

発育不良豚における病原微生物感染の実態解明

秦 英司、小林秀樹、江口正志、吉井雅晃、宮崎綾子、池田秀利、
久保正法、播谷 亮、山本孝史（動物衛生研究所）

Hata, E., Kobayashi, H., Eguchi, M., Yoshii, M., Miyazaki, A., Ikeda, H., Kubo, M., Haritani, M.,
Yamamoto, K. (2003). Screening for pathogenic microorganisms in retarded growing piglets.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc., 43, 12-17.

1. はじめに

発育不良豚の多くは呼吸器病が原因であり、育成および肥育期における呼吸器病は経済的損失を招く最も大きな要因である。

近年、北米を中心に発育遅延、飼料効率の低下、食欲不振、発熱、発咳、また呼吸困難を主な症状とした呼吸器病に対して豚呼吸器病症候群（porcine respiratory disease complex, PRDC）という言葉が使われ始めた。本症候群の特徴は複数種の肺炎起因微生物が混合感染していること、肺炎病巣の病理所見と分離微生物との関係が明瞭でないことである（別項参照）。

一般に豚の肺炎起因微生物として細菌では *Mycoplasma hyopneumoniae*、*Actinobacillus pleuropneumoniae*、ウイルスでは豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV）、豚インフルエンザウイルス（swine influenza virus, SIV）等があり、これらに二次感染する最も重要なものとして *Pasteurella multocida* が挙げられる。

我が国における PRDC の実態を解明するには関与する微生物を総合的に明らかにすることが必要であるが、今回、関東地方を中心に発育不良に関与する病原微生物の調査を実施したので、その成績を紹介する。

2. 材料および方法

2002年4月～2003年1月にかけて4県13農場から収集した89頭の発育不良豚を供試した（表1）。

肺表面積に対する肺炎表面積の占める割合によりA～Dにレベル分けを行った。肺炎表面積が0～5%のものをレベルA、5～20%のものをレベルB、20～50%のものをレベルC、50%以上のものをレベルDとした。

細菌検査は主要臓器および病変部について行った。一般細菌検査として2%新鮮イーストエキス添加5%馬血液寒天培地（馬血寒培地）、ストレプトコッカス選択寒天培地、マッコンキー寒天培地を用いスタンプ培

表1 供試された発育不良豚

県	農場	採材日	検体数(頭)	週齢
茨城	A	2002. 4. 5	8	4-13
千葉	B	2002. 5. 14	8	6-7
千葉	C	2002. 6. 7	5	4-10
千葉	D	2002. 7. 8	3	6-10
千葉	E	2002. 7. 8	3	5-6
千葉	F	2002. 7. 8	7	5-9
群馬	G	2002. 10. 1	10	4-14
千葉	H	2002. 10. 3	10	4-14
愛知	I	2002. 10. 10	9	4-14
愛知	J	2002. 10. 10	8	4-14
千葉	K	2002. 12. 11	6	8
千葉	L	2003. 1. 9	6	8-12
千葉	M	2003. 1. 21	6	11-12

養（37℃、24～48時間、5%CO₂培養、マッコンキー寒天培地は好気培養）を行った。併せて、グラム染色したスタンプ標本を鏡検した。材料1gあたりおおむね10⁵cfu以上のコロニーを形成したものを有意菌種とみなし、馬血寒培地で純培養した。分離菌株はコロニー観察、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験等の一次鑑別試験の後、Cowan and Steel's医学細菌同定の手引きに基づき同定した。サルモネラ感染を疑う材料についてはハーナテトラチオン培地、ラポポート培地で増菌（37℃、22時間、好気培養）後マッコンキー寒天培地で培養（37℃、24時間、好気培養）し、サルモネラを疑うコロニーを馬血寒培地で純培養し同定した後、血清型別を行った。

