

10 県内初の *Actinobacillus pleuropneumoniae* 血清型 15 による豚の死亡事例

県央家畜保健衛生所

小嶋有美香、加藤貴誉湖、南亜矢子、戸崎香織、市川優、中村真弓

はじめに

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下 App) を原因菌とする豚胸膜肺炎は、甚急性型、急性型、亜急性型及び慢性型と多様な病態を呈する豚の呼吸器病である。甚急性及び急性型では、熱発、呼吸困難及びチアノーゼを呈して急死する。慢性型は急性型を耐過した豚に認められ、湿性の発咳及び食欲減退による発育不良を呈するため、養豚経営に多大な影響を与える¹⁾。原因菌である App は、莢膜を保有するグラム陰性の小桿菌で、莢膜の抗原性により 18 の血清型に分類されている²⁾。血清型によって病原性の強さが異なり³⁾、ワクチンの効果にも影響することから、血清型別は診断上重要である。国内の App 発生例における分離株は、血清型 2 が多く、次いで 1 型及び 5 型が多い³⁾。また、App は 4 種類の毒素 (Apx I ~ IV) を産生及び分泌し、このうち ApxIV は全ての血清型の App が保有する毒素であるが、Apx I ~ III の遺伝子保有パターンはおおむね血清型に対して特異的であるため、血清型の推定に用いることができるとされる⁴⁾。さらに、Apx I 分泌株は病原性が強いと言われており、Apx 毒素の遺伝子型判別は、毒性の程度の推定にも利用されている⁴⁾。

血清型 15 (App15) は、2002 (平成 14) 年にオーストラリアで提唱された血清型であり⁵⁾、日本では平成 19 年に初めて報告され⁶⁾、近年、国内での報告が増加している³⁾。

今回、管内養豚場において App15 による肥

育豚の死亡事例が発生したため、その概要を報告する。

農場概要

発生農場は、繁殖豚 220 頭、肥育豚 2,000 頭を飼養する一貫経営農場であり、豚舎数は 10 棟である (図 1)。

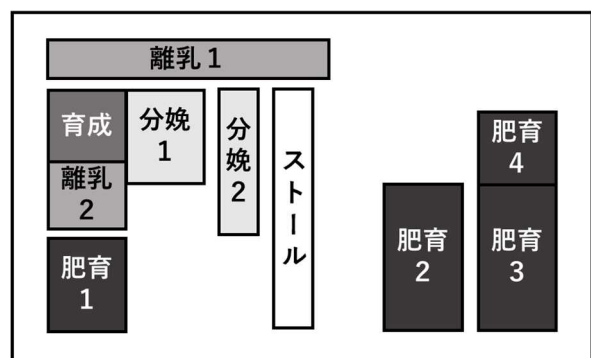


図 1 豚舎配置図

分娩舎で産まれた子豚は、25 日齢で離乳し、30 日齢で離乳舎へ移動する。その後 60 日齢で育成舎、90 日齢で肥育舎へ移動する (表 1)。繁殖候補豚は 1 か月に 5 頭 (夏のみ 10 頭) 導入しているが、隔離用豚舎は設けていない。

平成 30 年の当該農場の離乳後事故率は 4.8% であるが、接種ワクチンの種類及び薬剤の使用頻度が多く、衛生費が大きな負担となっていた (表 1, 2)。また、肥育豚 (LWD) の出荷日齢が 190 日齢とやや長く、改善の必要があった。

表1 肥育豚のピッグフロー及び使用薬剤

	分娩舎	離乳舎	育成舎	肥育舎
日齢(日)	0~30	30~60	60~90	90~190
ワクチン	App+SE (30) ※1 PRRS (25) PCV+マイコ (28)	App+SE (60)		
薬剤	リンコシ (注射) カナマイシン (鼻腔) アピシリン (注射)	※2 [ルブチン タイロシ	7007フェニコール (飲水、7007フェニコール (飲水、常時) ※2 [7007フェニコール アピシリン	
			※1 カッコ内は接種日齢 ※2 飼料添加、週ごと交互	

