認された。*bla_{CMY-2}* 保有株の内 4 株、*bla_{CTX-M}* 保有株の内 8 株は、アミノグリコシド耐性遺伝子を保有していた。鶏には、これまで第 3 世代セファロスポリン製剤は承認されたことはないものの、以前は、孵卵

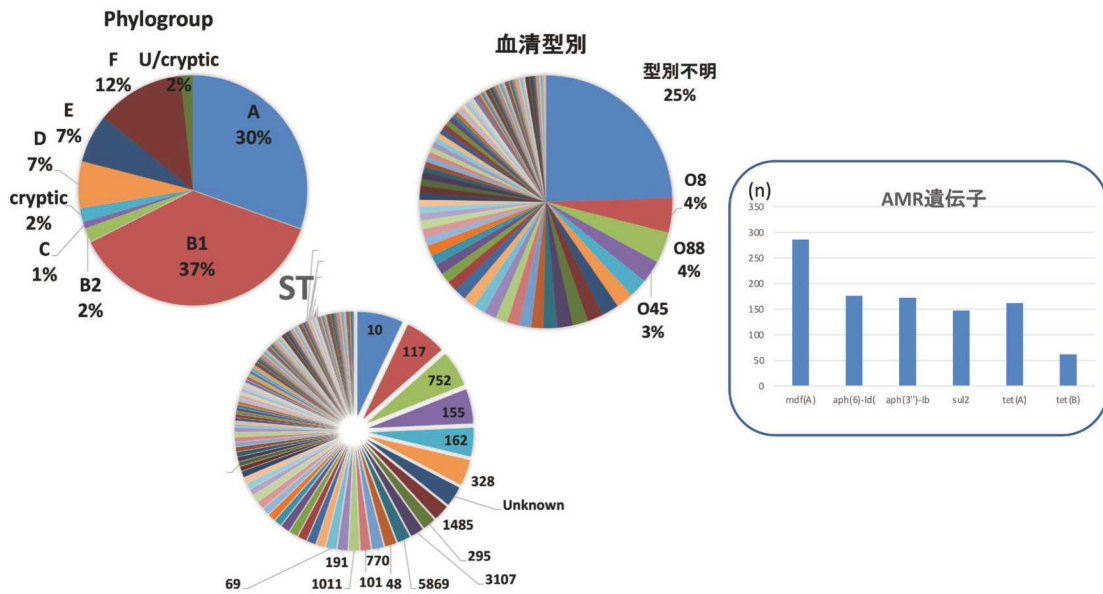


図13 健康な鶏由来大腸菌の性状

場において、ワクチンの卵内接種時に第3世代セファロスポリンを混合して接種する適応外使用が実施されていた。しかし、2012年に農林水産省から生産者団体に、耐性率の上昇の状況を示した上でその使用中止を指導し、生産者団体から自主規制の通知がされたことにより、第3世代セファロスポリンの使用は中止された。現在、アミノグリコシド系のカナマイシンやストレプトマイシンが、第3世代セファロスポリンの代わりにワクチンに混合接種されているという情報もあり、それらの適応外使用により、第3世代セファロスポリン耐性遺伝子が共選択されている可能性も考えられた。

また、近年食用動物からヒト医療上非常に重要な抗菌剤であるチゲサイクリンのプラスミド性耐性遺伝子 (*tet(X)*) を保有している大腸菌が分離されているという報告があることから (Heら 2019)、JVEG のデータを確認したところ、*tet(X)* を保有している株は認められなかった。

以上のように、蓄積したデータにより、対象とする耐性遺伝子の有無を迅速に検出し、野外株における耐性遺伝子保有状況を把握することができた。

4. まとめ

本研究では、動物由来の薬剤耐性菌および病原細菌について、NGSを用いてゲノム情報を取得・蓄積した。これらの情報を活用することにより、各菌が保有する薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子を網羅的に検出し、野外株におけるそれらの遺伝子の分布状況を把握することができた。また、分子疫学的解析を通じて、薬剤耐性菌および病原細菌の発生および伝播の機序を推定することが可能となった。これらの知見は、リスク管理措置を策定するための基礎的資料として活用されることが考えられる。一方で、ワクチンの有効性に関する解析には至らず、今後の課題として残された。

5. 学術雑誌への投稿

(1) 国際誌等発表

① Ozawa, M., Furuya, Y., Akama, R., Harada, S., Matsuda, M., Abo, H., Yoshida, E., Furuno, M., Fukuhara, H., Kasuya, K., Shimazaki, Y. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs in Japan. *Veterinary Microbiology* 273 (2022): 109523.

② Ozawa, M., Shirakawa, T., Moriya, K., Furuya, Y., Kawanishi, M., Makita, K., Sekiguchi, H. Role of

Plasmids in Co-Selection of Antimicrobial Resistances Among *Escherichia coli* Isolated from Pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 20(2023), 435-441.

③ Ozawa, M., Kawano, M., Abo, H., Issiki, Y., Kumakawa, M., Kawanishi, M., Kojima, A., Iwamoto, S. Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Japan using whole genome sequencing. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 102(2023), 102062.

