

## 第 2 部

# 県内で分離されたパスツレラ菌の性状検査

東部家畜保健衛生所

○牛山市忠・清水景子

## 1 概要

*Pasturella multocida*は、家畜や野生動物で敗血症や呼吸器疾病を起こす原因菌である。県内でも病性鑑定の牛、豚の肺や鼻汁より分離され、牛呼吸器症候群（BRDC）やパスツレラ肺炎などの原因菌として問題となっている。本菌は、毒素の有無や莢膜の型などによって病原性が異なり、薬剤耐性株も報告されてきている。県内の家畜（牛、豚）より分離された本菌について、莢膜型別や薬剤感受性試験、皮膚壊死毒素の有無などを調査したので報告する。

## 2 材料と方法

平成 16 年から平成 22 年にかけての病性鑑定依頼検体から *Pasturella multocida* と分離同定された菌株 25 株（豚 8 株、牛 17 株）を材料とし、以下の方法で調査を行った。

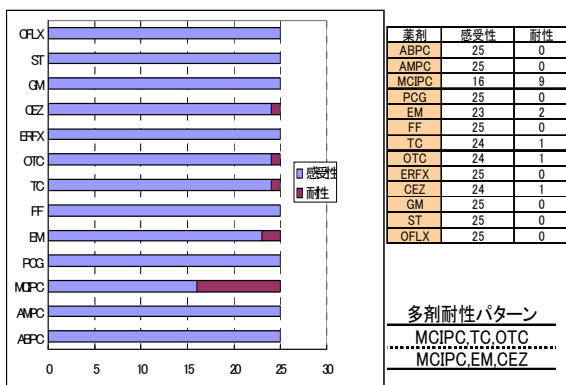
- ・ 薬剤感受性試験：一濃度ディスク法を用いて 13 薬剤（ABPC、AMPC、MCIPC、PCG、EM、FF、OTC、ERF、CEZ、GM、ST、TC、OFL）で実施した。
- ・ 莢膜型別：Kirsty M らが報告したマルチブレックス PCR 法により型別を行った。
- ・ 皮膚壊死毒素：PCR 法により *Tox-A* 遺伝子検出を行った。
- ・ RAPD 法による遺伝子型別：Jard D. Taylor らの報告参考に実施。

## 3 結果

### （1）薬剤感受性試験

薬剤感受性試験については、NCCLS の判定基準に準じて判定を行った。パスツレラ菌は一般的にペニシリン系やテトラサイクリン系、セフェム系に感受性を示すと言われているが、他の報告でもあるようにペニシリン系の MCIPC（クロキサシリン）で 25 株中 9 株が耐性を示した。また、多剤耐性パターンを示すものも認められた（図 1）。

図1 薬剤感受性結果



薬剤感受性結果 一覧

連番	Origin	Farm	Place	Month, Year	薬剤耐性				
					MCIPC	EM	TC	OTC	GEZ
1	肉牛	K	肺	H18.8	S	S	S	S	S
2	肉牛	K	肺	H18.8	R	S	S	S	S
3	肉牛	K	肺	H17.1	R	S	S	S	S
4	肉牛	K	鼻腔	H17.1	R	S	S	S	S
5	豚	H	肺	H17.5	R	S	S	S	S
6	豚	T	鼻汁	H18.1	R	S	S	S	S
7	肉牛	Y	肺	H18.2	S	S	S	S	S
8	豚	T	肺	H18.2	R	S	S	S	S
9	肉牛	K	肺	H18.3	S	S	S	S	S
10	乳牛	I	肺	H18.4	S	S	S	S	S
11	肉牛	Y	肺	H18.6	S	S	S	S	S
12	豚	S	肺	H18.10	S	R	S	S	S
13	豚	R	肺	H18.11	S	S	S	S	S
14	豚	T	肺	H19.8	S	S	S	S	S
15	豚	K	肺	H19.10	R	S	S	S	S
16	豚	K	鼻腔	H20.2	R	S	R	R	S
17	肉牛	T	鼻腔	H20.4	S	S	S	S	S
18	肉牛	T	鼻腔	H20.4	S	S	S	S	S
19	肉牛	K	肺	H20.4	S	S	S	S	S
20	肉牛	T	肺	H20.6	S	S	S	S	S
21	肉牛	T	肺	H20.7	S	S	S	S	S
22	肉牛	B	鼻腔	H22.1	R	R	S	R	R
23	肉牛	T	肺	H22.1	S	S	S	S	S
24	肉牛	Y	肺	H22.9	S	S	S	S	S
25	肉牛	Y	肺	H22.10	S	S	S	S	S