表2 母豚及び繁殖候補豚のワクチン

	母豚	繁殖候補豚
ワクチン (接種時期)	日本脳炎+バルボ+ゲタ (5月) 日本脳炎 (6月) PED+TGE (分娩前2回) PRRS (年4回) 豚丹毒 (年3回) 萎縮性鼻炎 (分娩1か月前) 大腸菌+カストリジム (分娩2日前)	PRRS (導入時) 萎縮性鼻炎 (導入時) 豚丹毒 (導入時) サーコ+マイコ (導入時) 日本脳炎+バルボ+ゲタ (導入時)

発生状況

平成29年以降、育成舎及び全ての肥育舎において呼吸器症状が慢性的に観察されていた。

令和元年6月4日に肥育舎1で110日齢の肥育豚1頭(豚A)及び同年7月10日に肥育舎3で120日齢の肥育豚1頭(豚B)が突然死したため、病性鑑定を実施した。

材料及び方法

1 病性鑑定

豚A、Bについて剖検を実施し、各臓器を、細菌学的検査、ウイルス学的検査及び病理組織学的検査に供した。

(1)細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺及び脳を用いて、定法に従い5%羊血液寒天培地(37℃、好気及び5%CO₂)、β-NAD加馬チョコレート寒天培地(37℃、5%CO₂)及びDHL寒天培地(37℃、好気)にて24時間培養し、発育したコロニ

ーについてCAMPテスト及び市販のキット(IDテスト・HN-20ラピッド、ニッスイ)で簡易同定を行った。さらに、Appを疑う菌株について種特異的PCRを行い、Appと判定されたものについては伊藤らの方法⁷⁾に従って血清型別PCRを行った。

(2)ウイルス学的検査

扁桃の凍結切片及び扁桃乳剤上清を接種したCPK細胞について、CSFを対象とした蛍光抗体法(FA)を行った。また、扁桃を用いてCSF(豚A、B)とPRRS(豚Aのみ)を対象とした遺伝子検査を行った。

(3)病理組織学的検査

主要臓器を20%中性緩衝ホルマリン液で固定後、定法に従いパラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、リタングステン酸ヘマトキシリン(PTAH)染色及びグラム染色、また抗原検出として、抗App15免疫家兎血清を用いた免疫染色を行った。

2 追加調査

(1)農場内浸潤状況調査

豚血清34頭分を用いて、App、PRRS及び*Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo)の抗体検出ELISA(IDEXX APP エリーザキット、PRRS X3 エリーザキット、IDEXX M. hyo エリーザキット、共にアイデックスラボラトリーズ)並びにプール血清(豚舎及び日齢/産次ごと)を用いてPRRSを対象としたPCRを行った(表3)。

表3 農場内浸潤状況調査実施頭数

用途	豚舎	日齢/産次	頭数
肥育	離乳1	46日	5
	育成	82日	5
	肥育1	118日	3
		137日	3
	肥育2	125日	3
		145日	3
	肥育3	118日	3
	肥育4	137日	3
繁殖	ストール	1~3産	3
		4~5産	3
計			34

(2) 出荷豚調査

と畜場出荷豚の肺48検体について、肉眼による肺病変の確認を行い、App様病変を認められたものについて細菌培養を行った。分離菌を用いて、簡易同定及び種特異的PCRを行い、Appと同定された菌株について、血清型別PCRを行った。

(3) 県内分離株(App)の後ろ向き調査

平成12~30年に県内で分離されたApp54株のうち、血清型が未判別であった14株(未判別株)について血清型別PCRを行い、血清型ごとに集計した。

(4) 県内分離App15性状検査

本調査で分離された全てのApp15について、毒素検出PCR及び一濃度ディスク法による薬剤感受性試験を行った。

結果

1 病性鑑定

(1) 剖検所見

豚A、Bともに、主な病変は肺にみられた。

豚Aの肺は重度に充出血し、退縮不全及び線維素の析出が認められ(図2)、胸膜と重度に癒着していた(図3)。豚Bの肺は水腫様を呈し、退縮不全及び線維素の析出が認められ(図4)、胸腔内には黄色透明な胸水が貯留していた(図5)。2頭とも、病変は右肺でより重度であり、前葉から後葉まで広範囲に及んでいた(図6)。