④ Kawanishi, M., Matsuda, M., Abo, H., Ozawa, M., Hosoi, Y., Hiraoka, Y., Harada, S., Kumakawa, M., Sekiguchi, H. Prevalence and Genetic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Pigs in Japan. *Antibiotics*, 13(2024), 155.

⑤ Hiraoka (Furuya), Y., Abo, H., Matsuda, M., Harada, S., Kumakawa, M., Shirakawa, T., Ozawa, M., Kawanishi, Sekiguchi, H., Shimazaki, Y. Third-generation Cephalosporin-resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Diseased Dogs and Cats: Report from Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. *Veterinary Microbiology*, 298(2024), 110220.

(2) 口頭発表

①小澤真名緒、原田咲、阿保均、古谷ゆかり、赤間亮子、白川崇大、松田真理、川西路子、嶋崎洋子. 健康家畜由来大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子の保有状況について. 第164回日本獣医学会学術集会. 2021年.

②小澤真名緒、白川崇大、森谷このみ、古谷ゆかり、松田真理、川西路子、蒔田浩平、関口秀人. 豚由来大腸菌での共選択機構におけるプラスミドの関与. 第165回日本獣医学会学術集会. 2022年.

③小澤真名緒、一色ゆかり、川野智、小島明美、岩本聖子. 日本の豚から分離された *Actinobacillus pleuropneumoniae* の次世代シーケンサーを用いた性状解析. 第166回日本獣医学会学術集会. 2023年.

④川西路子、松田真理、小澤真名緒、阿保均、森谷このみ、平岡ゆかり、原田咲、熊川実旺、首藤江梨奈、宮澤一枝、関口秀人. 国内の豚由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分離状況と遺伝子性状解析. 第166回日本獣医学会学術集会. 2023年.

引用文献

Frey, J., Bosse, J.T., Chang, Y.-F., Cullen, J.M., Fenwick, B., Gerlach, G.F., Gygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T.J., Jansen, R., Kamp, E.M., Macdonald, J., MacInnes, J.I., Mittal, K.R., Nicolet, J., Rycroft, A.N., Segers, R.P.A.M., Smits, M.A., Stenbaek, E., Struck, D.K., van den Bosch, J.F., Willson, P.J. & Young, R., 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, pleurotoxin and their genes. *Microbiology* 139, 1723-1728.

五藤秀男, 赤間亮子, 一色ゆかり, 小澤真名緒, 落合絢子, 川西路子, 木島まゆみ, 齋藤明人, 嶋崎洋子, 白川崇大, 須藤加澄, 松田真理, 松本幸子, 光田智裕, 永井英貴, 成嶋理恵, 原田咲, 古谷ゆかり, 山下麻依子, 2021. 次世代シーケンサーを用いた家畜衛生分野における細菌及びウイルスのゲノム解析技術に関する研究. *動物医薬品検査所年報* 58, 108-119.

He, T., Wang, R., Liu, D., Walsh, T.R., Zhang, R., Lv, Y., Ke, Y., Ji, Q., Wei, R. & Liu, Z., 2019. Emergence of plasmid-mediated high-level tigecycline resistance genes in animals and humans. *Nature microbiology* 4, 1450-1456.

Mahazu, S., Prah, I., Ota, Y., Hayashi, T., Suzuki, M., Yoshida, M., Hoshino, Y., Akeda, Y., Suzuki, T., Ishino, T., Ablordey, A.S. & Saito, R., 2024. Colistin Resistance Mediated by Mcr-3-related phosphoethanolamine transferase genes in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in

Avaga and Pakro communities in the eastern region of Ghana. *Infection and Drug Resistance* 17, 3011-3023.

Mahmoud, M.M., Abdelsalam, M., Kawato, S., Harakawa, S., Kawakami, H., Hirono, I. & Kondo, H., 2023. Comparative genome analyses of three serotypes of *Lactococcus* bacteria isolated from diseased cultured striped jack (*Pseudocaranx dentex*). *Journal of Fish Diseases* 46, 829-839.

Makita, K., Goto, M., Ozawa, M., Kawanishi, M., Koike, R., Asai, T. & Tamura, Y., 2016. Multivariable analysis of the association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from apparently healthy pigs in Japan. *Microbial Drug Resistance* 22, 28-39.

南隆之, 吉田照豊, 西木一生 2023. 日本の海産養殖魚で発生した新血清型 *Lactococcus garvieae* 感染症. *魚病研究* 58, 146-152.

Morioka, A., Asai, T., Nitta, H., Yamamoto, K., Ogikubo, Y., Takahashi, T. & Suzuki, S., 2008. Recent trends in antimicrobial susceptibility and the presence of the tetracycline resistance gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 1261-1264.

Ohno, Y., Yamazaki, K., Kasai, N., Ochiai, T., Ikeda, T., 2023. Association of live vaccine with swine erysipelas found in meat inspection. *Journal of Japan Veterinary Medical Association*. 76, e187-e192.

Shiraiwa, K., Ogawa, Y., Eguchi, M., Hikono, H., Kusumoto, M., Shimoji, Y., 2015. Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Journal of microbiological methods* 117, 11-13.