※抗生物質は、耐性Rが認められたもののみ表示。

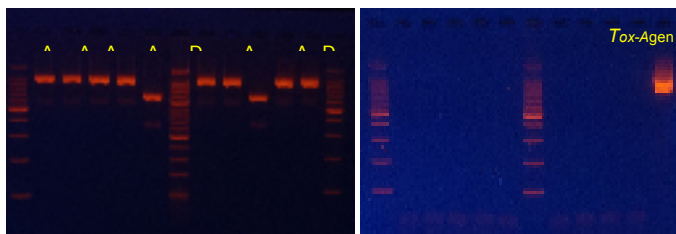
(2) 莢膜型別 PCR 検査

莢膜型別検査では、牛では17株すべてがA型、豚ではA型6株、D型2株であった(図2)。

(3) 皮膚壊死毒素

皮膚壊死毒素の遺伝子である *Tox-A* 遺伝子については、豚で莢膜型Dの2株が、遺伝子を保有していた(図2)。

図2 PCR: 莢膜型別、*Tox-A* gene



莢膜型別	A型		D型	
	牛	豚	牛	豚
	17	6	0	2

<i>Tox-A gene</i> 保有	A型		D型	
	牛	豚	牛	豚
	0/17	0/6	-	2/2

(4) RAPD 法による遺伝子型別

プライマー: M13 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3 mM13 5'-GAGGGTGGNGGNTCT-3`

M13はa~fの6パターン、mM13はa~gの7パターンに分類することができた。組み合わせとしては、全部で14パターンに分類できた。

同一農場で、同一時期に分離した株では、同じパターンが示される傾向が認められた(図3)。

<PCR 条件>95°C 3min→30 サイクル<95°C 30sec 44°C 58sec 72°C 70sec>→  
72°C 7min アニーリング温度は、M13で44°C、mM13で43°C

図3: 結果まとめ

連番	Origin	Farm	Place	Month、Year	Serovar	RAPD M13	RAPD mM13	tox-A	薬剤耐性	
1	肉牛	k	肺	H16.8	A	a	a	-		
2			肺	H16.8	A	a	a	-	MCIPC	
3			肺	H17.1	A	c	c	-	MCIPC	
4			鼻腔	H17.1	A	d	d	-	MCIPC	
9			肺	H18.3	A	e	h	-		
19			肺	H20.4	A	e	c	-		
7			Y	肺	H18.2	A	e	c	-	
11				肺	H18.6	A	c	b	-	
24				肺	H22.9	A	e	c	-	
25				脳	H22.10	A	g	c	-	
17			T	鼻腔	H20.4	A	e	c	-	
18				鼻腔	H20.4	A	e	c	-	
20				肺	H20.6	A	e	c	-	
21				肺	H20.7	A	g	d	-	
23				肺	H22.1	A	e	b	-	
22			B	鼻腔	H22.1	A	e	b	-	MCIPC、EM、CEZ
10			乳牛	I	肺	H18.4	A	b	e	-

連番	Origin	Farm	Place	Month、Year	Serovar	RAPD M13	RAPD mM13	tox-A	薬剤耐性
5	豚	H	肺	H17.5	A	b	b	-	MCIPC
6		T	鼻汁	H18.1	D	b	g	+	MCIPC
8			肺	H18.2	A	f	c	-	MCIPC
14			肺	H19.8	A	f	c	-	
12		S	肺	H18.10	A	b	f	-	EM
13		R	肺	H18.11	A	b	f	-	
15		K	肺	H19.10	A	f	c	-	MCIPC
16			鼻腔	H20.2	D	f	c	+	MCIPC

