

原著論文

豚の *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) 血清型 2 の関与が示唆される
縦隔の多発性肉芽腫性リンパ節炎井上諒子¹⁾、中島芳恵¹⁾、松尾保雄¹⁾、山口智洋¹⁾、芝原友幸^{2,3)}¹⁾長崎県諫早食肉衛生検査所、²⁾農研機構・動物衛生研究部門 病態研究領域、³⁾大阪府大・大学院・生命環境科学研究科)

Inoue, R., Nakashima, Y., Matsuo, Y., Yamaguchi, T. and Shibahara, T. (2022).

Multiple granulomatous lymphadenitis of the mediastinum associated
with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the pig.*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 80, 17-21.

Abstract

Multiple granulomatous lymphadenitis was detected in the mediastinum of slaughtered pig aged 6 months. Macroscopically, the mass was encapsulated, milky white, solid, and partially ocher. Histologically, granulomatous inflammation was observed, occasional the asteroid bodies with Gram-negative bacilli was also observed. The Gram-negative bacilli tested positive for anti-*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) serotype 2 antibody in immunohistochemical tests. In the farm, porcine pleuropneumonia had occurred in the past and pneumonia with the App was occasionally confirmed in a slaughterhouse test before this pig brought to the farm. These data indicate that App serotype 2 would be associated with multiple granulomatous lymphadenitis of the pig.

Key word: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, meat inspection, pig, granulomatous lymphadenitis

要約

と畜場に搬入された約 6 カ月齢の肥育豚において、解体検査時に縦隔に腫瘍が認められた。腫瘍は、肉眼的に、被嚢化された乳白色充実性で、部分的に黄土色を呈していた。組織学的に、グラム陰性桿菌を伴ったアステロイド体を形成する、多発性肉芽腫性リンパ節炎を認めた。当該桿菌は、免疫組織化学的検査によって、抗 *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) 血清型 2 抗体に陽性反応を示した。発生農場において、過去に豚胸膜肺炎が発生していた。また、本症例の導入前

に搬入された肥育豚において、と畜検査で豚胸膜肺炎が高率に認められていた。これらの結果から、特徴的な組織所見を示した豚の肉芽腫性炎に、App 血清型 2 が関与している可能性が高いと考えられた。

キーワード：*Actinobacillus pleuropneumoniae*、と畜検査、豚、肉芽腫性リンパ節炎

【はじめに】

Actinobacillus pleuropneumoniae (App) は、パスツレラ科、アクチノバシラス属の細菌で、豚に線維索性胸膜肺炎を主徴とする豚胸膜肺炎を起こす⁹⁾。App は、球桿状を呈するグラム陰性の小桿菌であり、V- 因子 NAD の要求性により 1 型と 2 型の 2 つの生物型に分けられる⁹⁾。生物型 1 による疾病が問題となることが多く、本菌は 1～19 の血清型に型別される⁷⁾。国内では血清型 2 が多く、次いで血清型 1 と血清型 5 が多く分離されている²⁾。App に汚染された豚群では、不顕性感染豚が数多く存在しキャリアとなる。不顕性感染豚は、ストレスや他の病原体の感染が引き金となり発病する場合や、発病しないまま感染源となり、一度汚染された農場の清浄化を妨げる要因となるため、疫学上重要である⁹⁾。と畜場搬入豚における App が原因の病変は、豚胸膜肺炎以外にも報告があり、そのうち、肉芽腫を形成する病変としては、肉芽腫性肺炎^{4,5)}、肉芽腫性肝炎⁵⁾、肉芽腫性リンパ節炎⁶⁾の報告があるが、その報告数は限られている。また、肉芽腫を形成した原因菌は、いずれも App 血清型 2 と同定されている^{4,6)}。今回、長崎県内のと畜場に搬入された肥育豚に、縦隔の白色腫瘍が認められた。と畜検査では、縦隔に腫瘍

やリンパ節の腫大が認められ、豚の白血病や非定型抗酸菌症が疑われた場合は、と体を保留し精密検査を行う¹⁰⁾。本症例について、精密検査を実施したところ、App 血清型 2 の関与が示唆される縦隔の多発性肉芽腫性リンパ節炎が認められたので概要を報告する。

