

資料

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) 清浄化に向けた検査プロトコールの検討

小池郁子、村田 知、大井宗孝 (エス・エム・シー株式会社)

Koike,F, Murata,S. and Ooi,M.(2017). Monitoring method for the eradication of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP).*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 69, 18-22.

キーワード：APP、清浄化、検査

査プロトコール作成について検討を行ったので報告する。

はじめに

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下 APP) は、豚繁殖・呼吸器障害症候群 (PRRS) ウイルスや豚サーコウイルス 2 (PCV2) が日本に侵入する以前から、豚の呼吸器感染症の主要な病原体であり、すでに一世代 (約30年) を越え、農場に根付いてしまっている。そして現在も豚の呼吸器病の主要原因菌として問題視されている。

近年、PRRS や PCV2 の減少と共に APP の検出率は弊社疾病調査において低下傾向にあるが、出荷豚での APP 様病変、血清抗体検査結果などから、農場単位で見ると、重篤な症例は減っているが農場から完全に排除出来たケースは非常に少ないと考えられる。PRRS や、豚マイコプラズマ肺炎 (MPS) 等については臨床検査データに基づいた清浄化対策に取組み、成功している事例⁵⁾も報告されている。そこで、弊社での APP 検査結果を整理すると共に、APP 清浄化に向けた検

1. 呼吸器病起因病原体検出率の推移

肺炎などの呼吸器病起因病原体の検出率の経時的变化を調査するために、呼吸器症状を主症状とした死亡豚から検出された病原体の検出率を、2004年から2015年まで4年おきの年のデータを集計した。細菌は分離培養法により、ウイルスおよびマイコプラズマはPCR法により検出した。2007年、2011年の APP の検出率はそれぞれ31.9% (n = 210検体)、31.8% (n = 403検体) と高かったが、2015年には17.1% (n = 375検体) と検出率の有意な減少が認められた。APP 以外の細菌性の病原体としてはレンサ球菌が21.0%と最も高率に検出された。ウイルス性の病原体としては、PRRS ウイルスの検出率が集計期間中最も高く、2007年の20.0%から2011年には39.5%に有意に上昇し2015年には僅かに減少したが有意差はなく、検出率は33.8%であった (図1)。

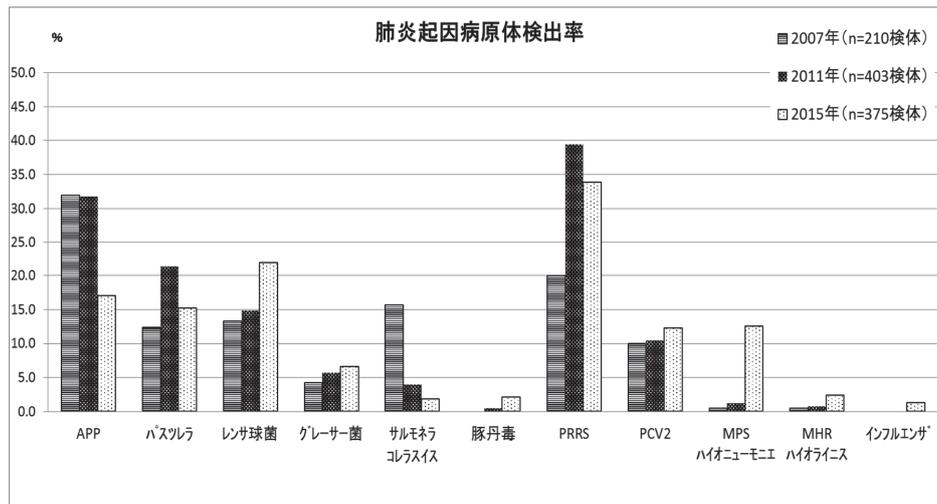


図1. 呼吸器症状および斃死原因究明を目的とした検体中の肺炎起因病原体の検出率の4年ごとの推移 (2007年、2011年、2015年)。

2. APP 血清型の推移

1989年～2015年の26年間に分離された APP (2575株) の血清型別 (血清型1, 2, 3, 5a, 5b, 6, 7, 8, 9, 12) を血清凝集反応 (自社保有)、血清型15はゲル内沈降反応および PCR 法^{1,3,6)} の併用により実施した。調査期間中に分離された菌株の血清型は、血清型2が最も多く、供試菌株の50%以上を占め、次いで血清型1が25%以上、血清型5は、2006～2010年は1.8%と

