

原著論文

梅山豚母豚の *Trueperella pyogenes* が関与する化膿性腸炎岡安美佐子¹⁾、小澤世里香¹⁾、土屋彰彦¹⁾、宮崎元伸¹⁾、加藤貴誉湖²⁾、高松大輔^{3,4)}、芝原友幸^{5,6)}⁽¹⁾さいたま市健康科学研究センター、⁽²⁾栃木県県央家畜保健衛生所、⁽³⁾農研機構・動物衛生研究部門細菌・寄生虫研究領域、⁽⁴⁾岐阜大・大学院・連合獣医学研究科、⁽⁵⁾農研機構・動物衛生研究部門病態研究領域、⁽⁶⁾大阪府大・大学院・生命環境科学研究科)

Okayasu, M., Ozawa, C., Tsuchiya, A., Miyazaki, M., Kato, K., Takamatsu, D. and Shibahara, T. (2020).

Purulent enteritis associated with *Trueperella pyogenes* in a Meishan sow.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 75, 21-26.

Abstract

This paper reports a case of purulent enteritis associated with *Trueperella pyogenes* in a 3-year-old Meishan sow slaughtered in 2018. At necropsy, severe circumferential thickening of the small intestinal wall was observed. Macroscopically, folds of the intestine were enlarged and grayish-white to pale yellow in color. Histologically, severe purulent enteritis and coagulative necrosis of mucosal surface were detected with numerous Gram-positive short bacilli. The short bacilli were identified as *Trueperella pyogenes* through immunohistochemical, biochemical, and genetic tests, including 16S rRNA gene sequencing. These data indicate that *T. pyogenes* would be associated with unusual gross morphological enteritis of the pig.

Key word : Meishan pig, Purulent enteritis, *Trueperella pyogenes*

要約

と畜場に搬入された約3歳齢の梅山豚の母豚において、解体検査時に小腸壁の重度な肥厚が認められた。肉眼的に、輪状ヒダは増大して灰白色から淡黄色を呈していた。組織学的に、多数のグラム陽性短桿菌を伴った粘膜面の凝固壊死及び重度の化膿性腸炎を認めた。当該短桿菌は、免疫組織化学的検査、生化学的検査及び16S rRNA 遺伝子配列解析を含む遺伝子検査によって *Trueperella pyogenes* と同定された。これらの結果から、特徴的な肉眼所見を示した豚の腸炎に *T. pyogenes* が関与していることが示唆された。

キーワード：梅山豚、化膿性腸炎、*Trueperella pyogenes*

【はじめに】

Trueperella pyogenes は、グラム陽性、通性嫌気性、無芽胞の短桿菌で、さまざまな家畜や野生動物に化膿性感染症を引き起こす原因となる^{15,20)}。豚では肺炎¹⁰⁾や関節炎⁶⁾及び膿瘍²²⁾に関与し、胃粘膜⁹⁾、扁桃¹⁴⁾及び鼻腔²⁾の常在菌とされる一方で、腸管からの分離例や腸炎に関連した報告はこれまでのところ見当たらない。今回、と畜場に搬入された梅山豚の母豚に *T. pyogenes* が関与したと推定される化膿性腸炎が認められたので概要を報告する。

【発生状況】

2018年3月、約3歳齢の梅山豚の雌1頭がさいたま市内のと畜場に搬入された。臨床経過及び病歴は不明で、解体前検査において栄養状態の軽度な低下が認められた。

【材料及び方法】

＜病理組織学的検査＞

解体検査時、病変の認められた小腸を採取し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で室温固定後、パラフィン包埋切片（厚さ約3μm）を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）及びグラム染色を行い、顕微鏡下で観察した。

＜免疫組織化学的検査＞

ホルマリン固定パラフィン包埋切片（厚さ約3μm）について、抗 *T. pyogenes* ウサギポリクローナル抗体¹³⁾を一次抗体として用いた免疫染色を実施した。3%過