マイコプラズマ検査はムチン寒天培地にスタンプ培養（37℃、3～5日、5%CO₂培養）し、コロニー観察後、ムチンプロスで純培養を行った。分離菌株の同定は *Mycoplasma hyorhinis* PCR、代謝阻止試験により行った。また同時にPBSによる10%肺乳剤を作成し、proteinase K処理後PCRにより *M. hyopneumoniae*、*M. hyorhinis* の感染を確認した(1)。

PRRSV、豚サーコウイルス2型（porcine circovirus type2、PCV2）の検査材料として、肺および扁桃を

用いた。検査方法は10%肺、扁桃乳剤を Eagle-MEM+2%NaHCO₃+FCS+ 抗生物質溶液で作製し DNA 抽出 (QIAamp DNA Mini Kit : QIAGEN)、または RNA 抽出 (High Pure Viral RNA Kit : Roche) を行った。PRRSV 遺伝子の検出には、抽出した RNA から random primer を用い cDNA を合成し (ReverTra Ace- α -Kit : TOYOBO)、これを鋳型として既報の primer を用いた PCR 法 (High Fidelity PCR Master Kit : Roche) を行った(2)。PCV2 遺伝子の検出には U1273 5'-AGAAGGGTTGGGGGATTGTATG-3'、L1602 5'-GGAGACGGAAAAATGGCATCTT-3' の両 primer を用いた PCR 法 (High Fidelity PCR Master Kit : Roche) で、PCR 反応条件は94℃ 10min、(94℃ 30sec, 55℃ 30sec, 72℃ 30sec) 40cycle、72℃ 10min で行った (恒光ら 未発表)。

分離菌株の薬剤感受性は日本化学療法学会法に基づき寒天平板希釈法により測定した。薬剤は Cloxacillin (CX)、Ampicillin (ABPC)、Oxacillin (MIPIC)、Cefazolin (CEZ)、Cephapirin (CEPR)、Ceftiofur (CTF)、Dihydrostreptomycin (DSM)、Kanamycin (KM)、Gentamicin (GM)、Erythromycin (EM)、Tylosin (TS)、Tiamulin (TML)、Lincomycin (LCM)、Tetracycline (TC)、Oxytetracycline (OTC)、Chlortetracycline (CTC)、Nalidixic acid (NA)、Enrofloxacin (ERFX)、Thiamphenicol (TP)、Novobiocin (NB)、Bacitracin (BC) を供試した。*M. hyorhinis* 分離株の薬剤感受性は Kobayashi ら (1996) の報告に基づき行った(4)。薬剤は Josamycin (JM)、TS、Spiramycin (SPM)、TML、LCM、OTC、KM、ERFX、TP を供試した。薬剤感受性試験の結果は MIC₉₀が25 μ g/ml 未満の薬剤を効果期待大とし、MIC₉₀が25 μ g/ml 以上で MIC₅₀が25 μ g/ml 未満の薬剤を効果期待中とし、MIC₅₀が25 μ g/ml 以上の薬剤を効果期待小とした。

3. 結果

1) 剖検所見

胸腔臓器の高度癒着、膿瘍形成、心外膜炎と心嚢水の貯留が多く、供試豚で見られた(写真1～3)。腹腔では臓器の線維素付着以外多くの供試豚で著変は認められなかった(写真4)。また、関節の腫大が見られる供試豚もあった。