低い検出率であったが平均で5%以上であり、これまでの報告同様、これら3種類の血清型が日本での主要血清型であった。1989年～2015年までに分離された APP の血清型を図2に示した。1996～2000年の5年間では血清型1型の分離率が41%と非常に効率であった。また、2001～2005年には血清型6が、2006～2010年には血清型15が初めて分離された。年代別には1989年～1995年には9種類の血清型が確認されていたが

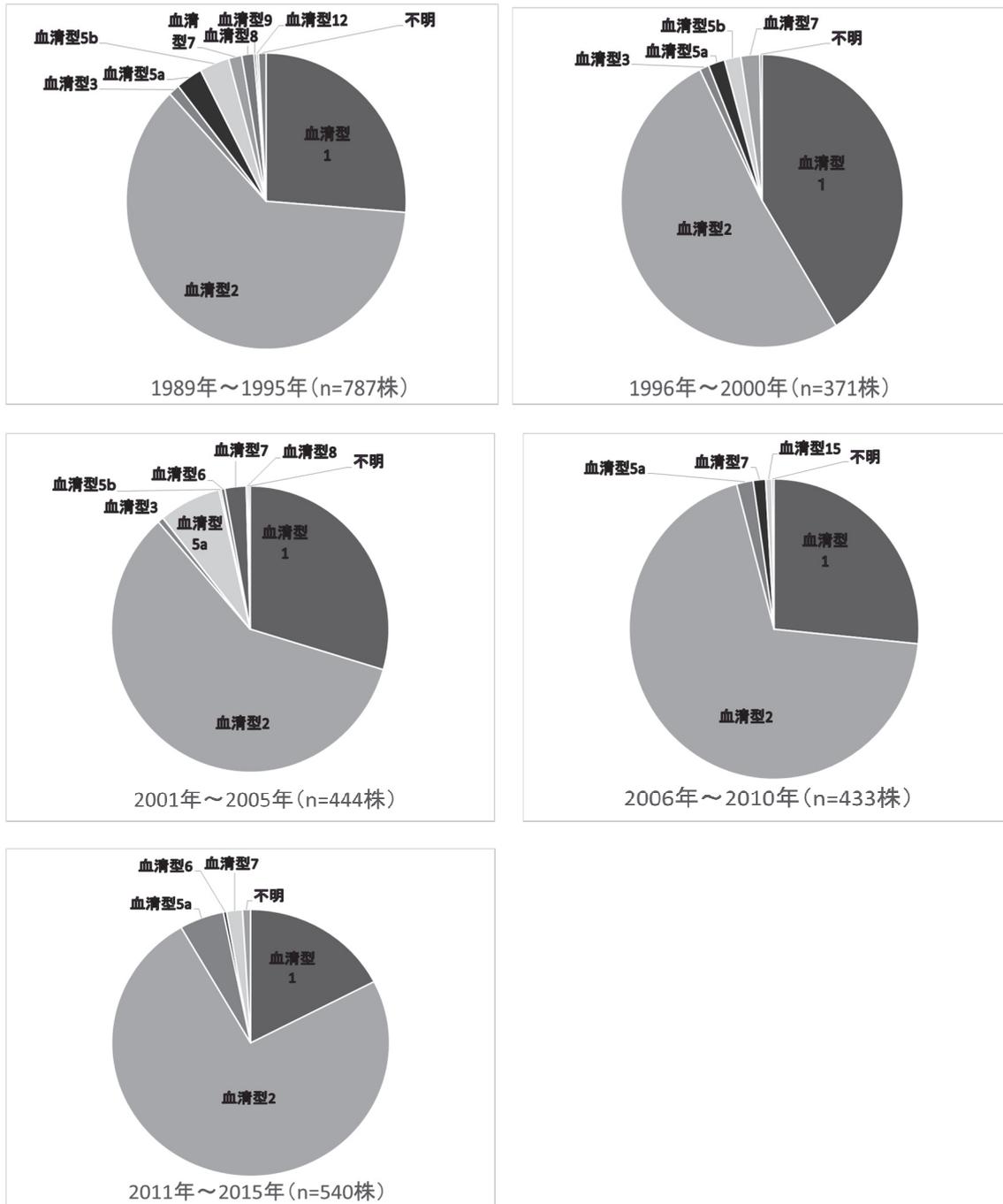


図2. 分離された APP の血清型別の分布 (1989年～2015年までの約5年ごとの集計)。

2007年以降に分離された菌株では血清型の多様性は減少した。また、2011年～2015年は血清型2が74%と高く、複数の抗血清で凝集し、PCR法での判別もできなかった型別不能株が1%であった。

3. APP 検査方法

APPの検査には、肺病変部および鼻腔スワブからの馬脱線血寒天培地（V因子入り）による分離培養法や抗体検査による血清学的診断法が実施されている。近年、口腔液を用いたPCR法による種々の呼吸器感染症起因病原体の特異遺伝子検出が行われてきており、弊社でもAPPでの応用の可能性について現在検討を行っている。血清抗体検査は、血清型1, 2, 5の補体結合反応（CF試験）および各血清型の莢膜や、外膜蛋白、LPSなどを抗原としたELISA検査、Apx毒素を抗原としたELISA検査法などが実施されているが、検査対象が特定の血清型のみである場合や、Apx IおよびApx II毒素を抗原に用いたウェスタンブロット解析では*Actinobacillus suis*との交差反応が認められること⁴⁾、ワクチン抗体と感染抗体の識別ができないことなどの問題がある。