#### 4 まとめおよび対策

薬剤耐性は、MCIPCで36% (9/25)、EMで8% (2/25)、TC, OTC, CEZで4% (1/25)でした。多剤耐性パターンは、牛でMCIPC、EM、CEZ、豚ではMCIPC、TC、OTCが認められ、莢膜型別検査では、牛では17株すべてがA型、豚ではA型6株、D型2株でした。皮膚壊死毒素については、豚から分離されたD型2株が毒素遺伝子を保有しており、遺伝子型別(RAPD法)は、14パターンに分類されました。

パストツレラ菌が関与する牛呼吸器症候群(BRDC)やパストツレラ肺炎などの治療では、抗生物質がもっとも有効な手段ではありますが、今回の薬剤感受性試験では多剤耐性も認められました。このことより、薬剤感受性検査によるモニタリングの継続と、耐性株については臨床獣医師や農家へ情報提供を行っていきます。また、牛については、現在、莢膜A型のワクチンが市販されています、豚についても皮膚壊死毒素に対するワクチンがあり、牛、豚ともにワクチン接種により疾病を予防することは可能であると考えられます。

RAPD法を用いた遺伝子型別は、パルスフィールドなどよりも特異度は劣るが簡易、迅速に診断できます。今回の検査では、農場の同一発生時期では、RAPD法の泳動像でも同じパターンが示される傾向があり、疫学的関連のない農場間では別のパターンでした。これらの結果より、今後は、疫学的検査を行うのにRAPD法は活用していけるものと考えられます。

### 参考文献

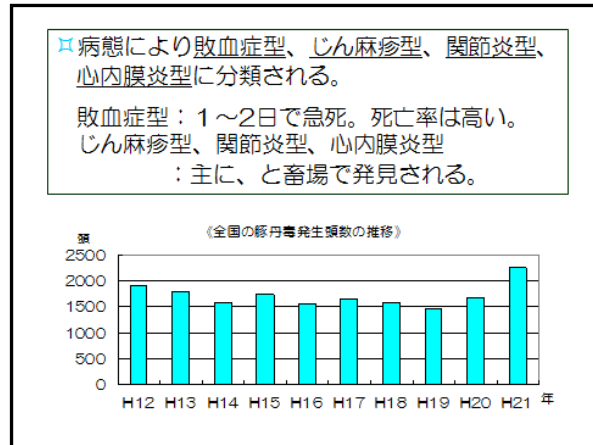
- Townsend K. M. et al. (2001). J. Clinic. Microbiol., 39, 924-929
- NAGAI SHINYA et al. (1994). J. Clinic. Microbiol., 32, 1004-1010
- Jard D. Taylor et al. (2010). J Vet Diagn Invest 22 ; 366-375

## 敗血症型豚丹毒の発生事例

東部家畜保健衛生所  
秋山倫子 清水景子ほか

### はじめに

豚丹毒とは、豚丹毒菌の感染によりおこる届出伝染病である。豚丹毒菌はグラム陽性短桿菌で、自然界に広く分布している。熱に弱く、50度15分、70度数分で簡単に死滅し、消毒剤で容易に殺菌されるが、自然環境下での抵抗性は非常に強い。病態により敗血症型、蕁麻疹型、関節炎型、心内膜炎型に分類される。敗血症型は死亡率高く、近年増加傾向にあり、群馬、長野、千葉などでも発生している。ワクチン未接種農場では、1日に2～30頭死亡するケースもある。その他の型（蕁麻疹型、関節炎型、心内膜炎型）は、と畜場で発見されることが多い。全国の発生頭数も増加傾向で、本県でも昨年届け出件数の既に5倍近くとなっている（表1）。本年、県内で敗血症型豚丹毒と診断した事例について報告する。



(表1)

### 発生概要

2010年5月、繁殖豚50頭、肥育育成豚600頭を飼養する農場において、品種、日齢、豚舎、用途が異なる3頭の豚が全身チアノーゼを呈して相次いで突然死した。3頭の死亡日、性別、日齢等は表2のとおり。これら3頭はいずれも35日・56日令で豚丹毒不活化ワクチンを接種していた。

《発生概要》

2010年5月、品種、日齢、豚舎、用途が異なる3頭の豚が全身チアノーゼを呈して相次いで突然死した。

番号	死亡日	品種・性別	日齢	用途
No.1	5/11	W ♂	364日齢	繁殖候補
No.2	5/15	LW ♀	191日齢	肥育
No.3	5/17	LW ♀	531日齢	繁殖