酸化水素加メタノールで処理後、0.1%アクチナーゼ E 溶液で37℃、20分間抗原賦活化を行った。一次抗体は、抗体希釈液 (S3022, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) で2,048倍に希釈し、市販キット (Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI), ニチレイ, 東京) の添付文書に従って反応させた。発色は AEC 基質 (Simple Stain AEC 溶液, ニチレイ, 東京) を用い、室温で5分間反応させたのち、ヘマトキシリンで対比染色した。陰性対照は、一次抗体として正常山羊血清を用いた。

<細菌学的検査>

小腸病変部を5%羊血液加コロンビア寒天培地 (Difco, 日本 BD, 東京)、パールコア DHL 寒天培地 (栄研化学, 東京)、10%卵黄加変法 GAM 寒天培地 (日水製薬, 東京)、5%羊血液加変法 GAM 寒天培地 (日水製薬) 及び10%卵黄加 CW 寒天培地 (日水製薬) にスタンプ塗抹した。続いて、5%羊血液加コロンビア寒天培地は35℃ 5%炭酸ガス下、パールコア DHL 寒天培地は37℃ 好気下、それ以外の培地は37℃ 嫌気下で24時間培養した。分離株は、純培養したのち、グラム染色による観察及びカタラーゼ試験を実施した。

<分子生物学的解析>

病変部及びグラム陽性、カタラーゼ陰性短桿菌の抽出 DNA について、*T. pyogenes* 特異的 PCR⁹⁾ を実施した。分離株からの DNA 抽出は、InstaGene Matrix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行った。さらに、

病変部の抽出 DNA について、Arai らの方法¹⁾ に準拠して16S rRNA 遺伝子を標的としたPCRを行った。病変部組織からの DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し、増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製した後、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 及び3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。得られた配列は SEQUENCHER Ver. 5.4.1 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) 及び EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)²⁾ で解析した。

<薬剤感受性試験>

分離された *T. pyogenes* について、5%羊血液加ミューラーヒント寒天培地 (Difco, 日本 BD, 東京) 上で Etest (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) を用いた薬剤感受性試験を実施した。最小発育阻止濃度 (MIC) の判定は、35℃、5%炭酸ガス下で48時間培養後に行った。供試薬剤は、ベンジルペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、セフトキシム及びエンロフロキサシンの11薬剤を使用した。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドライン^{3,4)} に *T. pyogenes* における各薬剤のブレイクポイントが掲載されていなかったため、既報^{5,16,17)} に準じて判定を行った (表1)。

表1 薬剤感受性試験成績

薬剤 ¹⁾	MIC (μ g/ml) (判定 ²⁾)	MIC breakpoints (μ g/ml) S / R	参考文献 ³⁾
PCG	0.06 (S)	≤ 0.12 / ≥ 4	15
ABPC	0.23 (S)	≤ 1 / ≥ 2	16
AMPC	0.47 (S)	≤ 1 / ≥ 2	16
TC	12 (I)	≤ 4 / ≥ 16	15
EM	0.16 (S)	≤ 0.5 / ≥ 2	15
CP	0.75 (S)	≤ 4 / ≥ 8	16
SM	1.5 (S)	≤ 4 / ≥ 8	3
GM	1.5 (I)	≤ 1 / ≥ 2	3
KM	3 (S)	≤ 4 / ≥ 8	3
CTX	≤ 0.25 (S)	≤ 1 / ≥ 4	15
ERFX	0.5 (S)	≤ 0.5 / ≥ 4	15

1) PCG, ベンジルペニシリン; ABPC, アンピシリン; AMPC, アモキシシリン; TC, テトラサイクリン; EM, エリスロマイシン; CP, クロラムフェニコール; SM, ストレプトマイシン; GM, ゲンタマイシン; KM, カナマイシン; CTX, セフトキシム; ERFX, エンロフロキサシン

2) S, 感受性; I, 中間; R, 耐性

3) Breakpoints を参照した文献

【結果】

＜肉眼所見＞

解体後の内臓検査において、小腸は弾力を伴って高度に腫脹し、内腔が狭窄していた(図1)。粘膜面は灰白色から黄白色を呈し、輪状ヒダは顕著に肥厚していた(図2)。病変部は少なくとも15cmの長さにわたっており、漿膜が充うっ血していた。肝被膜は軽度に白濁化し、両側腎臓の退色及び左腎に白斑が認められた。腸間膜リンパ節を含め、その他の臓器に著変はみられなかった。