Apx IVはAPPの全ての血清型が産生する種特異的な毒素であり、欧米ではApx毒素IVを抗原としたワクチン抗体と感染抗体の区別が可能なELISAキット（APP-Apx IV Abキット、

IDEXX Laboratories, Inc.）がAPP検査に利用されている。今回、試験的に本キットを使用してAPPの抗体検査を実施し、本キットの使用を想定した検査プロトコルの策定を行った。

4. APP-Apx IV Ab キット検査(以下 Apx IV検査)

1) Apx IV検査結果と、と畜豚肺病変の確認

APPワクチン未接種のA農場とB農場（共に母豚2,000頭規模、PRRS陽性農場）において、同一群の3～5頭に耳標を装着し、30, 60, 90, 120, 150日の各日齢で採血を行った。採血終了後の血清について、Apx IV検査を実施し、両農場の抗体価の推移と調査個体を含む豚群のと畜場でのAPP肺病変の有病率の比較を行った。肺病変については、胸膜肺炎像が認められた肺をAPP病変とし、肺の肝変化が認められた肺はMPS病変とした。

両農場とも30, 60日齢で抗体が確認された。90日齢でELISA値の下降が認められたことから移行抗体の可能性が考えられたが、感染抗体であるか、今後継続的に調査し判定する必要がある。A農場では120日齢以降にELISA値の上昇が認められたが、B農場では抗体価の上昇は認められなかった（図3）。両農場の肺のAPP有病率は、A農場で62.5%（10/16頭）、B農場は0.0%（0/11頭）であり、ELISA値の推移と有病率