飼養形態・規模：繁殖豚50頭、肥育・育成豚600頭  
一貫経営農場

ワクチン接種：  
28日・56日齢⇒日生研APM不活化ワクチン  
35日・56日齢⇒日生研ARB・豚丹毒混合不活化ワクチン

(表2)

### 解剖所見

剖検では3頭ともほぼ同様の所見を示した。全身のチアノーゼが顕著で、特に耳や四肢末端、腹部で重度であった。胸腔内臓器では心嚢水の貯留がみられた。腹腔内臓器では、脾臓が著しく腫大・脆弱化し、肝臓も腫大し硬化が認められた。また、腎臓では点状出血がみられ、膀胱粘膜は肥厚し、膀胱内には膿汁様の尿が貯留していた。その他、全身のリンパ節腫大がみられた（表3）。

## 病原検索

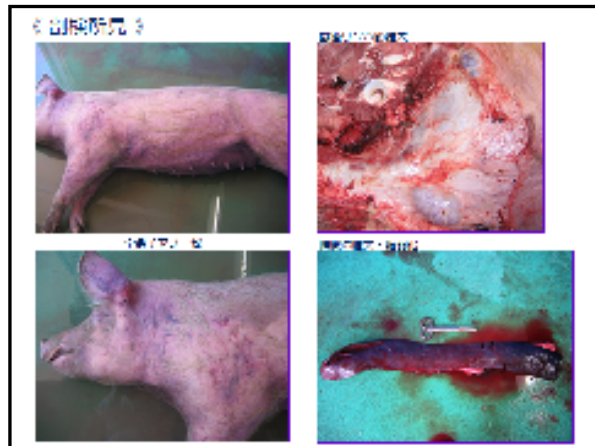
細菌学的検査において、主要臓器及び脳、浅頸リンパ節、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節、尿より、*Erysipelothrix rhusiopathiae*(血清型 1a 型) が分離された。

ウイルス学的検査において、脾臓、鼠径リンパ節から PCV2 の特異遺伝子が検出された。その他、PRRS の特異遺伝子は検出されず、豚コレラは FA で陰性を確認した。

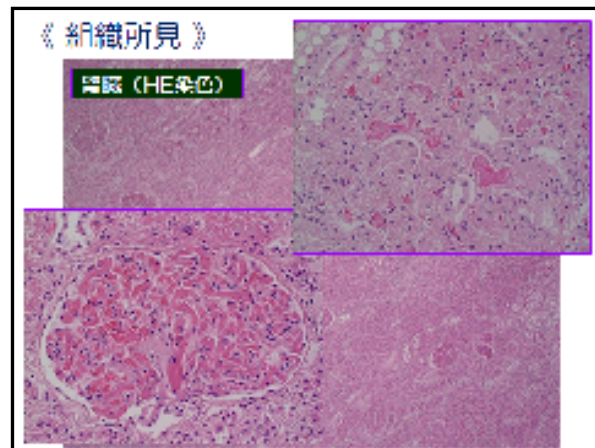
病理学的検査において、腎臓では病変は皮質に首座していた。糸球体毛細血管や間質の毛細血管内における硝子血栓形成や、尿細管上皮の変性・壊死、間質における軽度の細胞浸潤が認められた(表 4)。糸球体毛細血管や間質の毛細血管内でみられた血栓は好酸性均質で、PTAH 染色で濃い青色に染まっており線維素であることがわかる(表 5)。

