

第 2 部

肥育牛における地方病性牛白血病発症事例

東部家畜保健衛生所 ○水谷直子 鷹野由紀 他

【はじめに】

地方病性牛白血病（EBL）は牛白血病ウイルス（BLV）が原因のBリンパ球性白血病で、発生は全国的に増加している。県内での発生報告の大部分はと畜場によるものであったが、今回、発症牛の病性鑑定を実施したのでその概要を報告する。

【発生の概要】

平成30年11月、交雑種を飼育する肥育農家において牛白血病を疑う2症例の病性鑑定依頼があった。2症例共に血液学的検査及びウイルス学的検査の結果、EBL発症が強く疑われたため、鑑定殺を実施した。

【症例1】：肥育農家（交雑種約150頭）において21カ月齢の肥育牛1頭で、10月中旬から食欲不振、消瘦、貧血を呈し加療に反応せず、体表腫瘤や直腸検査で腹腔内硬固物を確認した。

【症例2】：肥育農家（交雑種約200頭）において23カ月齢の肥育牛1頭で、11月上旬に体表リンパ節の腫脹、眼球突出（図2）、体重減少を確認した。



図1 外貌（症例1） 矢印：体表腫瘤



図2：眼球突出

【材料と方法】

症例1及び症例2のEDTA・ヘパリン加血液、血清及び鑑定殺を実施した生体の主要臓器等を材料とし、血液・生化学的検査、ウイルス学的検査、病理学的検査を実施した。ウイルス学的検査では、白血球及び主要臓器を用いてDNeasy Blood&Tissue Kit（QIAGEN）を用いてDNA抽出後、nestedPCR（Fechnerら、1997）とその産物を用いてRFLP法による遺伝子型別（Licursiら、2003）とtax遺伝子型別PCR（L233/P233）（inoueら、2013）を実施した。また、血液及び主要臓器等についてはリアルタイムPCR法（理研 CoCoMo-BLV）により遺伝子量を測定した。

【結果】

①血液検査：2 症例共に白血球数の増加(12,000 個/m1 以上)を認め、末梢血中異型リンパ球の割合は、症例 1 では 35.8%、症例 2 では 28.9%であり、基準となる 5%を超えていた。

②剖検所見：

[症例 1] 浅頸・腸間膜リンパ節等の腫大、横隔膜の腫瘍化、脾臓の腫大(50cm 程度)、軽度眼球突出、心臓内(右心耳)腫瘍、膀胱の肥厚を認めた。(図 3)