【発生状況】

2021年4月、長崎県内のと畜場に搬入された約6カ月齢の肥育豚のうち、去勢雄1頭に、解体後検査で、縦隔に白色腫瘍を認めた。本症例は、縦隔型の豚リンパ性白血病を疑い保留となった。なお、本症例は、解体前検査において異常は認められず、健康畜として解体された。

【材料及び方法】

＜病理組織学的検査＞

腫瘍部、主要臓器（心臓、肝臓、脾臓、腎臓）及びリンパ節（内腸骨、浅頸、腎門）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3 μ m）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3 μ m）について、抗 App 血清型 1、2 及び 5 a ウサギポリクローナル抗体を一次抗体として用いた免疫染色を実施した^{3,6)}。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）で各々 512、4,096、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。陽性対照として App 血清型 1、2、5 a、5 b 及び 7 抗原を含むパラフィンプロックを用いた。

＜分子生物学的検査＞

腫瘍部のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックからの抽出 DNA について、App 血清型 1、2、5、7、15、*omlA* 遺伝子¹⁾ 及び *A. porcitonsillarum* 遺伝

子特異的 PCR⁸⁾ を実施した。FFPE からの DNA 抽出は、DEX PAT（Takara Bio, Shiga, Japan）を用いて行った。

＜疫学調査＞

当該農場の過去の豚胸膜肺炎の発生状況及び App の分離歴、App ワクチンの使用状況、飼養形態について、管轄家畜保健衛生所へ聞き取り調査を行った。また、長崎県の食肉検査システムに記録された検査成績から、当該農場の豚胸膜肺炎の発生率を求めた。食肉検査システムには、肺葉に充出血や肝変化が認められたものを「豚胸膜肺炎出血型」、膿瘍や肉芽腫の形成による結節性の病変が認められたものを「豚胸膜肺炎膿瘍型」として入力し、出血型と膿瘍型の合計を「豚胸膜肺炎」として算した。

【結果】

＜肉眼所見＞

解体後の内臓検査において、縦隔部に直径5～15cm大の腫瘍が連なるように認められた（図1）。腫瘍は硬結感があり、被嚢化されていた（図2）。断面は、乳白色充実性、平滑で光沢があり、部分的に黄土色を呈していた（図3）。肺には胸膜炎が認められたが、肺門リンパ節に著変はなかった。脾臓はやや腫大していた。その他の臓器及びリンパ節に著変は認められなかった。

＜病理組織学的所見＞

腫瘍の辺縁には、残存するリンパ組織が認められた（図4）。腫瘍は、リンパ球、形質細胞、好中球、マクロファージが巣状に浸潤し、その周囲を線維芽細胞が取り囲むように増殖する肉芽腫性炎が主体を成していた（図5-a）。ランゲハンス型巨細胞や好酸球の浸潤もみられた（図6）。ところどころにスプレンドール・ヘップリ現象によるアステロイド体が形成され、その中央にはしばしば菌塊が認められた（図5-a）。菌塊は、グラム染色でグラム陰性桿菌が認められた（図5-b）。その他の臓器について、特記すべき所見は認められなかった。