その他、脾臓では赤血球が充満し、固有構造は大部分消失し僅かに残るのみ

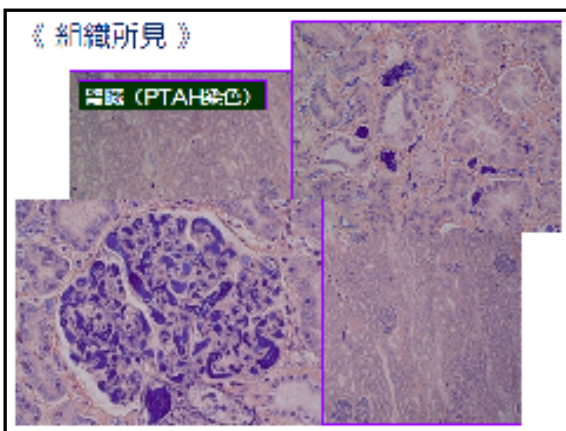
で、肝臓では結合組織の増生及び偽小葉の形成が、肺では軽度なうっ血及び水腫、硝子血栓の形成が認められた(表 6)。また、脳の血管壁に硝子様変性が認められた。主要臓器及び脳において、抗豚丹毒菌家兔血清を用いた免疫組織化学的染色で、全臓器で重度に陽性反応を示した(表 7)。



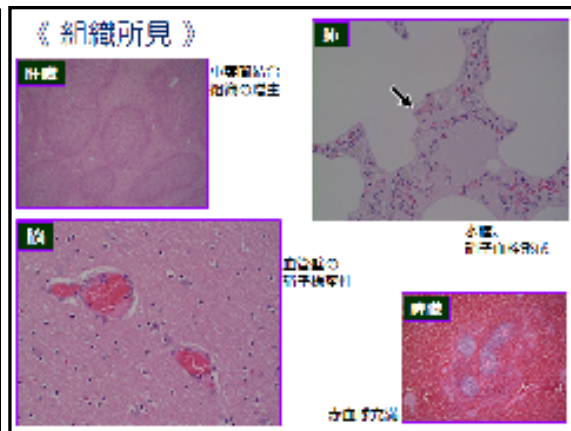
(表 3)



(表 4)



(表 5)



(表 6)

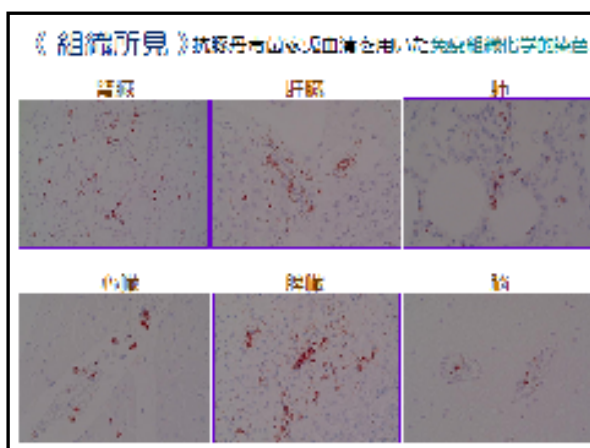
## まとめ

以上より、敗血症型豚丹毒と診断した。

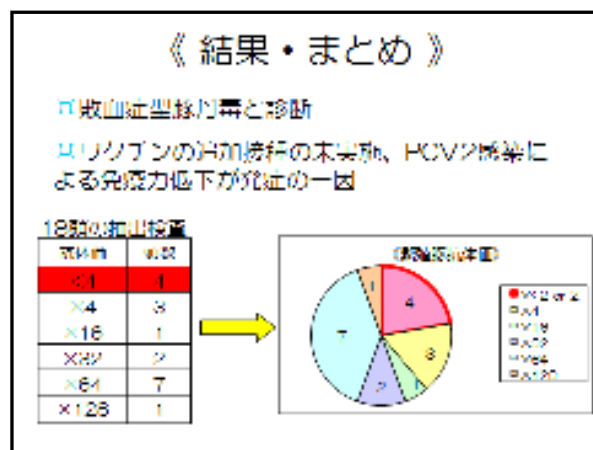
これら3頭の豚は35日・56日令で豚丹毒不活化ワクチン接種をしていたが、追加接種は実施していなかった。そこで、当該農場の繁殖豚18頭を抽出し、豚丹毒の抗体検査を実施したところ、128倍：1頭、64倍：7頭、32倍：2頭、16倍：1頭、4倍：3頭、4倍未満：4頭という結果であった。感染防御可能な抗体価は4倍以上とされているが、18頭中4頭が4倍未満だった(表8)。その他、PCV2感染による免疫力低下も発症要因の1つであった可能性も示唆された。