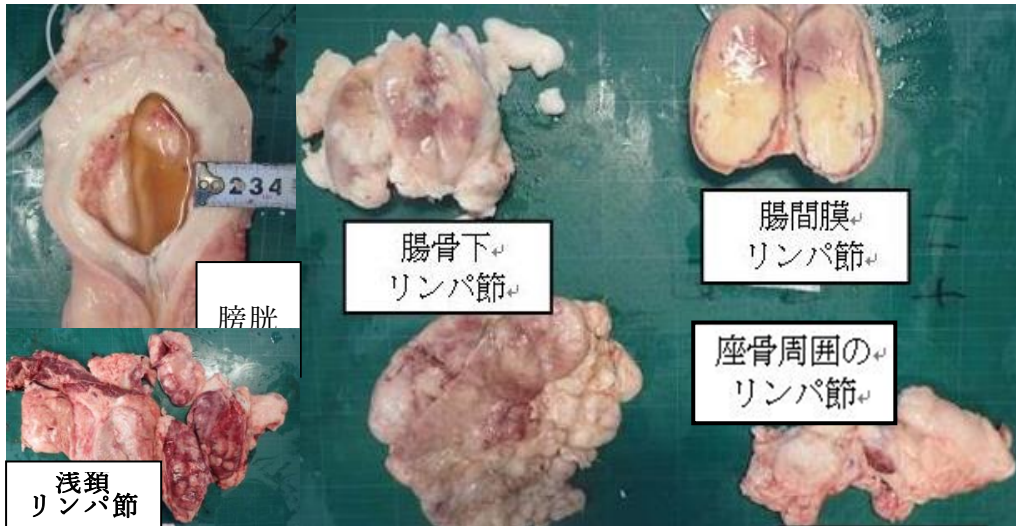


図 3：剖検所見（症例 1）

[症例 2] 肩部や精巣付近等の全身の体表リンパ節の腫大、大網や腹腔内に多数の腫瘍、右眼球突出を認めた。

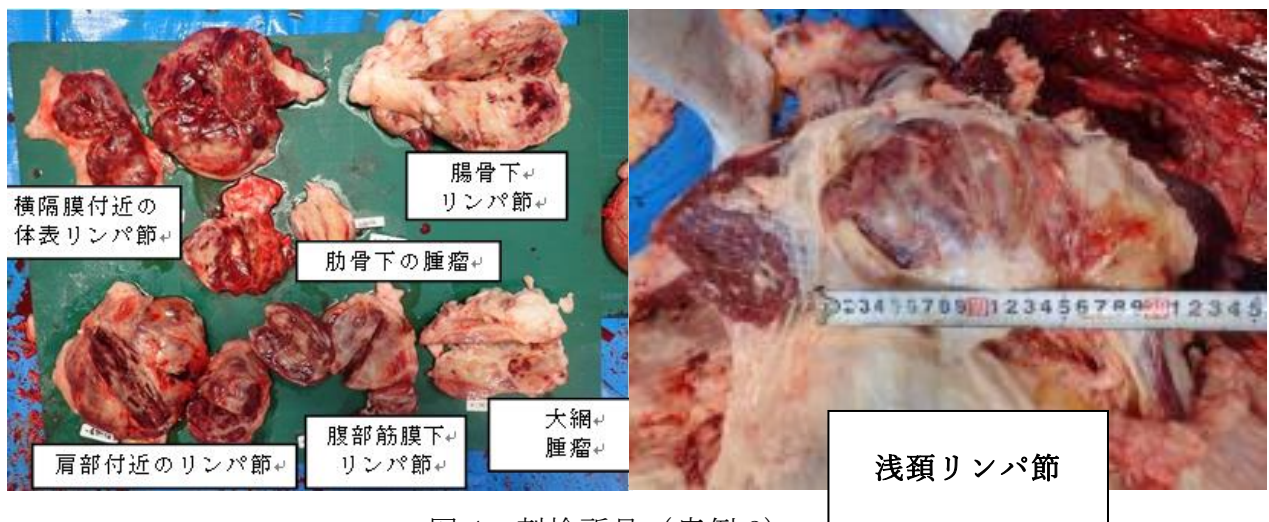


図 4：剖検所見（症例 2）

③ウイルス学的検査：2 症例共に、nestedPCR で BLV 遺伝子が確認され、遺伝子型別検査では I 型、L233 型に分類された。遺伝子量 (copies/10 万細胞) は、血液では(症例 1) 175, 622、(症例 2) 395, 646 であり、各臓器では 2 症例とも腫大化したリンパ節や腫瘍において高値を示した(図 5)。また、症例 1 では鼻腔スワブから遺伝子を検出した。

検体	プロウイルス量(copies/10 ⁵ cells)	
	【症例 1】	【症例 2】
血液	175,622	395,646
脳	6,686	2,786
肺	72,792	68,578
肝臓	9,021	21,734
心臓	58,941	10,952
脾臓	18,663	181,010
腎臓	4,708	22,274
浅頸リンパ節	13,010	551,311
腸間膜リンパ節	52.116	NT
膀胱	485.174	NT
腹腔内腫瘍	NT	472,553
鼻腔スワブ	0.0051	NT

図 5：各種臓器のプロウイルス量

④病理学的検査：腫大したリンパ節は大型の核の明るいリンパ球様腫瘍細胞が増殖し、固有構造がほとんど失われていた(図 6)。また、症例 1 では 2 と比較して壊死が目立つところがあったが、症例 2 の腸間膜リンパ節では正常構造が残っており、ろ胞の活性化の像がみられ、増殖した腫瘍細胞への反応性変化が疑われた。各種臓器で認められた白色腫瘍でも同様な腫瘍細胞が増殖し、これらの腫瘍細胞は CD5、CD20 (B 細胞マーカー) 陽性であった(図 7)。