＜免疫組織化学的所見＞

アステロイド体の中央に認められたグラム陰性桿菌に一致して、抗 App 血清型 2 抗体に対する陽性反応のみが認められた（図5-c）。

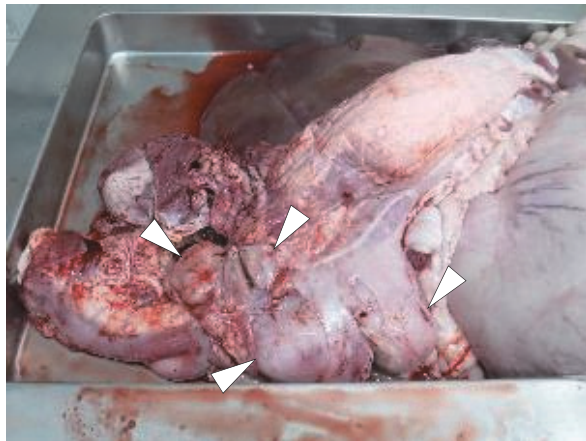


図1 解体後の内臓。縦隔部に直径5～15cm大の白色腫瘍（矢頭）が複数個認められる。



図2 白色腫瘍の断面。乳白色充実性、平滑で光沢がある。硬結感があり、被囊化される。



図3 白色腫瘍のホルマリン固定後の断面。部分的に黄土色を呈する。

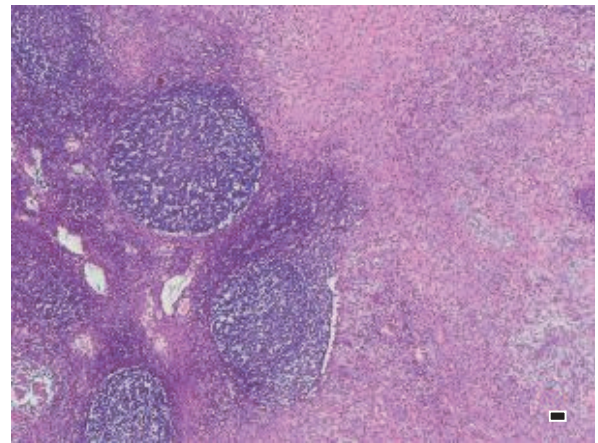


図4 腫瘍。辺縁に、残存するリンパ組織が認められる。HE 染色。（Bar = 50 μ m）

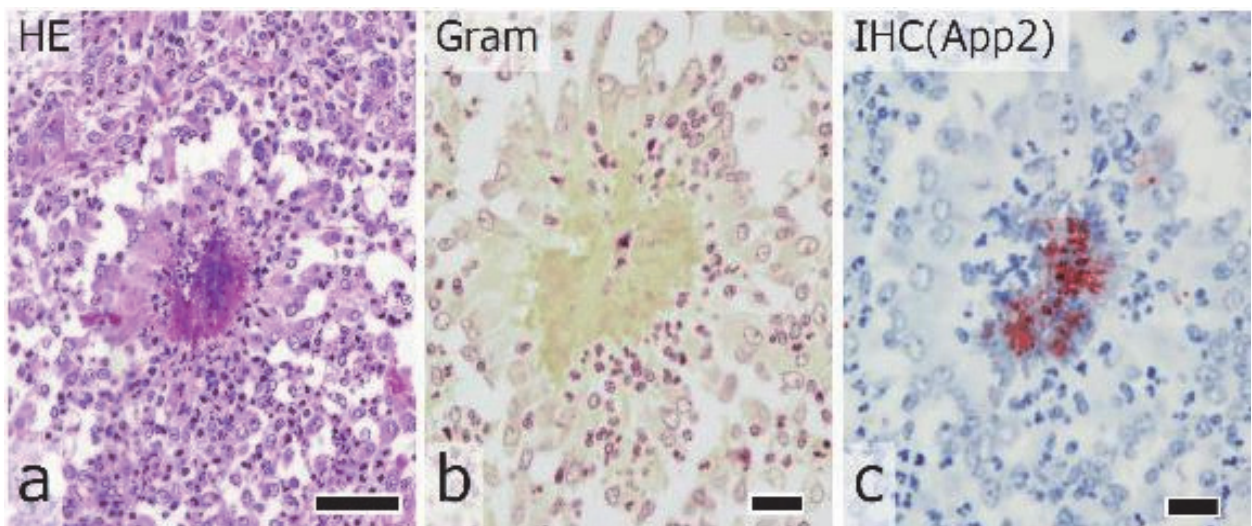


図5 -a 腫瘍。アステロイド体を伴う肉芽腫性炎がみられる。HE 染色。（Bar = 50 μ m）

図5 -b aと同視野。グラム陰性桿菌がアステロイド体の中央にみられる。グラム染色。（Bar = 20 μ m）

図5 -c aと同視野。グラム陰性桿菌は抗 App 血清型 2 抗体に陽性を示す。免疫染色。（Bar = 20 μ m）

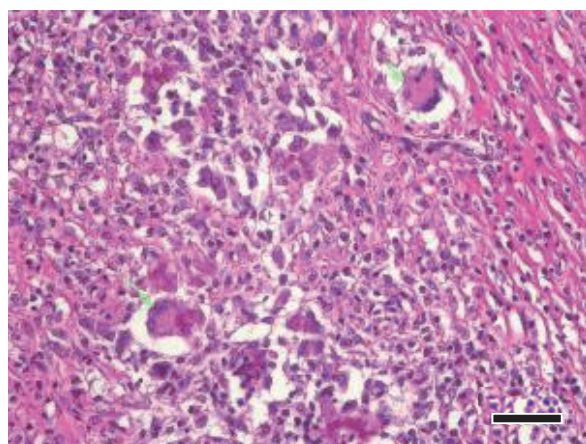


図6 腫瘍。ラングハンス型巨細胞や好酸球の浸潤がみられる。HE 染色。(Bar = 50 μ m)