図1 小腸横断面。腸管腔は増生した粘膜により狭窄。

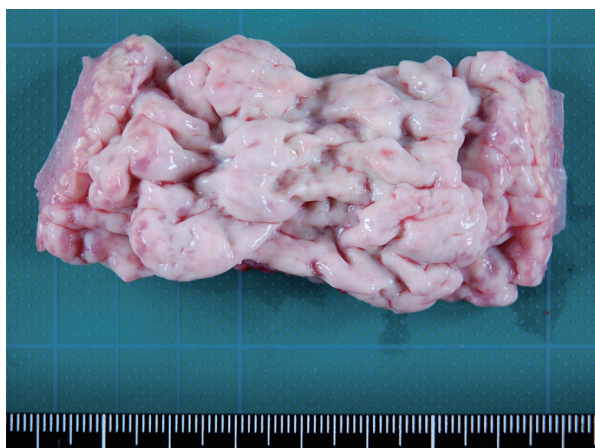


図2 小腸粘膜面。粘膜表面は灰白色を呈し、輪状ヒダは高度に腫脹。

＜病理組織学的所見＞

小腸粘膜は全周性に腫大、肥厚し、絨毛が消失していた(図3)。粘膜面は凝固壊死し、変性細胞からなる分界線の形成が認められた。粘膜固有層は水腫性に拡張し、多巣性から融合性の膿瘍が認められた(図4)。膿瘍の中心に菌塊が認められ、核の変性した好中球が放射状に取り囲んでいた(図5)。膿瘍周囲には肉芽組

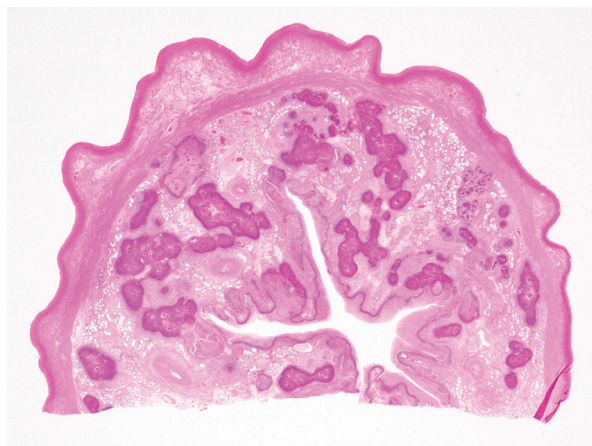


図3 小腸横断面のルーペ拡大像。絨毛は消失し、肥厚した粘膜に多数の膿瘍が認められる。HE染色。

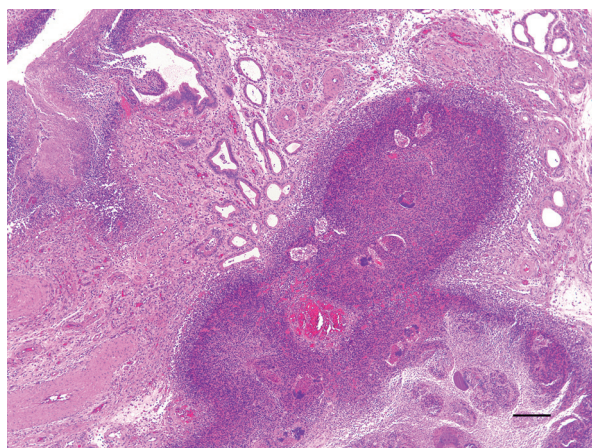


図4 小腸。粘膜は凝固壊死し、変性細胞からなる分界線の形成が認められる。粘膜固有層は水腫性に拡張し、融合性の膿瘍が形成されている。HE染色。(Bar=200 μ m)