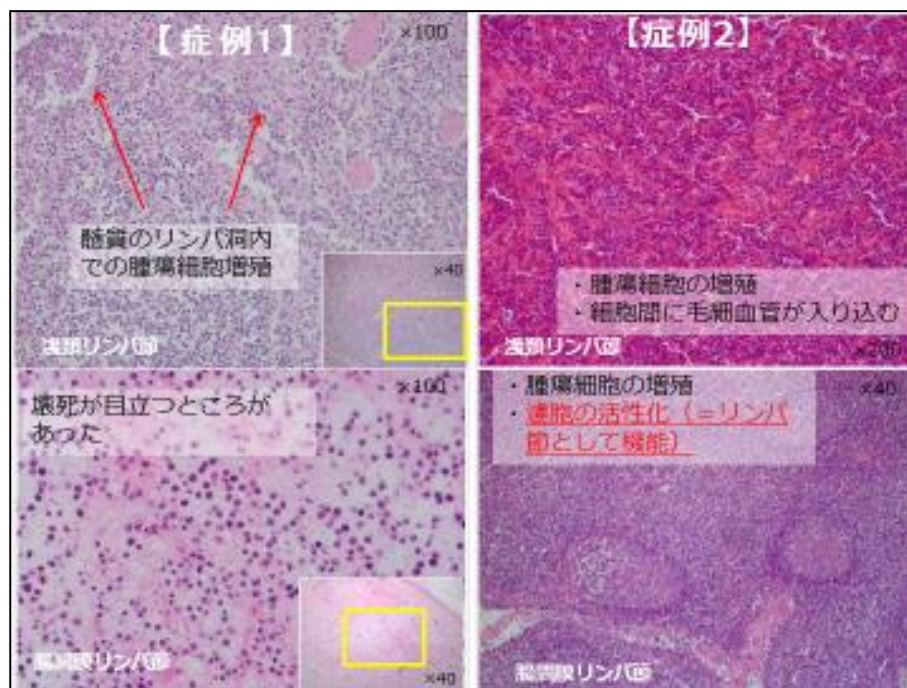


図 6：病理所見

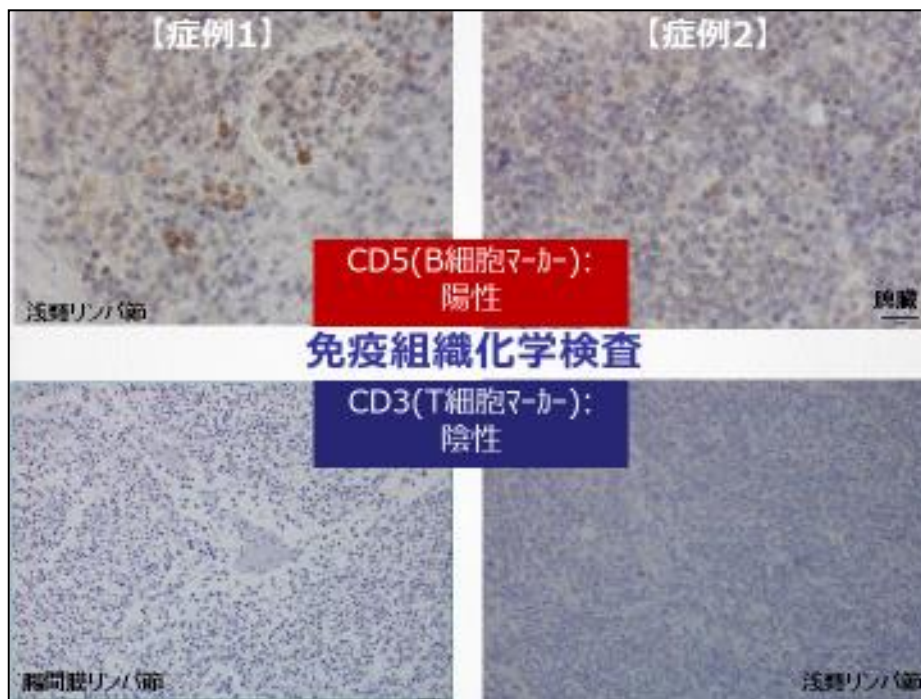


図7：免疫染色

【考 察】

今回、血液検査で異型リンパ球の増加がみられ、遺伝子検査で各種臓器、リンパ節、腫瘍から BLV 遺伝子を確認し、病理検査で、リンパ球様腫瘍細胞の増殖を確認したことから、EBL と診断した。2 症例共に、2 才未満であったが、免疫染色の結果により裏付けられた。なお、症例 1 では壊死が目立つ病理所見であるなど症例 2 と異なる特徴があったが、これらの所見の差と各臓器のプロウイルス量との違いに相関があるかどうかは、症例を重ねて検討する必要がある。