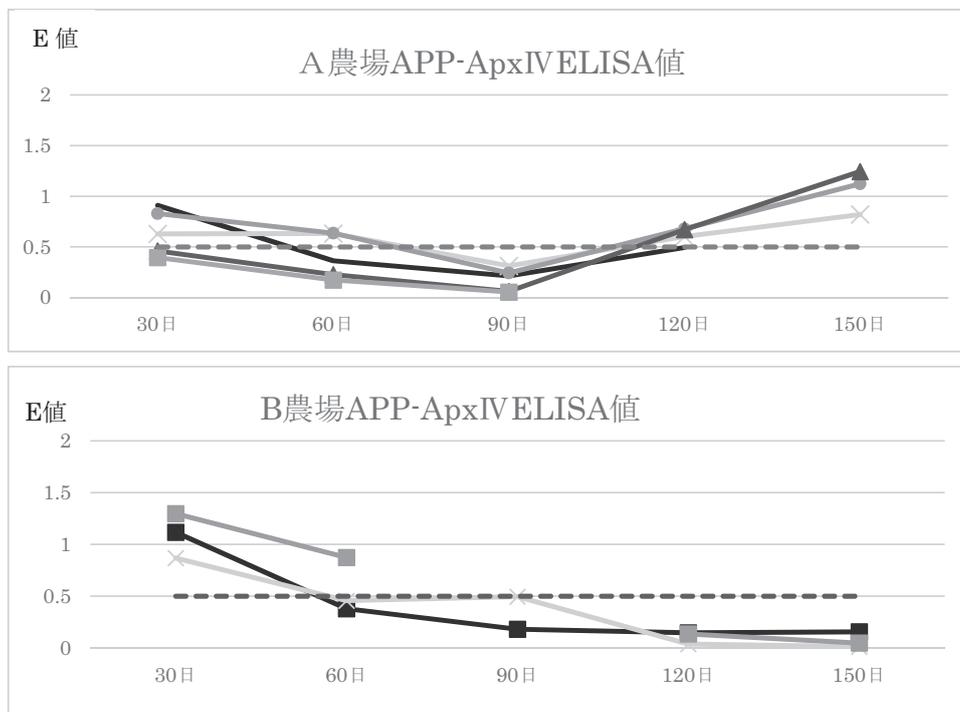


図3. 各個体（A農場5頭、B農場3頭）の日齢ごとのAPP-ApxIV ELISA値の推移（ELISA値評価（-） $0.4 < (\pm) < 0.5 \leq$ （+）破線はELISA値の陽性ポイント）

が一致していることが確認出来た。

A農場では、肥育舎へ移動後（約70日齢）に、発咳等の呼吸器症状、PRRSの感染を、さらに出荷前の死亡豚の病性鑑定にてAPP感染を確認していたが、Apx IV検査により、肥育舎移動後の早い段階で、APPに感染していた可能性が示唆された。

また、Apx IV検査において、90日齢以降の肥育豚で、ELISA値が2峰性に上昇している個体が認められ（データ未掲載）、母豚で感染したAPPと異なる血清型株による感染、あるいは肥育豚群内で複数の血清型が存在している可能性が考えられた。今後、血清型特異的なELISAなどを用いて詳細に調査する必要があると考える。

2) ワクチン抗体と感染抗体

C農場は、50日、70日にワクチンを接種しており、ワクチン接種後の90日齢では血清型2 莢膜抗原を用いたELISA法にて抗体の上昇が認められ（図4右）、Apx IV検査により感染抗体は上昇していないことが明らかになった（図4左）。従来のELISA法（血清型2の莢膜抗原、外膜蛋白を用いた抗原）とApx IV検査を組み合わせることで、ワクチンによる抗体の上昇と感染による抗体の動きを識別することが可能と考えられる。

5. APP検査プロトコルの検討

上記調査結果よりApx IV検査の使用を想定した、APPの感染状況や清浄化確認のための検査プロトコルとして以下の方法を提案したい。

1) APP感染状況の確認（APP発症時）

斃死原因究明：肺からの呼吸器感染症調査、APP分離および血清型別（ワクチンの使用検討する際に血清型の確認は特に重要である。）

呼吸器症状原因究明：呼吸器症状を示す豚での類症鑑別を含めた鼻腔スワブからの分離。なお鼻腔スワブからの確認は、斃死豚と比較し感度は低いため、検出されない可能性を考慮し、3～5頭程度にて確認することが望ましい。口腔液からのPCR調査（口腔液からの検出については、APP以外の呼吸器病起因病原体の検出も可能で、簡便な採材方法であることからAPP検査の一つに加えられるよう検討し組み入れていく必要がある²⁾）。

出荷豚肺病変の確認：胸膜肺炎の割合など（毎月または季節ごとなど）

2) APP発症要因解明の各種呼吸器感染症調査：年2回以上、各ステージ約1か月ごと出荷前まで各5頭程度の定期的な呼吸器感染症（APPの他PRRS, PCV2, MPS, インフルエンザなど）の血清抗体検査および約1か月ごとの1～3豚房での口腔液PCR検査、病性鑑定による発症要因の調査。