2) 肺炎表面積レベル

3ヶ月齢未満の供試豚では肺炎表面積レベルがレベルAに区分されたものは14頭 (22.6%)、レベルBは15

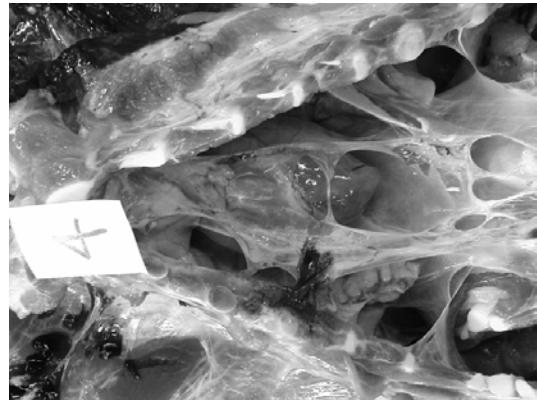


写真1 胸腔臓器の癒着



写真2 心外膜炎と心嚢水の貯留

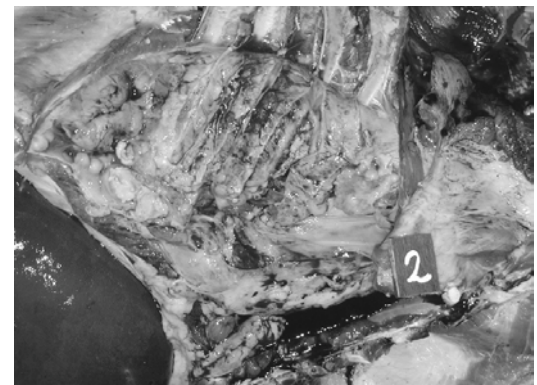
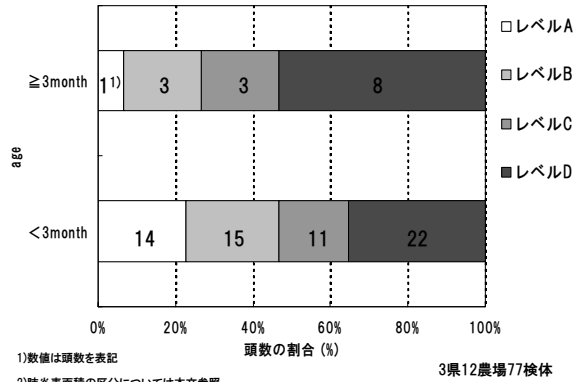


写真3 胸腔臓器の癒着と膿瘍形成



写真4 腹腔臓器の線維素付着

図1 肺炎表面積レベル²⁾の割合

頭 (24.2%)、レベルCは11頭 (17.7%)、レベルDは22頭 (35.5%) であった。3ヶ月齢以上の供試豚では肺炎表面積レベルAは1頭 (6.6%)、レベルBは3頭 (20.0%)、レベルCは3頭 (20.0%)、レベルDは8頭 (53.3%) であった (図1)。発育不良豚の肺炎表面積に占める肺炎部分の面積の割合は3ヶ月齢未満の供試豚が3ヶ月齢未満の供試豚に比べて明らかに大きかった。

3) 分離・検出微生物

肺材料より *Streptococcus spp.* が8農場18頭から、*P. multocida* が7農場14頭から、*Arcanobacterium pyogenes* が5農場11頭から、*Escherichia coli* が5農場9頭から分離された。また *Streptococcus suis*、*Salmonella Choleraesuis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Bordetella bronchiseptica*、*Aeromonas hydrophila*、*Bergeyella zoohelcum*、*Haemophilus parasuis* がそれぞれ数農場から分離された (表2)。

表2 農場別肺由来一般細菌・分離頭数

農場	検査頭数	<i>P. multocida</i>	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>S. suis</i>	<i>A. pyogenes</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>B. zoohelcum</i>	<i>H. parasuis</i>
A	8	1 ¹⁾			2		4					
B	8	1		3								
C	5		2	2		2		2				
D	3											
E	3					1						
F	7		1	2								
G	10	1		1		3						
H	10	4	4	1								
I	9	2		2					1			
J	8	3	1	3	2	1				2		
K	6		1								1	
L	6			4					1			3
M	6	2				4						
Total	89	14	9	18	4	11	4	2	2	2	1	3

1) 頭数

肺材料より *M. hyorhinis* が全農場54頭 (58.4%) から分離された。また、肺乳剤のPCR検査による陽性頭数は *M. hyorhinis* が9農場39頭 (54.9%)、*M. hyopneumoniae* が4農場15頭 (21.1%)、PRRSV が全検査農場29頭 (58.0%)、PCV2 が全検査農場48頭 (96.0%) であった (表3)。