血液中プロウイルス量測定結果から、細胞あたりのプロウイルス量は症例 2 の方が多かったが、白血球数から算出する血中プロウイルス量では、症例 1 が高値を示した。BLV 感染は媒介昆虫などを介することから、伝播リスクを評価する際には血中プロウイルス量での評価が有用であることが示唆された (図 8)。また、症例 2 では細胞あたりのプロウイルス量が多いことから、血液を多く含む脾臓や血様の腫瘍で高いプロウイルス量を示したと考えられた。

	【症例1】	【症例2】
細胞あたりの プロウイルス量	175,622	395,646
$\text{血中プロウイルスコピー数} = \text{細胞あたりのプロウイルス量} \times \text{白血球数} \div 10^5$		
白血球数(/ μl) (鑑定殺時)	59,650	21,000
血中プロウイルス量 (/ μl)	104,759	83,086
伝播リスク	➔	

図8：プロウイルス量と伝播リスク

BLV の清浄化対策として、感染牛が多い農家では一度に更新することは経済的に難しいことから、現在、遺伝子量を測定し、伝播リスクを評価してリスクが高い個体から優先的に淘汰していく方法が取られている。今回、発症牛について血中プロウイルス量を県内で初めて測定したが、今後も更新優先順位付けの判断材料等としてデータを蓄積していきたい。

Actinobacillus pleuropneumoniae 血清型 15 による豚胸膜肺炎の解析

東部家畜保健衛生所 ○牛山市忠 鷹野由紀 他

【はじめに】

豚胸膜肺炎の原因菌である *Actinobacillus pleuropneumoniae* (以下 App) は、現在 15 の血清型が知られている。日本では血清型 2 が最も多く、次いで 5 及び 1 と続く。しかしながら、近年では App 血清型 15 (以下 App15) の国内報告が増えており、本県でも平成 27 年に A 農場において App15 を分離している。(図 1)

App は、重要な病原因子かつ感染防御抗原である 4 種の Apx 毒素 (Apx I, II, III, IV) を産生し、菌体外に分泌する。ApxIV はすべての血清型が分泌する種特異的な毒素である。一方、Apx I, II, III 及びそれらの遺伝子保有パターンは各血清型で異なり、血清型特異的であると言われており、App15 は、Apx II, III, IV を保有することが一般的である (図 2)。また、薬剤感受性試験において、App15 は、OTC に耐性を示しやすいことも報告されている (図 2)。しかし、App15 は近年分離報告が増えているにもかかわらず、国内では効果的なワクチンの開発がされていない。

このような中、平成 29 年 5 月、8 月に A 農場で App15 による豚胸膜肺炎による肥育豚の死亡が多発。当所にて病性鑑定を実施し、App15 菌株の解析を行うとともに、農場汚染状況調査と疾病低減対策を実施したので、その概要を報告する。

【発生農場の概要】

母豚 250 頭規模の一貫農場であり、従業員 5 名、ワクチンは日本脳炎、豚丹毒、パルボウイルス病、豚繁殖・呼吸症候群 (PRRS)、豚サーコウイルス、App、マイコプラズマを接種。豚の移動については分娩舎から 28 日齢で離乳豚舎に移動、その後 84 日齢から肥育豚舎に

《 Actinobacillus pleuropneumoniae (App) 》

- ◇ 15 の血清型が知られている。
 - ◇ 日本では血清型 2 の分離が最も多い。次いで、1、5。その他、3、6、7、8、9、11、12 が散発的。近年、血清型 15 が増えてきている。
 - 2002~2014 年 動物医薬品検査所調査で 3.9% が App15。
 - 血清型 15**
 - ▶ もっとも新しい血清型として H14 年にオーストラリアのグループが提唱。
 - ▶ 日本では、H19 年に初めて分離報告。その後の調査で H17 年には国内で流行していたことが判明。
 - ▶ 千葉、愛媛、福岡、北海道、香川で分離報告ある。
 - ▶ 効果的なワクチンが開発されていない。
 - ▶ 菌体外毒素 Apx II、III、IV を保持。
 - ▶ **ほとんどの株が OTC に耐性を示す。**
- (参考) 伊藤等 Proc. Jpn. Vet. Soc. 61:14-21, 2016 KANMURA 5, H22 富川県獣医師会