3) APP感染状況の確認：ワクチン抗体が確認できるELISA法およびApx IV抗原を用いたELISA法によるワクチン抗体と感染抗体の確認、APP感染時期の確認（年2回以上、繁殖豚含めた各ステージ、約1か月ごと出

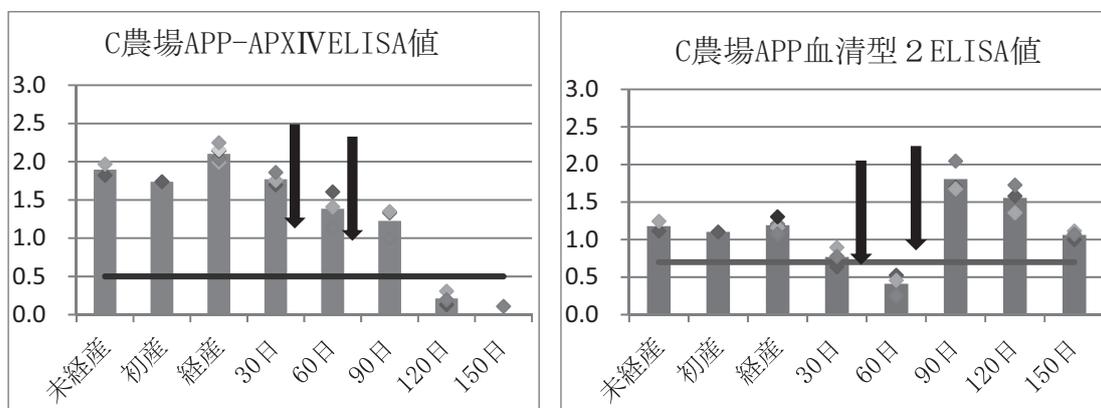


図4. APP-ApxIV ELISA値（左）およびAPP血清型2 ELISA値（右）
棒グラフは各ステージの3頭の平均ELISA値を、横線はELISA値の陽性ポイント、矢印はワクチン接種時期、各点は個体のELISA値を示す。

荷前まで)。

- 4) APP 清浄化の確認：年 2 回以上の Apx IV 検査による陰性状態維持の確認。また、Apx IV 検査による導入豚の APP 陰性確認。

なお、検査頭数については、農場規模や感染頭数を考慮する必要がある (参考サイト <http://www.winepi.net>)。

6. まとめ

APP 感染については、これまで著者らは日本での主要血清型である血清型 1, 2 および 5 の CF 試験および血清型特異的な抗原を用いた ELISA による抗体検査を実施してきたが、これらの抗体検査法では、感染抗体とワクチン抗体の識別ができないことと、血清型 15 をはじめとする他の血清型や型別不能株が分離されている現状から、血清型特異的な抗体検査では不十分であると考えられた。

そこで、今回、APP の血清型に関係なく感染のみを確認することができる APP-Apx IV を抗原とした ELISA 法を取り入れることで、農場での感染状況をよりの確にとらえることが可能となった。

今後、APP-Apx IV Ab キットが市販された場合は本キットを組み入れた APP 検査体制を整備し、APP を含めた呼吸器感染症の定期的な検査を実施することにより、APP 感染時期の特定と、発症要因の確認など清浄化対策を行う上で有用な知見が得られ、臨床検査の成績が APP の清浄化に向けた取組につながると考えられる。

引用文献

- 1) Angen Ø, et al.(2008) Development of a multiplex PCR test for identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1,7, and 12. *Vet Microbiol*, 132: 312-318.
- 2) Cheong Y, et al.(2016) A survey of porcine respiratory disease complex (PRDC) associated pathogens among commercial pig farms of Korea via oral fluid methods. *J Vet Sci*, in press.
- 3) 伊藤 博哉 (2016) 豚胸膜肺炎の起因菌 *Actinobacillus pleuropneumoniae* の生物型、血清型及び遺伝子型について. *家畜衛生学雑誌*, 42: 29-60.
- 4) Kamp EM, et al.(1994) Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect Immun*, 62: 4063-

4065.

- 5) Rautiainen E, et al.(2001) Regional eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from pig herds and documentation of freedom of the disease. *Acta Vet Scand*, 42: 355-364
- 6) Schuchert JA, et al.(2004) Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 8 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42: 4344-4348.