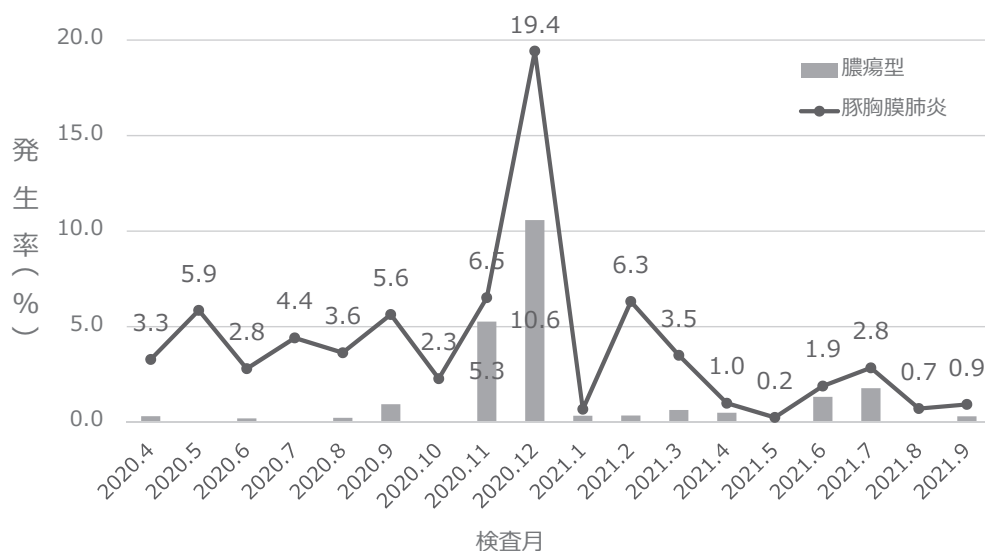


図7 当該農場における、2020年4月から2021年9月の豚胸膜肺炎の発生状況を発生率で示した。

<分子生物学的検査>

腫瘍部の FFPE ブロックからの抽出 DNA を用いた App 血清型 1、2、5、7、15、*omlA* 遺伝子及び *A. porcitoncillarum* 遺伝子特異的 PCR において、増幅産物は確認できなかった。

<疫学調査結果>

当該農場は肥育農場で、子豚を90日齢で導入していた。当該農場では、App ワクチンは使用されておらず、2010年1月、2012年11月、2013年3月及び9月に豚胸膜肺炎が発生しており、App が分離されたが、型別は実施されていなかった。2020年4月から2021年9月のと畜検査では、豚胸膜肺炎の発生率が2020年11月までは2.3～6.5%で推移していたが、12月には19.4%に増加していた。そのうち、膿瘍型の発生率は、11月5.3%、

12月10.6%であった(図7)。本症例がと畜されたのは2021年4月上旬で、その月の豚胸膜肺炎の発生率は1.0%であった(図7)。

【考察】

以上の結果から、腫瘍を App 血清型 2 の関与が示唆される縦隔の多発性肉芽腫性リンパ節炎と診断した。発生部位は、位置関係から、気管気管支リンパ節や後縦隔リンパ節と考えた。リンパ節における App 血清型 2 が関与する肉芽腫性炎については、Ohba らが2010年に初めて報告しているが⁶⁾、その他の報告は見当たらない。Ohba らの報告によると、151,653頭のと畜場搬入豚を調査したところ、6頭の去勢雄に App 血清型 2 による肉芽腫性リンパ節炎が認められている。これらのリンパ節は直径 2～8 cm に腫大し、被囊化さ