4県6農場由来50供試豚について PRRSV PCR を

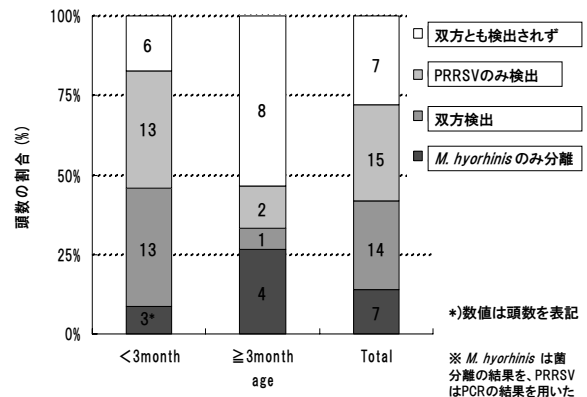
表3 農場別肺由来マイコプラズマ、PRRSV、PCV2 検査結果

農場	検査頭数	マイコプラズマ分離頭数		肺乳剤のPCR陽性頭数			
		<i>M. hyr</i> ¹⁾	<i>M. arg</i>	<i>M. hyr</i>	<i>M. hyp</i>	PRRSV	PCV2
A	8	7	0	7	2	NT ²⁾	NT
B	8	7	0	8	0	8	7
C	5	1	0	1	0	3	4
D	3	3	0	3	0	NT	NT
E	3	3	0	3	0	NT	NT
F	7	7	0	7	0	NT	NT
G	10	4	0	3	5	4	10
H	10	3	0	5	4	2	10
I	9	4	0	2	4	5	9
J	8	2	1	0	0	7	8
K	6	3	0	NT	NT	NT	NT
L	6	4	0	NT	NT	NT	NT
M	6	6	0	NT	NT	NT	NT
Total	89	54	1	39	15	29	48
(%)		58.4%	1.1%	54.9%	21.1%	58.0%	96.0%

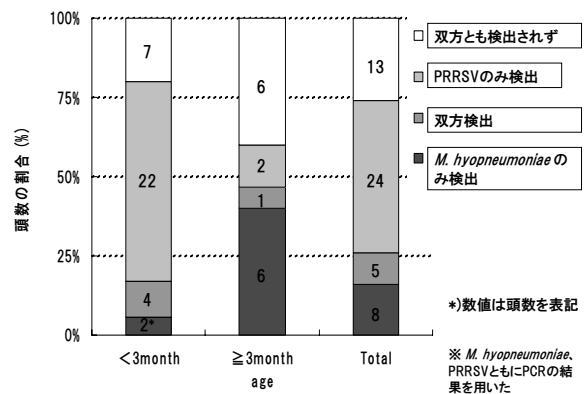
1) *M. hyr*: *M. hyorhinis*, *M. hyp*: *M. hyopneumoniae*, *M. arg*: *M. argini*

2) Not tested

行った。3ヶ月齢未満の26頭 (74.3%)、3ヶ月齢以上の3頭 (20.0%) が陽性であった。また、3ヶ月齢未満の13頭 (37.1%) は *M. hyorhinis* が分離され、同時に PRRSV PCR 陽性であった (図2)。