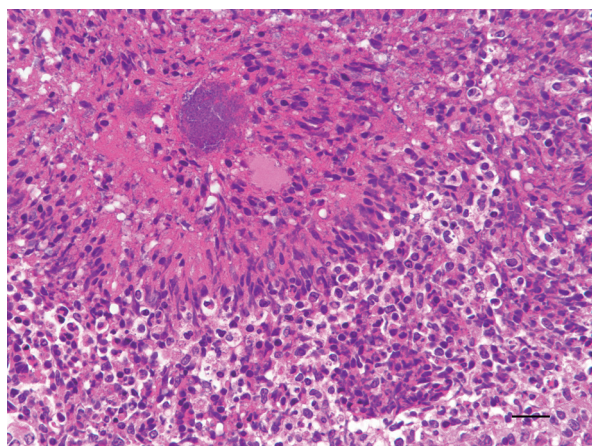


図5 小腸。膿瘍は変性した炎症細胞に取り囲まれている。HE染色。(Bar=20 μ m)

織の増生及び間質の水腫が認められ、腺管構造や肥厚した血管が数多く観察された(図6)。膿瘍にみられた

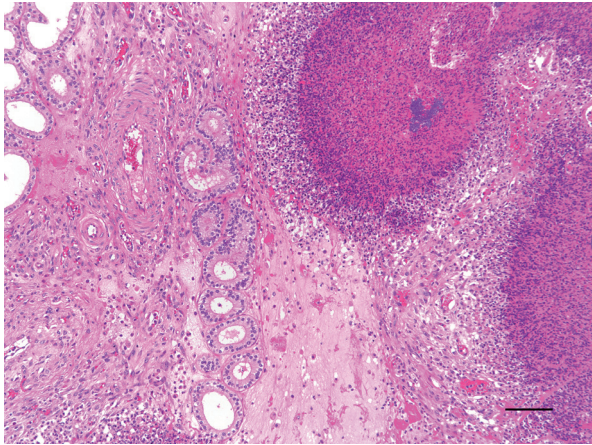


図6 小腸。膿瘍周囲には肉芽組織の増生及び間質の水腫が認められる。多数の腺管や血管が形成されている。HE染色。(Bar=100 μm)

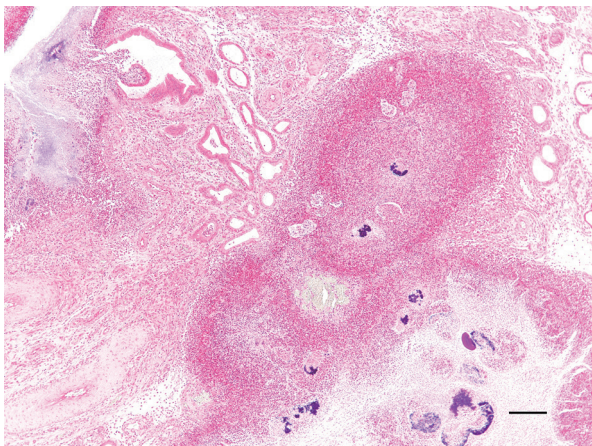


図7 図4と同視野。多数のグラム陽性菌が膿瘍中心及び粘膜面にみられる。グラム染色。(Bar=200 μm)

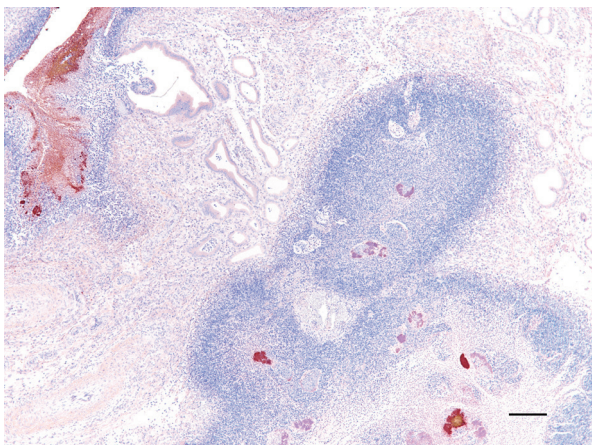


図8 図4と同視野。膿瘍や粘膜面のグラム陽性短桿菌は抗 *T. pyogenes* 抗体に陽性を示す。免疫染色。(Bar=200 μm)