れており、断面には黄白色の病巣がみられた。病理組織学的に、腫大リンパ節には、多数の好中球、好酸球、類上皮細胞、異物型巨細胞及び膠原線維で構成される肉芽腫が形成され、菌塊周囲にはアステロイド体がみられた。アステロイド体の中央には、免疫組織化学的に App 抗原の分布が確認された。著者らが経験した本症例は、去勢雄であること、肉眼所見、組織所見及び免疫組織化学的所見が、Ohba らの報告と合致していた。生材料が入手できなかったことから、FFPE ブロックを材料に PCR を行ったが、App 特異遺伝子は検出されなかった。検出されなかった理由としては、1) 抽出された App の DNA 量が少なかった、2) ホルマリン固定の過程で DNA が断片化した、3) 増幅する遺伝子サイズが大きかった、4) App ではない可能性の 4 つが考えられた。4 つ目について、Ohba らは³⁾、App と溶血性と生化学的性状が類似する *Actinobacillus porcitosillarum* が、肉芽腫性リンパ節炎を誘発する可能性があること、免疫組織化学染色で App 血清型 2 及び 12 と交差性があることを報告している。しかし、その後、著者らは免疫組織化学染色の条件を検討し、今回実施した条件で抗 App 血清型 2 は App 血清型 2 に特異的に反応し、App 血清型 1、5 a、5 b、6、7、11、12、15、*A. porcitosillarum*、*A. minor* 及び *A. suis* には反応しないことを明らかにしている⁶⁾。また、*A. porcitosillarum* 遺伝子特異的 PCR において、増幅産物が確認されなかったことから、原因菌が *A. porcitosillarum* である可能性は低いと考えられた。更に、本症例は、2021 年 1 月上旬に肥育農場へ導入され、その少し前である 2020 年 11～12 月に、豚胸膜肺炎の慢性感染豚が多数認められたことから、キャリアーとなった不顕性感染豚から App に感染した⁹⁾と推察される。また、当該農場で過去に App が分離されていることから、App 血清型 2 に起因した、縦隔の多発性肉芽腫性リンパ節炎である可能性が高いと考えられた。

【謝辞】

本症例の免疫組織化学的検索にご協力いただいた千葉県中央家畜保健衛生所島田果歩先生、福島県中央家畜保健衛生所 岩永海空也先生、疫学調査にご協力いただいた、長崎県諫早食肉衛生検査所国見支所及び長崎県南家畜保健衛生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、ご助言いただいた岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科の酒井洋樹教授に感謝いたします。

【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) Ito H, et al. (2015) Development of a multiplex polymerase chain reaction method for *cps* typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 2, 5, 7, and 15. Jpn Agric Res Q, 49: 277-280.
- 2) 伊藤博哉 (2021) *Actinobacillus pleuropneumoniae* の生物型および血清型について－アップデート 2021－, 北獣会誌, 65 : 149-156.
- 3) Ohba T, et al. (2007) Granulomatous lymphadenitis and pneumonia associated with *Actinobacillus porcitosillarum* in a slaughter pig. J Comp Pathol, 137: 82-86.
- 4) Ohba T, et al. (2009) Prevalence of granulomatous pleuropneumonia associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter pigs. J Vet Med Sci, 71: 1089-1092.
- 5) 大場剛実ら (2009) と畜場搬入豚の *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2 型による多発性肉芽腫肝炎. 豚病会報, 54 : 2-7.
- 6) Ohba T, et al. (2010) Granulomatous lymphadenitis associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter barrows. Can Vet J, 51: 733-737.
- 7) Stringer OW, et al. (2021) Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars. Vet. Microbiol, 255: 109021.
- 8) Tonpitak W, et al. (2007) Prevalence of “*Actinobacillus porcitosillarum*” in porcine tonsils and development of a diagnosis duplex PCR differentiating between “*Actinobacillus porcitosillarum*” and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet Microbiol, 122: 157-165.
- 9) 山本孝史 (1999) 豚胸膜肺炎. 山本孝史ら編 豚病学 第 4 版, p362-367, 近代出版, 東京.
- 10) 全国食肉衛生検査所協議会 (2011) と畜検査. 全国食肉衛生検査所協議会編 新・食肉衛生検査マニュアル, p12-75, 中央法規出版, 東京.