図 1 App について①

参考

- ▶ App の主な血清型及び菌体外毒素パターン (apxCA プロファイル)
- ※ App の菌系は染色体上に存在。【I】 種特異性および菌血症 II 強い種特異性のみ
【F】 弱菌性 (in vitro)

血清型	Apx I	Apx II	Apx III	Apx IV
App1	+	+	-	+
App2	-	+	+	+
App3	-	+	+	+
App5	+	+	-	+
App6	-	+	+	+
App15	-	+	+	+

Ito H (2010) ALL about swine 362-9 猪研

薬剤感受性

- ▶ 2016 KANMURA 5 の報告では App15 が OTC に対しては 4 株中 4 株で耐性、その他福岡や香川などの報告でも OTC 耐性とされている。
- 福岡：61 株中 21 株 (34%) OTC 耐性 (2015・豊川)
- 香川：2 株中 2 株 (100%) OTC 耐性 (2010・香西)

図 2 App について②

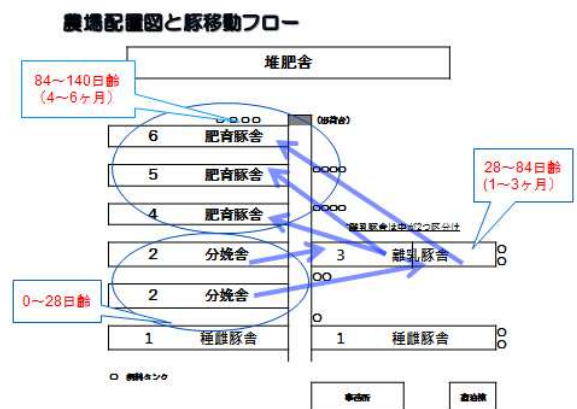


図 3 農場配置図と豚移動フロー

移動し 140 日齢で出荷という流れとなっている。(図 3)

【材料と方法】

菌株解析材料は App15 菌株 11 株 (H29 : 4 株、H27 : 7 株)、対象として過去分離した App2 を 1 株、Apx I, II, III の毒素保有状況調査 (apxCA プロファイル) については Gram, T らの方法で PCR 検査を実施した。

薬剤感受性試験は一濃度ディスク法 (ABPC, PCG, OTC, GM, KM, SXT, FF, ERFX) および微量液体希釈法 (NA, CPF, SM, EM, TC, ABPC, GM, CP)、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) は制限酵素 Apa I、Sma I を用いて実施。さらに、農場の汚染状況把握のため、繁殖母豚および 1~6 ヶ月齢 (各 5 頭) を採血し市販の ELISA キット (IDEXX APP エリーザキット) を用いて野外抗体の有無も確認した。

【毒素保有状況結果】

apxCA プロファイルの PCR 検査を実施したところ、ApxIII、IVは保持していたものの通常保持するとされている Apx II を欠損していた (図 4、表 1)。このような毒素欠損株については、オーストラリアの論文 (2018 S. Yee) で App15 を 40 株調査したところ 17 株 (43%) で Apx II が欠損、また、その他の血清型である App1, 5, 7, 15 も調査したが App15 のみが高い確率で毒素の欠損が確認されたと報告している。国内での報告では、福岡県の尾川らの報告 (2015, 臨床獣医) では 61 株すべてで Apx II の保持を確認しており、国内では、はじめてオーストラリア同様の Apx II 毒素の欠損した App15 の存在を本県で確認した。

①毒素保有状況調査： Apx毒素II,III



図 4 毒素保有状況調査結果①

結果①：Apx毒素保有状況

菌株No.	毒素PCR				備考
	Apx I	Apx II	Apx III	Apx IV	
1	-	-	+	+	H29 App15
2	-	-	+	+	
3	-	-	+	+	
4	-	-	+	+	
5	-	-	+	+	H27 App15
6	-	-	+	+	
7	-	-	+	+	
8	-	-	+	+	
9	-	-	+	+	
10	-	-	+	+	
11	-	-	+	+	
12	-	+	+	+	
App2,15	-	+	+	+	典型例