その他の臓器では、豚A、Bに共通して、肝臓の暗赤色化及び心外膜の線維素付着が認められた。

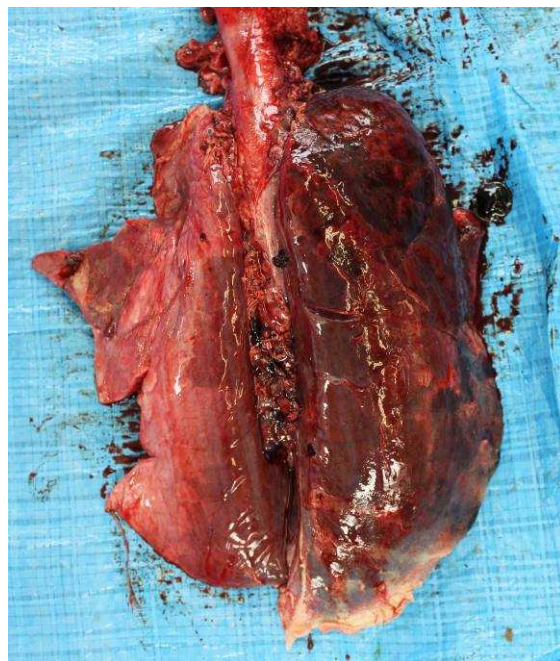


図2 豚A 肺

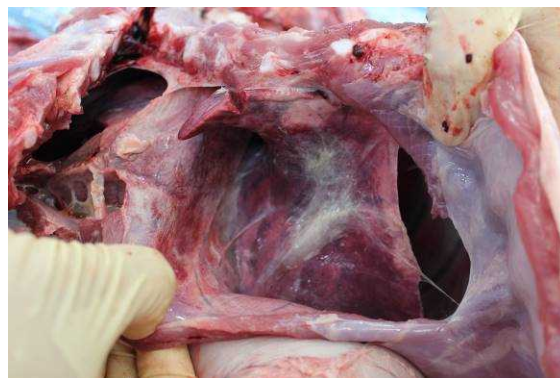


図3 豚A 胸腔

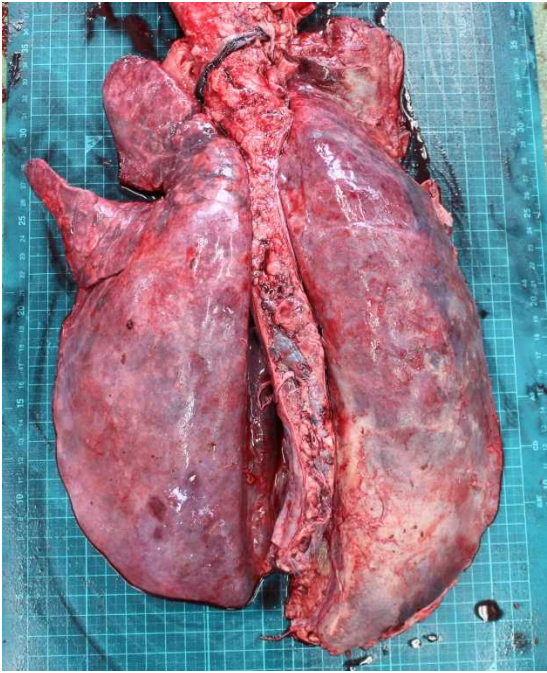


図4 豚B 肺

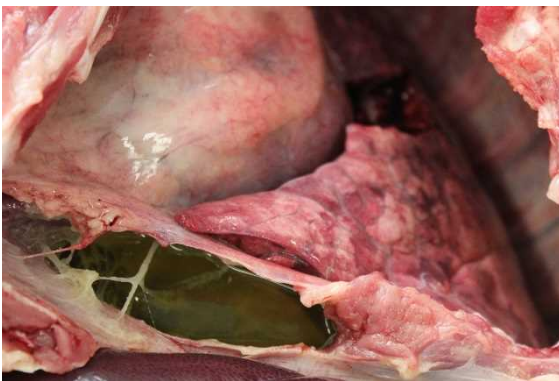


図5 豚B 胸腔



図6 豚B 右肺横断面

(2) 細菌学的検査

豚Aの肺並びに豚Bの肺及び脾臓からグ

ラム陰性小桿菌が分離され、衛星現象(図7)が認められた。



図7 衛星現象

分離菌は、市販キットにより App と判定され、種特異的 PCR で App に特異的な増幅が認められた。また、血清型別 PCR で App15 と判定された(図8)。