菌塊は、グラム陽性の短桿菌や球菌からなり、短桿菌

は粘膜面の凝固壊死巣においても観察された(図7)。

<免疫組織化学的所見>

膿瘍や粘膜面に認められたグラム陽性短桿菌に一致して、抗 *T. pyogenes* 抗体に対する陽性反応が認められた(図8)。

<細菌学的検査>

小腸病変部の嫌気培養において、グラム陽性、カタラーゼ陰性の短桿菌が分離された。このほか、好気及び嫌気培養において、2種類のグラム陽性球菌(それぞれカタラーゼ陽性及び陰性)が検出された。

<分子生物学的解析>

病変部及びグラム陽性、カタラーゼ陰性短桿菌の抽出DNAを用いた *T. pyogenes* 特異的PCRにおいて、*T. pyogenes* に特異的な270 bpの増幅産物が確認された。また、複数の病変部抽出DNAサンプルから16S rRNA遺伝子が増幅され、増幅産物の部分塩基配列(1356~1485 bp)は、*T. pyogenes* 基準株の16S rRNA遺伝子配列(DDBJ/EMBL/Genbank accession No. X79225)と100%一致した。以上の結果から、病理組織学的検査で病変部に認められ、細菌学的検査で病変部から分離されたグラム陽性短桿菌は、*T. pyogenes* と同定された。なお、*T. pyogenes* のほかに分離された2種類のグラム陽性球菌の16S rRNA遺伝子配列は、カタラーゼ陽性菌が *Staphylococcus argenteus* の基準株及びカタラーゼ陰性菌が *Streptococcus porcinus* の基準株(それぞれDDBJ/EMBL/Genbank accession No. FR821777 及びNo. AB002523)の16S rRNA遺伝子配列とそれぞれ100%及び99.32%の一致率を示した。

<薬剤感受性試験>

中間を示した2薬剤(テトラサイクリン及びゲンタマイシン)を除き、9薬剤で感受性を示した(表1)。

【考察】

本症例は、病変部からの *T. pyogenes* の分離及び免疫組織化学的な *T. pyogenes* 抗原検出に加え、組織から直接抽出したDNAから *T. pyogenes* の16S rRNA遺伝子が検出された。これらの結果から、小腸の壊死性化膿性病変の形成に *T. pyogenes* が関与していることが示唆された。豚における *T. pyogenes* 感染は、これまでに膿瘍や骨髓炎、関節炎のほか、肺炎の原因として報告され

ている^{10,11)}。腸管からの *T. pyogenes* 分離例は、敗血症を呈したヤモリ¹⁸⁾ やサル類¹²⁾ に限られ、豚での報告は敗血症の有無に関わらず見当たらない。しかしながら、豚の胃粘膜での常在が報告されている⁹⁾ ことから、豚の腸管においても常在している可能性は否定できない。*T. pyogenes* の薬剤耐性については種々の報告^{5,22)} があるが、今回の分離株はほとんどの薬剤に感受性を示した。当該豚の農場における抗菌性薬剤の使用状況は把握できなかったが、今後も分離菌の薬剤感受性に注意を払っていく必要がある。

顕著な粘膜肥厚に加え、煮肉様の特徴的な肉眼所見を示した本症例は、粘膜固有層の重度な化膿性病変及び粘膜面の凝固壊死から構成されていた。粘膜固有層における肉芽組織の増生や再生性と推定される腺管構造の存在から、ある程度の時間経過が推測され、病変の形成機序は明らかにできなかった。消化管における感染症の発生は、宿主側の防御能の低下や病原体が防御能をしのいだ際に起こるとされる⁷⁾。このことから、常在菌の可能性のある *T. pyogenes* は抗生物質による正常細菌叢の消失や腸の蠕動運動の不全⁷⁾ など宿主側の防御能の低下に伴って、腸炎の起因細菌にもなり得ると考えられた。

T. pyogenes とともに分離された *S. argenteus* 及び *S. porcicus* については、詳細な検査を実施しておらず、病変への関与の程度は明らかでない。しかしながら、リンパ節炎や心内膜炎、膿瘍の原因となる^{8,19)} ことから、化膿性病変を重症化した可能性も考えられる。