表 1 毒素保有状況調査結果②

【薬剤感受性検査結果】

微量液体希釈法および一濃度希釈法で、複数の薬剤に感受性を示し、農場で App 対策に飼料添加剤として使用しているフロルフェニコールについても感受性が示された。2016. KAMIMURA らの報告では App15 が飼料添加物として多く利用されている OTC について 4 株中 4 株で耐性、その他福岡や香川などの報告でも OTC 耐性を示しているが今回の検査ではすべての株で OTC についても感受性が示された (表 2、3)。

②-1：薬剤感受性（一濃度ディスク法）

菌株No.	ABPC	PCG	OTC	GM	KM	ST	FF	ERFX	備考
1	28	22	25	17	18	28	30	26	App15
2	27	27	26	15	17	30	32	30	
3	27	24	18	15	15	23	31	24	
4	30	26	23	22	18	23	30	34	
5	25	25	25	17	17	30	35	30	
6	30	24	24	20	17	30	35	40	
7	30	30	23	20	22	30	38	30	
8	25	30	24	17	20	32	40	35	
9	30	30	25	15	22	32	35	32	
10	30	32	27	20	20	32	35	33	
11	27	22	20	13	17	27	30	32	
12	25	33	12	10	10	14	22	17	App2
感受性	17~29	15~47	19	15	18	16	26	23	mm
中間			15-18	13-14	14-17	11-15		19-22	
耐性			14	12	13	10	12	18	

感受性等：FFは（株）インターベット 十判定 ERFXは（株）バイエルン 感性判定、
他はCLS基準に準じて数値を参考値として記載

表 2 薬剤感受性試験結果①

【パルスフィールドゲル電気泳動法結果】
制限酵素 Apa I、Sma I にて、処理して検査を実施したところ、PFGE 遺伝子型は県内で分離した App15 は同様な切断パターンを示した。薬剤感受性および PFGE 型が、H27 および H29 分離株で同一であったことから同一株により感染が繰り返されているものと推測することが出来た。

②PFGE結果 制限酵素 Sma I (マーカー：スラダー)

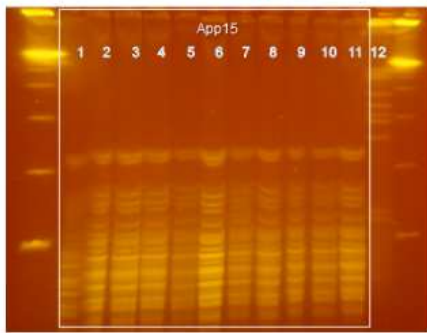


図 6 PFGE 結果①

②-2：薬剤感受性（微量液体希釈法）

菌株No.	最小発育阻止濃度(MIC, μg/ml)								備考
	NA	CPFX	SM	EM	TC	ABPC	GM	CP	
1	200	<0.03	4.00	200	0.25	0.25	0.25	0.12	App15
2	200	<0.03	4.00	200	0.25	1.00	0.50	0.12	
3	1.00	<0.03	2.00	1.00	0.12	1.00	0.50	0.12	
4	1.00	<0.03	4.00	1.00	0.25	0.25	1.00	0.25	
5	1.00	<0.03	4.00	2.00	0.25	0.12	1.00	0.25	
6	1.00	<0.03	8.00	2.00	0.25	0.12	0.50	0.25	
7	2.00	<0.03	4.00	2.00	0.25	0.12	0.50	0.25	
8	1.00	<0.03	4.00	2.00	0.25	0.12	1.00	0.25	
9	1.00	<0.03	8.00	1.00	0.25	0.12	1.00	0.15	
10	1.00	<0.03	8.00	1.00	0.25	0.12	1.00	0.25	
11	1.00	<0.03	8.00	2.00	0.50	1.00	1.00	0.25	
12	84.00	0.25	4.00	0.12	4.00	0.12	4.00	2.00	App2

表 3 薬剤感受性試験結果②

<PFGE方法>

- PPL0プロス (12.5g/L 酵母エキス含) で培養
- PPL0プロス500ml+酵母エキス15ml 菌液 16~18hr振とう培養
- 500μを1500g 15min 4℃ 上層除去後 TEで再度洗う400μl
- 400mlCSBでビベッティング
- 20mg/ml プロティナーを20μ接種 ビベッティング液空量
- フラグモールを用直し、上の菌液に1%SDSAcaroseを等量 (420μ) 加え
- ビベッティングレウエル作製
- 4℃で10min 固める
- CLB (5ml+プロティナーを25μ) に接種 55℃ 2.5h
- このとき、DW TEも洗浄用のものを55℃に保温
- DWで洗浄 (55℃) 2回
- TEで洗浄 (55℃) 4回 各10min
- TE 1mlに保存 (4℃)