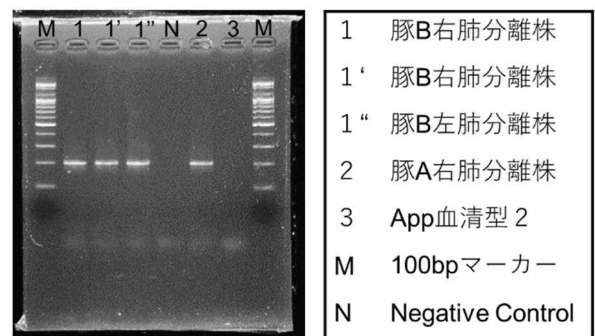


図8 血清型別 PCR 泳動像

(3) ウイルス学的検査

CSF の FA 及びウイルス分離、さらに、CSF 及び PRRS に対する PCR とともに陰性であった。

(4) 病理組織学的検査

豚Aでは右肺及び左肺前葉、豚Bでは全葉性に、線維索性壊死性化膿性胸膜肺炎が観察され(図9)、グラム陰性小桿菌塊を伴う肺胞の多発性壊死及び壊死領域周囲の燕麦状変性を伴う好中球浸潤が認められた(図10)。病変部について抗 App15 血清を用いた免疫染色を行ったところ、菌塊に一致して陽性反

応が認められた (図 11)。

さらに、豚 B では脾臓の赤脾髄領域及び下垂体静脈洞においてもグラム陰性小桿菌塊がみられた。そこで、脾臓について抗 App15 血清を用いた免疫染色を行ったところ、菌塊に一致して陽性反応が認められた (図 12)。

その他、豚 A、B に共通して線維素性化膿性心外膜炎が観察された。豚 A では各リンパ節におけるリンパ球の減数が認められ、免疫機能の低下が疑われた。豚 B では全身の血管内に好中球が多数観察され、リンパ性組織ではリンパ濾胞の腫大及び増数が認められた。

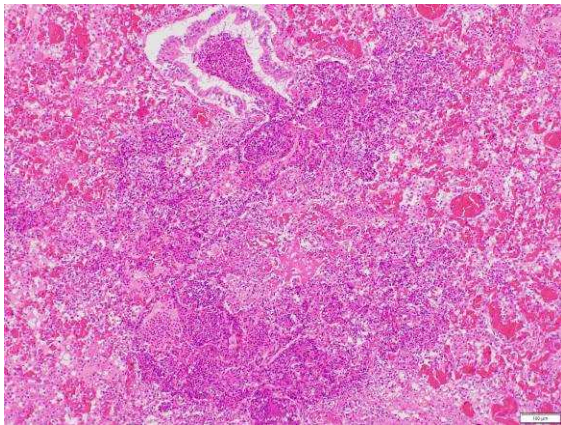


図 9 豚 A 右肺中葉 HE 染色 ×100

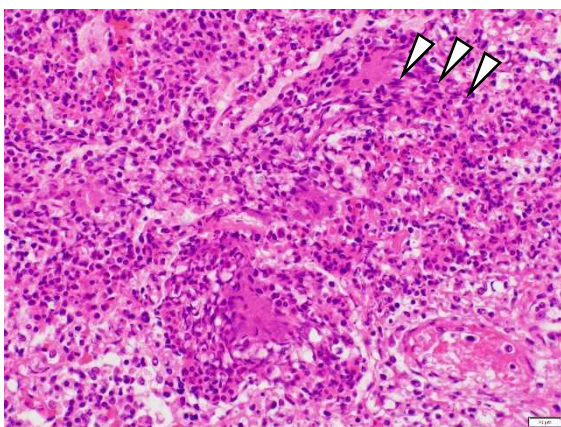


図 10 豚 A 右肺中葉 HE 染色 ×400

(矢頭は燕麦状変性を伴う好中球)