これらを踏まえ、ワクチンプログラムの再検討や、接種の徹底、飼養衛生管理の徹底などについて指導したところ、現在までに継続発生は認められていない。

現在、全国的に、豚丹毒ワクチンの接種率低下が危惧されている。平成12年以前は、豚コレラとの混合ワクチンにより高い接種率を維持していたが、平成12年に豚コレラワクチンの接種が中止になってからは、豚丹毒ワクチンの接種率は低下している。県内においても接種している農家数は31戸中9戸(平成22年12月現在)と30%弱の接種率である。今後、全国の豚丹毒発生状況や、ワクチン接種の重要性などを生産者へ情報提供し、ワクチン接種を指導していく必要があると考える。



(表7)



(表8)



## 12. 肉用鶏に見られた鶏封入体肝炎

東部家畜保健衛生所  
内田幸・清水景子

### はじめに

鶏の封入体肝炎（IBH）はグループ I トリアデノウイルスである鶏アデノウイルス（FA dV）の感染により、主に3～7週齢のブロイラーに発生する急性感染症である。主に肝臓を主病変とし、肝臓の腫大・黄色化、点状出血、核内封入体を特徴とする。FA dV は少なくとも12の血清型に分類され、その病原性は多様である。また、IBHの伝播は水平または垂直感染で、鶏貧血ウイルス（CAV）や伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV）のようなウイルスによる免疫抑制、あるいは様々な病原体との混合感染がアデノウイルスの病原を強めるという報告もある。

### 概要

平成22年3月、同一の孵化場から導入している2戸の肉用鶏農場（A農場：100,000羽飼養、B農場50,000羽飼養）において、導入1週間後にワクチン接種した鶏群1ロットで死亡羽数が増加し、抗生剤投与したが効果が認められなかったため病性鑑定を実施した。



### 材料と方法

A農場では肉用鶏（チャンキーUS、13日齢）の生体5羽、死体4羽について、B農場では肉用鶏（チャンキーUS、13日齢）の生体2羽、死体3羽について、常法に従い剖検を実施した。細菌検査および病理検査においては主要臓器について常法に従い実施した。ウイルス検査は、気管・クロアカスワブ乳剤、気管、肺、腎臓、肝臓について各臓器の10%プール乳剤を用いて、発育鶏卵によるウイルス分離検査を実施した。さらに、肝臓の乳剤、培養上清についてFA dVのPCR検査を実施した。

**材料及び方法**

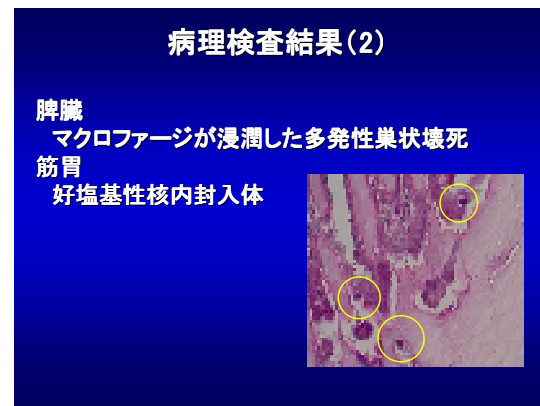
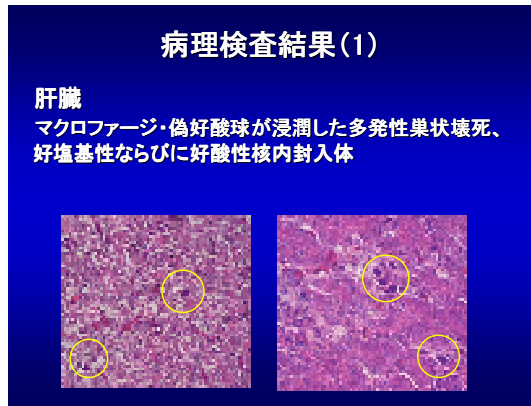
**材料**  
A農場：チャンキーUS、13日齢、生体5羽、死体4羽  
B農場：チャンキーUS、13日齢、生体2羽、死体3羽

**方法**  
剖検：常法に従い実施  
細菌検査・病理検査：主要臓器について常法に従い実施  
ウイルス検査：気管・クロアカスワブ、気管、肺、腎臓、肝臓について、発育鶏卵を用いたウイルス分離を実施。肝臓の乳剤、培養上清について鶏アデノウイルス（FAV）のPCR検査を実施。