<制限酵素処理>

- フラグ断片~37C DW 10min 200μl
- 制限酵素mixture 100μ 37C over night
- 40U Apa I Sma I
- グル作製
- フラグを0.5TEに5分 (制限酵素を除去) 空量
- 泳動5~20sec 200V (6v/cm) 14℃ 20hr

図 5 PFGE 方法

①PFGE結果 制限酵素 Apa I (マーカー：スラダー)

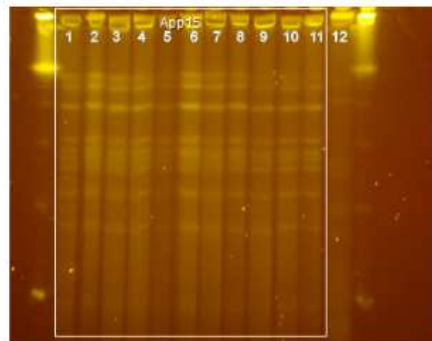


図 7 PFGE 結果②

【農場汚染状況把握のための ELISA 検査】

農場で使用している不活化ワクチンに含まれない ApxIV 毒素に対する抗体について、ELISA キットを用いて検査したところ 3ヶ月齢頃に移行抗体が消失し 4~5ヶ月齢の肥育豚舎移動後に抗体が陽転することがわかった(図 1, 2)。このことから、肥育豚舎で App に感染していることが推測され、肥育豚舎で水平感染を繰り返しており、抗生物質の切れたときに発症死亡しているものと推測された。

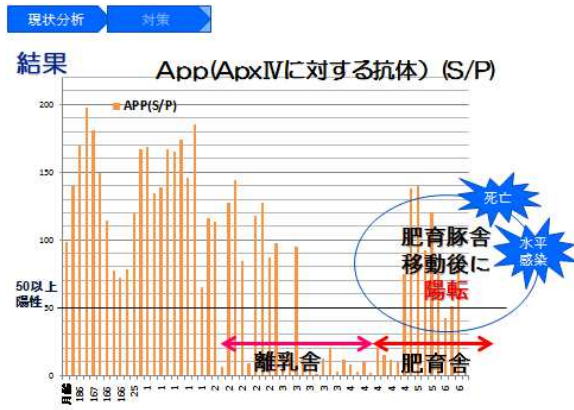


図8 ELISA 検査結果①

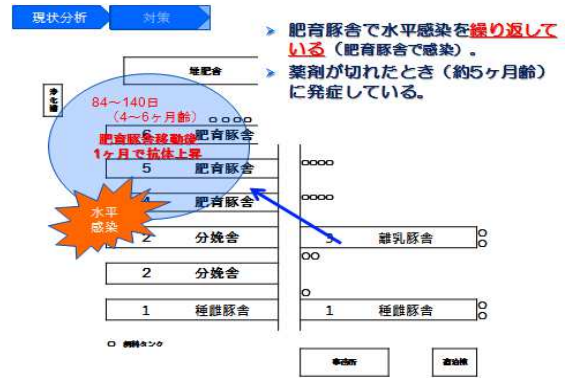


図9 ELISA 検査結果②

【対策】

当所では、病性鑑定や抗体検査の結果について、管理獣医師や関係機関と定期的な勉強会を開催することにより情報の共有を図ることとした。薬剤感受性の結果より、使用している薬剤は感受性があるものの飼料添加では効果についても限度があり抜本的な肥育豚舎での消毒の実施を行うこととした。また、ワクチンや投薬プログラムについての検討、ストレス低減のための密飼の改善や畜舎清掃の徹底、死亡豚・ひね豚の速やかな処理、こまめな温度管理の指導などを実施。

密飼改善や肥育豚舎移動後の抗生物質の使用期間を延長するなどの対策によりやや死亡率は改善したが（図10）、依然として豚胸膜肺炎による死亡豚が認められることから、畜舎の清掃など改善が不十分な事項について、農場における作業手順を再度確認しながら指導を実施した（図11）。その後、肥育豚舎の死亡率は徐々に減少し、平成30年12月時点ではと場の胸膜炎発生率も減少傾向にある。平成30年9月からは、繁殖母豚を5グループに分け子豚舎、肥育舎でオールインオールアウトを行うことを目的に4週間隔で交配、分娩、離乳させる方式（フォーファイブシステム）に向けた新たな取り組みを開始した。