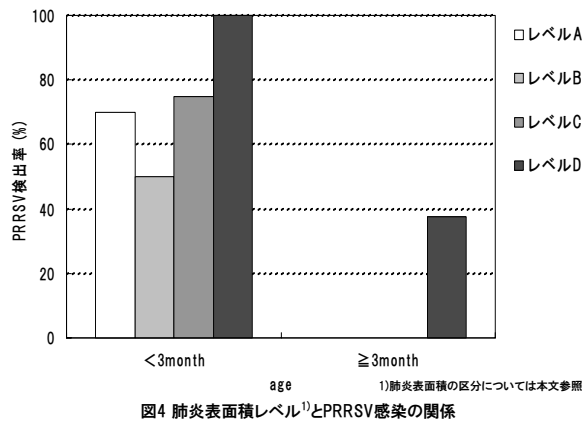
図2 *M. hyorhinis* 感染とPRRSV感染の関係

3県6農場由来50供試豚について、*M. hyopneumoniae* PCR を行った。3ヶ月齢以上の7頭 (46.7%)、3ヶ月齢未満の6頭 (17.1%) が陽性であった。PRRSV との混合感染は3ヶ月齢未満では4頭 (12.5%)、3ヶ月齢以上では1頭 (6.7%) であった (図3)。

図3 *M. hyopneumoniae* 感染とPRRSV感染の関係

4) 肺炎表面積と分離・検出微生物

3 県 6 農場由来50供試豚において、3 ヶ月齢未満の供試豚では肺炎表面積レベル A の供試豚のうち PRRSV PCR 陽性のは70.0%、レベルBは50.0%、レベルCは75.0%、レベルDは100.0%であった。3 ヶ月齢以上の供試豚において、レベルA～Cの供試豚で PRRSV PCR 陽性のは0%、レベルDでは37.5%であった(図4)。



3 県12農場由来77供試豚において、3 ヶ月齢未満の供試豚では肺炎表面積レベルAの供試豚のうち *M. hy-*

orhinis が分離されたものは7.1%、レベルBの供試豚では66.7%、レベルCの供試豚では90.9%、レベルDの供試豚では77.3%であった。3 ヶ月齢以上の供試豚においてレベルAの供試豚で *M. hyorhinis* が分離されたものは0%、レベルBの供試豚では33.3%、レベルCの供試豚では33.3%、レベルDの供試豚では37.5%であった。全ての供試豚においてレベルAの供試豚で *M. hyorhinis* が分離されたものは6.7%、レベルBの供試豚では61.1%、レベルCの供試豚では78.6%、レベルDの供試豚では66.6%であった(図5)。