### 結果

剖検所見では両農場に共通して肝臓、腎臓の褪色が観察された。細菌学的検査ではA農場において9羽中7羽の肝臓、腎臓、脾臓、心臓で大腸菌が分離された。

病理学的検査では両農場に共通して肝臓および脾臓にび漫性の多発性巣状壊死、肝臓、脾臓、筋胃に好塩基性ならびに好酸性核内封入体が散見された。  
さらに A 農場において肝臓、心臓、脾臓に繊維素、偽好酸球、マクロファージの浸潤、毛細血管内に菌塞栓が認められた。

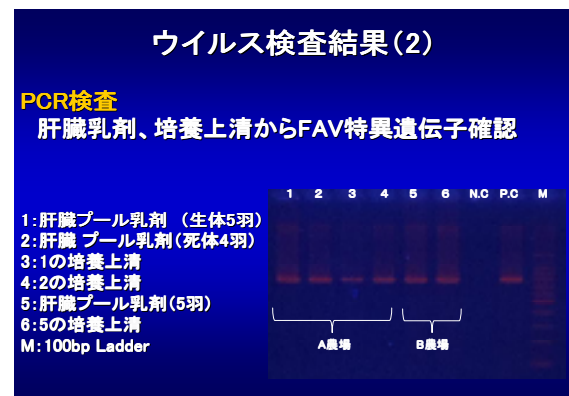


ウイルス学的検査では両農場とも発育鶏卵接種試験では胚の異常は認められず、ニューカッスル病及び鶏インフルエンザ、鶏伝染性気管支炎については分離陰性であった。

PCR 検査では肝臓の乳剤および発育鶏卵培養上清から鶏アデノウイルスの特異遺伝子が検出された。

さらに、動物衛生研究所における病性鑑定の結果、血清型 2 型のアデノウイルスが分離された。

病性鑑定の結果、A 農場については大腸菌感染による鶏大腸菌症および血清型 2 型の鶏アデノウイルス感染による鶏封入体肝炎と診断し、B 農場については血清型 2 型の鶏アデノウイルス単独感染による鶏封入体肝炎と診断した。



**FAV血清型別検査結果**

(独) 動物衛生研究所検査実施  
CK細胞によるウイルス分離  
中和試験  
PCR検査

↓

**鶏アデノウイルス血清型2型**

## まとめ

国内で過去に発生した本疾病は血清型 8 型によるものが多く、5 週齢前後の肉用鶏でみられ、伝染性ファブリキウス囊病ウイルスや鶏貧血ウイルス等との混合感染により病態悪化が認められていた。

**従来の鶏封入体肝炎**

- 国内で過去に発生した本病では血清型8型が多く分離されている
- 5週齢前後の肉用鶏で発症
- 伝染性ファブリキウス囊病ウイルス(IBDV)や鶏貧血ウイルス(CAV)等との混合感染により病態悪化

しかしながら、近年、国内では血清型2型の鶏アデノウイルスの単独感染による、10日齢前後の雛への発症事例が散見されており、本症例においても同様に2農場共に血清型2型の本ウイルスの感染による発生であった。

本ウイルスは呼吸器、消化器などに常在するウイルスであり、また、乾燥、アルカリ・酸および各種薬剤に対して強い抵抗性を示す。そのため、飼育環境から完全に清浄化する事は難しく、また、病態の発生には他疾病の感染や栄養状態、ストレス等、免疫抑制因子も関与してくる。このため、予防には他疾病との混合感染の防止、飼育環境の整備が重要となるため更なる衛生管理の徹底を指導した。

### 近年の鶏封入体肝炎

- ・全国的に発生している本病では血清型2型が多く分離されている
- ・10日齢前後の肉用鶏で発症
- ・IBDVやCAV感染を示唆する病変がない

本症例においても、全国的に発生している血清型2型による鶏封入体肝炎

### 対策

FAVを完全に清浄化することは困難  
病態の発現にIBDVやCAVの感染、栄養状態、  
ストレス等、免疫抑制因子も関与する



他疾病の感染防止やストレス因子の軽減など、  
飼育環境が重要であるため、さらなる衛生管理  
の徹底が必要