現状分析 対策

衛生改善対策①

- 抗生物質の使用期間延長および適正使用（肥育豚舎移動後2週間→4週間）
- 発症要因防止（消毒清掃、密飼防止など）

やや死亡率減少するも死亡数安定せず

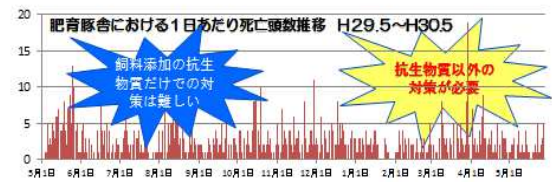


図10 衛生改善対策①

現状分析 対策

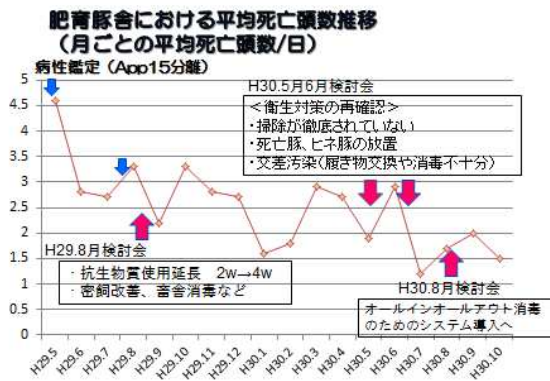
衛生改善対策②

<飼養衛生管理徹底を指導>

- 清掃不足、ヒネ豚死亡豚の放置
- 消毒不十分など

図11 衛生改善対策②

【まとめ】



平成 27 年度山梨県業績発表会で秋山らは県内の養豚農家の App15 血清抗体を調査し、県内すべての農家で抗体が確認されたことから App15 が広く県内に浸潤していると報告している。しかしながら、県内では A 農場のみが App15 による胸膜肺炎を主要な原因として死亡率の上昇が起きており、問題となっている。

今回、A 農場から分離された App15 について、菌株解析を実施したところ Apx II 欠損かつ複数の薬剤に感受性を示す特徴のある非典型株であることがわかった。一部の毒素を欠損しており、複数薬剤感受性株であったが死亡率の上昇等被害は甚大であった。

このような App 非典型株についても、一部の病原毒素が欠損しているだけで好中球やマクロファージに細胞毒性などを示す Apx III や溶血性を示す Apx IV などの病原性は保持しており、A 農場の被害は甚大であったことから今後も注意深く観察していく必要があると思われる。

App15 対策については、飼養衛生管理等の飼育環境が発病に関与していると考えられており、今回の A 農場においても飼育環境の重要性に改めて気づかされた。

抗生物質の長期使用や衛生対策を管理獣医師と連携し実施、肥育豚舎における死亡率を減少させることに成功したが、オールインオールアウトによる消毒実施に向け指導を継続中である。

今後は、さらなる予防対策のためにも国内における App15 ワクチンの早期開発が望まれる。また、App15 菌株の毒素保持パターンについても継続的な調査が必要と考える。

<参考文献>

- ・ Bruno Chevallier, 1998 FEMS, Microbiology : Chromosome sizes and phylogenetic relationships between serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*
- ・ 平田 綾子, 2016 酪農学園大学, わが国の豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* に関する疫学的研究
- ・ Ho To Microbiol Immunol 2016, Genetic and antigenic characteristic of Apx II A from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3, 4, 6, 8 and 15
- ・ 秋山倫子, 平成 27 年度山梨県家畜保健衛生所業績発表会, 県内で初めて確認された

Actinobacillus pleuropneumoniae 血清型 15 による豚胸膜肺炎発症事例

- Hiroya Ito, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2015
- S Yee, 2018 Australllian Veterinary Association
- Ayako MORIOKA, 2008 J. Vet
- T. Gram, Veterinary Microbiology 75(2000)43-57
- 福岡県における *Actinobacillus pleuropneumoniae* 血清型 15 による豚胸膜肺炎の発症事例について (2015. Oct. Vol. 33, No. 10 臨獣医)
- Kaho TESHIMA. The Journal Of Veterinary Medical Science 1 Feb 2019