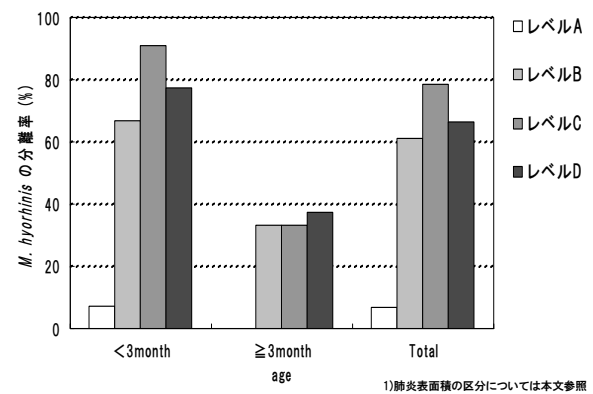


表4 農場別肺由来一般細菌・分離頭数

菌種	菌株数	農場数	効果期待*		
			大	中	小
<i>P. multocida</i>	11	6	CX ABPC MIPIC CEZ CEPR CTF GM EM TS TC OTC CTC NB TP NA ERFX	DSM KM TML LCM	BC
<i>Streptococcus</i> spp.	11	7	CX ABPC MIPIC CEZ CEPR CTF GM BC NB TP ERFX	KM TML LCM	DSM EM TS LCM TC OTC CTC NA
<i>S. suis</i>	4	2	CX ABPC MIPIC CEZ CEPR GM BC NB TP ERFX	CTF	DSM EM TS LCM TC OTC CTC KM TML LCM NA
<i>A. pyogenes</i>	3	4	CX ABPC MIPIC CEZ CEPR CTF KM GM TML BC NB TP	DSM TC OTC CTC	NA
<i>H. parasuis</i>	2	1	ABPC NA CEPR CP ERFX		OTC KM
<i>M. hyorhinis</i>	72	18	ERFX TP OTC TML	KM	TS JM SPM LCM
<i>E. coli</i>	8	4	CEZ CTF ERFX GM	CEPR	CX ABPC MIPIC DSM KM EM TS TML LCM TC OTC CTC BC NB TP NA
<i>S. Choleraesuis</i>	3	1	CEZ CEPR CTF ERFX GM		CX ABPC MIPIC DSM KM EM TS TML LCM TC OTC CTC BC NB TP NA
<i>P. aeruginosa</i>	2	1	GM EM TS TML LCM ERFX		CX ABPC MIPIC CEZ CEPR CTF DSM KM TC OTC CTC BC NB
<i>B. bronchiseptica</i>	1	1	NB NA ERFX		CX ABPC MIPIC CEZ CEPR CTF GM DSM KM EM TS TML LCM TC OTC CTC BC TP

*) 薬剤効果期待の区分については本文参照

5) 薬剤感受性

P. multocida、*Streptococcus spp.*、*S. suis*、*A. pyogenes*、および *H. parasuis* に対して多くの薬剤が効果期待大であった。*M. hyorhinis* に対しては ERFX、TP、OTC、TML が効果期待大であったが、KM が効果期待中、TS、JM、KTM、LCM は効果期待小であった。*E. coli*、*S. Choleraesuis*、*P. aeruginosa*、*B. bronchiseptica* に対しては ERFX の効果期待は大であったものの、多くの薬剤では効果期待小であった (表 4)。

4. 考察

肺材料から *P. multocida*、*Streptococcus spp.*、*A. pyogenes*、*E. coli* が多くの農場由来の供試豚から分離された。これらの細菌が養豚農場に広く蔓延し発育不良豚の肺炎に関係していることが示唆された。

M. hyorhinis は全ての農場で分離され、4 農場では全ての供試豚から分離された。また、PCV2 ならびに PRDC の最も重要な原因微生物とされている PRRSV も、検査した全ての農場から陽性のものが検出された。PRRSV は 3 ヶ月齢未満の 74.3% で検出され 3 ヶ月齢以上の 20.0% と比較してもその割合は大きく、PRRSV の感染と感染の持続には月齢が深く関係のあることが示唆された。また、3 ヶ月齢未満の 37.1% で *M. hyorhinis* が分離され、同時に PRRSV も検出されており、これら二つの微生物の混合感染は若齢豚で特に多かった。また、離乳後多臓器性発育不良症候群 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) に深く関与しているとされる PCV2 が 96.0% とほとんどの供試豚で PCR 陽性であった。Harms ら (2002) は、米国において PCV2 が PRDC の病因として関与していると考えられる野外例 3 例について報告している。しかし、PCV2 の蔓延率の極めて高い我が国において、PCV2 が PRDC にどのように関わっているかに関してはさらに検討が必要である (7)。

M. hyopneumoniae は 3 ヶ月齢以上供試豚で多く検出され、*M. hyopneumoniae* 感染は月齢と関わりが深いことが示唆された。PRRSV は他の細菌あるいはウイルスと相互に影響しあい呼吸器病の病態を複雑にしていると言われている。*M. hyopneumoniae* と PRRSV の混合感染では PRRSV 単独感染に比べて臨床症状、肉眼病変、組織病変の重篤化、持続化が報告されている (3)。しかし、今回の供試豚に *M. hyopneumoniae* と PRRSV の混合感染はあまり認められなかった。

3 ヶ月齢以上の供試豚では肺炎表面積が広いもので

ないと PRRSV が検出されなかった。一方、3 ヶ月齢未満の供試豚では肺炎表面積の広さに関わらず PRRSV が高率に検出された。これらの結果から 3 ヶ月齢未満の発育不良豚では肺炎病変の有無にかかわらず PRRSV の検査が必要であると思われる。