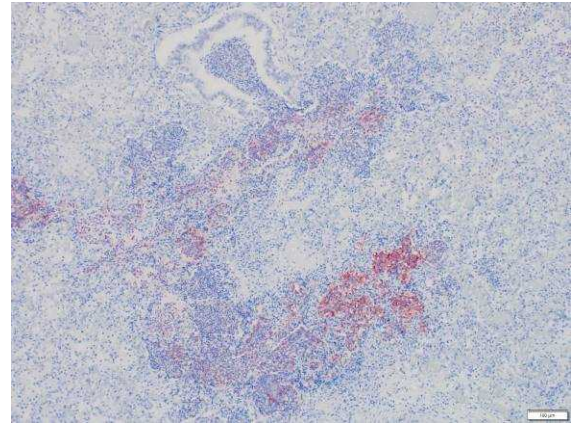


図 11 豚 A 右肺中葉 免疫染色 ×100

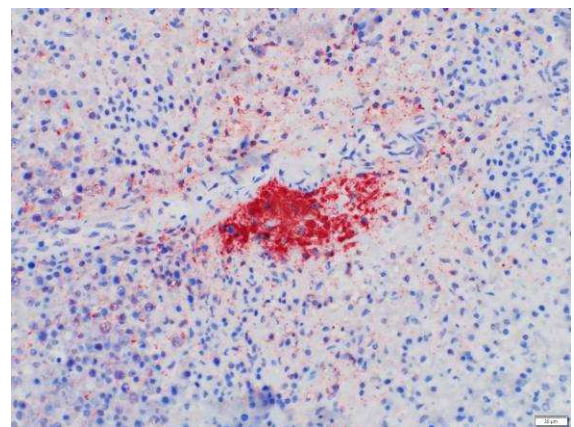


図 12 豚 B 脾臓 免疫染色 ×400

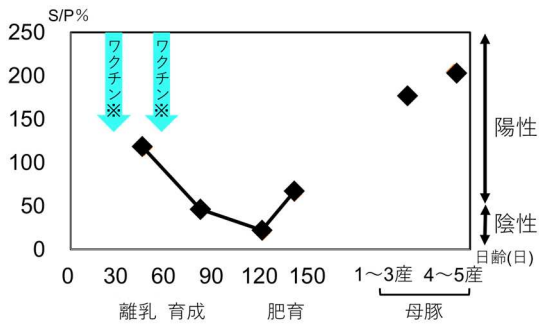
2 追加調査

(1) 農場内浸潤状況調査

血清を用いた ELISA 検査では、App が、離乳舎から肥育前期にかけて S/P% が低下しており、肥育後期で S/P% の上昇が認められた。(図 13)。

PRRS は、離乳舎から育成舎にかけて S/P 比の上昇が認められ (図 14)、離乳舎から肥育前期にかけて遺伝子が検出された (表 4)。

M. hyo は、育成舎以降に、抗体陽性率の上昇が認められた (図 15)。



※1, 2, 5 型に有効なワクチン

図 13 App-ELISA

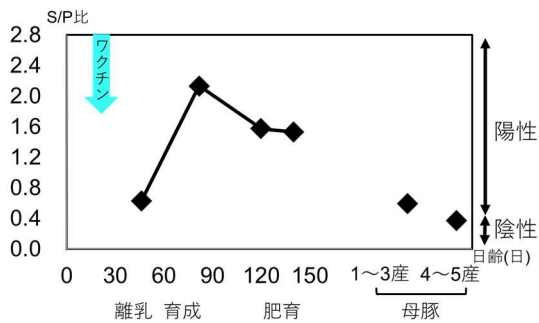


図 14 PRRS-ELISA

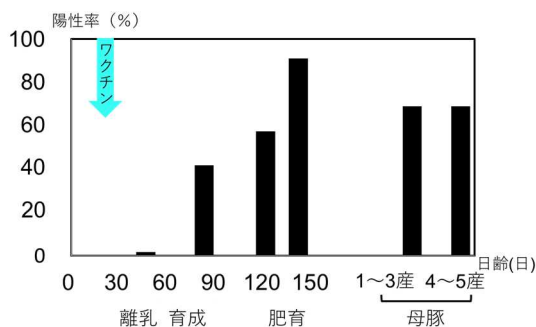


図 15 M. hyo-ELISA

表 4 PRRS-PCR

用途	豚舎	日齢/産次	結果
肥育	肥育	離乳 1	46 日 +
		育成	82 日 +
		肥育 1	118 日 -
		肥育 2	137 日 -
肥育	肥育	肥育 2	125 日 +
		肥育 3	145 日 -
		肥育 3	118 日 +
		肥育 4	137 日 -
繁殖	ストール	1~3 産	-
		4~5 産	-

(2) 出荷豚調査

と畜場出荷豚の肺 48 検体の肉眼病変は、胸膜炎が 14 検体 (29%) に認められ、そのほかマイコプラズマ様病変が 6 検体 (13%) に認められた (表 5)。

表 5 と畜場検査成績

肺病変	検体数	割合
胸膜炎	14	29%
マイコ	6	13%
その他	3	6%
所見なし	25	52%

※検査頭数：48 頭

このうち、App 様病変が認められた 10 検体を用いて細菌学的検査を行ったところ、2 検体から App15 が分離された。

(3) 県内分離株 (App) の後ろ向き調査

血清型別 PCR の結果、全ての未判別株はいずれかの血清型に型別され、平成 21 年には既に App15 が分離されていたことが判明した (表 6)。なお、平成 21 年及び 22 年の 27

分離株中 22 株は、と畜場出荷豚の肺病変から分離されたものであり、App15 はと畜場出荷豚の肺由来株であった。