本症例は *T. pyogenes* が関与した化膿性腸炎の最初の報告であるが、病変の範囲や分布、病変部－正常部境界が確認できていないため、病態のさらなる解明には症例の蓄積が必要と考えられた。

【謝辞】

本症例の病理組織学的検索にご協力いただいた農研機構・動物衛生研究部門の小林勝技師、嶋田恵美技師、採材及び微生物学的検査にご協力いただいた、さいたま市食肉衛生検査所職員の皆様に深謝いたします。また、本報告をまとめるにあたり、ご助言いただいた愛知県中央家畜保健衛生所 杉江建之介氏、京都府中丹家畜保健衛生所 吉崎康二郎氏、鹿児島県肝属家畜保健衛生所 猜都勇介氏及び広島県西部家畜保健衛生所 伊藤弘貴氏に感謝いたします。

【利益相反状態の有無】

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Arai R, et al. (2012) Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. PloS ONE, 7: e33708.
- 2) Baele M, et al. (2001) The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. J Appl Microbiol, 91: 997-1003.
- 3) Clinical and Laboratory Standard Institution Guidelines (M100-S25) (2015) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement, CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- 4) Clinical and Laboratory Standard Institution Guidelines (VET01-S2) (2013) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement, CLSI, Wayne, Pennsylvania.
- 5) Dong WL, et al. (2017) Aminoglycoside resistance of *Trueperella pyogenes* isolated from pigs in China. J Vet Med Sci, 79: 1836-1839.
- 6) Hariharan H, et al. (1992) An investigation of bacterial causes of arthritis in slaughter hogs. J Vet Diagn Invest, 4: 28-30.
- 7) 平井卓哉 (2013) 感染病理. 日本獣医病理学会編 動物病理学総論. 第3版, p255, 文永堂出版, 東京.
- 8) Indrawattana N, et al. (2018) *Staphylococcus argenteus* from rabbits in Thailand. MicrobiologyOpen, 8: e00665. Doi: 10. 1002/mbo3.665.
- 9) Jost BH, et al. (2002) Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. Vet Res Commun, 26: 419-425.
- 10) Liljegren CH, et al. (2003) Some new aspects of the pathology, pathogenesis, and aetiology of disseminated lung lesions in slaughter pigs. APMIS, 111: 531-538.
- 11) Martínez J, et al. (2007) Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. Vet J, 174: 160-164.

- 12) Nagib S, et al. (2017) Fatal infection in three Grey Slender Lorises (*Loris lydekkerianus nordicus*) caused by clonally related *Trueperella pyogenes*. BMC Vet Res, 13: 273.
- 13) Ohba T, et al. (2007) Hemorrhagic necrotizing splenitis in a slaughter pig infected with *Arcanobacterium* species. J Vet Med Sci, 69: 449-453.
- 14) O' Sullivan T, et al. (2011) Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. Can J Vet Res, 75: 106-111.
- 15) Riseti RM, et al. (2017) Virulence markers associated with *Trueperella pyogenes* infections in livestock and companion animals. Lett Appl Microbiol, 65: 125-132.
- 16) Rzewuska M, et al. (2016) Relationships between antimicrobial resistance, distribution of virulence factor genes and the origin of *Trueperella pyogenes* isolated from domestic animals and European bison (*Bison bonasus*). Microb Pathog, 96: 35-41.
- 17) Santos TM, et al. (2010) Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. Vet Microbiol, 145: 84-89.
- 18) Ülbegi-Mohyla H, et al. (2010) Identification of *Arcanobacterium pyogenes* isolated by post mortem examinations of a bearded dragon and a gecko by phenotypic and genotypic properties. J Vet Sci, 11: 265-267.
- 19) Wessman GE (1986) Biology of the group E streptococci: a review. Vet Microbiol, 12: 297-328.
- 20) Wickhorst JP, et al. (2018) *Trueperella pyogenes* isolated from a brain abscess of an adult roebuck (*Capreolus capreolus*). Folia Microbiol (Praha), 63: 17-22.
- 21) Yoon SH, et al. (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. Int J Syst vol Microbiol, 67: 1613-1617.
- 22) Yoshimura H, et al. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 47: 139-143.