正常な肺の *M. hyorhinis* 分離率は低かった。しかしながら、肺炎病変の見られるものではその分離率は 60% 以上と高く、肺炎病変の見られる供試豚ではマイコプラズマの分離を試みる必要があると考えられる。

多くの農場由来肺材料から分離された *P. multocida*、*Streptococcus spp.*、*A. pyogenes* に対しては β -ラクタム系薬剤、セフェム系薬剤、NB、TP、ERFX が効果期待大の薬剤であった。第一次選択剤として ERFX 以外の前記薬剤が使用可能と考えられる。ERFX は有効であるが第一選択剤としては用いないほうが賢明と考える。マイコプラズマに有効な薬剤として知られていたマクロライド系薬剤、KM、LCM は *M. hyorhinis* に対してあまり効果が期待できないことが推測された。また、供試菌株数が少ないという問題点はあるが *E. coli*、*S. Choleraesuis*、*P. aeruginosa*、*B. bronchiseptica* は、多くの薬剤に対して耐性化が進んでいる可能性が示唆された。

5. 終わりに

今回の調査研究において離乳、育成そして肥育のいずれのステージの供試豚にも広く呼吸器病が見出され、これらの多くから複数の病原微生物が分離・検出された。とりわけ 3 ヶ月齢未満供試豚において PRRSV が、また年齢に関係なく *M. hyorhinis*、PCV2 が分離・検出された。これらの微生物が日本における PRDC の主たる原因微生物であることが推測された。しかし、*M. hyorhinis* と PCV2 の肺炎起病性についてははっきりしておらず、更なる研究・解明が期待される。

調査協力者一覧

石本明宏：滋賀県家畜保健衛生所

伊藤博哉：動物衛生研究所 九州支所 臨床細菌研究室長

遠藤貴之：山形県置賜家畜保健衛生所

大橋誠一：動物衛生研究所 九州支所 臨床ウイルス研究室

岡田綾子：鳥取県溝口家畜保健衛生所

尾川寅太：福岡県中央家畜保健衛生所

小木曾正和：愛知県東三河家畜保健衛生所

勝田 賢：動物衛生研究所 七戸研究施設 環境衛生
研究室

川嶋健司：動物衛生研究所 七戸研究施設 環境衛生
研究室

佐藤真澄：動物衛生研究所 九州支所 臨床病理研究
室長

沢崎裕是：愛知県東三河家畜保健衛生所

田中省吾：動物衛生研究所 九州支所 臨床病理研究
室

津田知幸：動物衛生研究所 九州支所 臨床ウイルス
研究室長

恒光 裕：動物衛生研究所 七戸研究施設 環境衛生
研究室長

中井 泉：徳島県徳島家畜保健衛生所

松本 恵：愛知県西三河家畜保健衛生所

渡辺一夫：(株)ピグレッツ

(五十音順、2003年1月現在)

参考文献

1. Kobayashi, H. et.al. 1996. Mycoplasma hyorhinis Infection Levels in Lungs of Piglets with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome(PRRS). J. Vet. Med. Sci.58(2):109-113.
2. Kono, Y. et.al. 1996. Nested PCR for Detection and Typing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome(PRRS) Virus in Pigs. J. Vet. Med. Sci.58(10):941-946.
3. 山本孝史. 2001. 豚呼吸器複合感染症とその対策. 家畜診療. 48(7):411-425.
4. Kobayashi, H. et.al. 1996. Macrolide Susceptibility of Mycoplasma hyorhinis Isolated from Piglets. Antimicrob. Agents Chemother.40(4):1030-1032.
5. Thacker, E. L. 2001. Porcine Respiratory Disease Complex-What is it and why does it remain a problem? Pig J.48:66-70.
6. Done, S. H. 2002. Member's papers Porcine Respiratory Disease Complex(PRDC). Pig J.50:174-196.
7. Harms, P. A. et.al. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. J. Swine Health Prod.10(1):27-30.