まとめ及び考察

今回、同一農場で突然死した肥育豚 2 頭について病性鑑定を実施した。各種検査の結果、2 頭とも全葉性の線維素性壊死性化膿性胸膜肺炎がみられ、肺から App15 が分離されたことから、App15 による豚胸膜肺炎と診断した。さらに、豚 B では脾臓からも App15 が分離され、病理組織学的検査において、下垂体に同様の菌塊を認め、血管内の好中球浸潤及び各リンパ節の反応性変化が観察されたことから、App15 による菌血症を起こしていたと考えられた。なお、これまで App15 による菌血症の報告例はなく、本症例が初の報告である。

農場内浸潤状況調査では、肥育豚において App、PRRS 及び M. hyo 全てのまん延が示唆された。App 検査で使用しているキットは、野外株のみを検出できるキットであり、母豚の S/P%が高値であることから、抗体価の上昇は、離乳舎から肥育前期は移行抗体、肥育後期は野外感染によるものと考えられた。PRRS の S/P 比は離乳舎から育成舎にかけて上昇しており、PCR で離乳舎から肥育舎にかけて遺伝子が検出されていることから、野外感染によるものと考えられた。ただし、離乳舎で検出された遺伝子に関しては、ワクチン接種後 21 日目の採材であったため、ワクチン株の可能性も考えられた。M. hyo の抗体陽性率は、離乳舎では 0%だったが、育成舎で 40%に上昇していることから、育成舎で感染が起きていると考えられた。以上のことから、本農場では育成舎で PRRS 及び M. hyo、肥育舎で App の感染が起こっていたものと推測された。

出荷豚調査では 48 検体中 10 検体から App 様の病変の所見が観察されたが、既報では、と畜場出荷豚の肺における App による病変

表 6 県内分離株 (App) の血清型別集計

年度	血清型 1型	2型	5型	6型	7型	15型	計
H12	3	4					7
H13	1	1					2
H17	1	1					2
H20		4					4
H21	5	14	4	2		1	26
H22		1					1
H24		5			2		7
H25		1					1
H28		3					3
H30		1					1
計	10	35	4	2	2	1	54

(4) 県内分離 App15 の性状検査

本調査で分離された App15 全 6 株 (平成 21 年分離 1 株を含む) について、毒素検出 PCR を実施したところ、全ての分離株が Apx II、III 及び IV の毒素を保有し、薬剤感受性試験の結果は表 7 のとおりだった。

表 7 県内分離 App15 性状検査

毒素	Apx I	Apx II	Apx III	Apx IV						
県内分離 App15	-	+	+	+						
App15 (既報)	-	+	+	+						
薬剤感受性試験	アピシリン	ペニシリン	セフトラゾール	ストレプトマイシン	エリスロマイシン	リンコマイシン	特許抗生剤イリシ	ドキシサイクリン	エンロフロキサシン	7007c コール
豚A 肺	S	R	S	R	R	R	R	R	++	S
豚B 肺	S	R	I	R	I	R	R	R	+	S
豚B 脾	S	R	S	R	R	R	R	R	+	S
出荷豚 肺1	R	R	R	R	R	R	R	R	+	I
出荷豚 肺2	S	R	R	R	R	R	R	I	+	S
H21 と場肺	S	R	S	R	R	R	R	R	+	R
既報 App15	R	NT	S	R	S	NT	R	NT	S	S

S : 感受性、I : 中間、R : 耐性
 +++ : 高感受性、++ : 中感受性
 + : 低感受性、- : 耐性

保有率は 4～7%とされており¹⁾、本農場での豚胸膜肺炎のまん延が示唆された。また、190日齢の出荷豚2検体から App15 が分離されたことから、肥育後期では慢性型がまん延しており、出荷日齢の延長を引き起こしている一因であると思われる。

一方、県内分離株 (App) の後ろ向き調査では、平成 21 年にと畜場由来検体から App15 が分離されていたことが判明したが、今回まで県内における App15 による豚の死亡例は報告されていない。既報でも App15 は毒性があまり強くない血清型であるとされているが⁶⁾、今回、本農場で App15 による死亡が起こった要因として、育成舎での PRRS と M. hyo のまん延に加え、肥育舎で App が混合感染し、豚呼吸器複合病 (PRDC) を起こしたためと考えられた。加えて、本農場では App1、2、5 型に有効なワクチンを使用していたが、App15 に対しては効果が十分でなかったため、App15 がまん延したと考えられた。

また、本報告で分離された App が保有する毒素は既報のとおりであったが^{4,6)}、発生農場から分離された菌株の薬剤感受性について、豚 A、B ではアンピシリン及びセフトフルが感受性であったのに対し、出荷豚由来の株では耐性となっていた。さらに、既報では App はセフトフル、エリスロマイシン、フロルフェニコール及びエンロフロキサシンに感受性があるとの報告があるが⁸⁾、本農場ではいずれに対しても耐性あるいは感受性の低下が認められ、薬剤の使用に一層の注意を払う必要がある。

今後の対策として、まずは PRRS のまん延による豚群の免疫レベルの低下への対策のため、衛生管理の徹底、ワクチンプログラム及びピッグフローの見直し等の PRRS 対策を

行うことが有効であると考えられる。特に本農場では、育成舎における PRRS の感染が確認されているため、育成舎での衛生管理や飼養密度の適正化を行うことが重要である。また、App15 に対するワクチンは日本国内で認可されていないものの、毒素に対するワクチンは利用されていることから、畜主に対して使用するワクチンの変更を指導している。さらに、App15 の症例及び対策事例を収集し、App15 による病態究明を行い、当該疾病の減少及び健康な豚群の維持に繋げ、生産性の向上に努めていきたい。

最後に、御指導並びに御助言を賜りました、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 病態研究領域 病理ユニット 芝原友幸上級研究員に深謝します。

参考文献

- 1) 家の光協会
最新 ブタの病気 (2000)
- 2) Ito H
家畜衛生学雑誌
No. 45, p1-38 (2019)
- 3) Ito H
家畜衛生学雑誌
No. 42, p29-60 (2016)
- 4) Ito H
All About Swine
No. 36, p2-9 (2010)
- 5) P. J. Blackall
Veterinary Microbiology
No. 84, p47-52 (2002)

- 6) Tomohiro KOYAMA et al
J. Vet. Med. Sci.
No. 69 (9), p961-964 (2007)
- 7) Ito H
JARQ
No. 49 (3), p277-280 (2015)
- 8) Ayako MORIOKA et al
J. Vet. Med. Sci.
No. 70 (11), p1261-1264 (2008)