

と畜場搬入豚の *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2 型による多発性肉芽腫肝炎

大場剛実<sup>1)</sup>, 芝原友幸<sup>2)</sup>, 小林秀樹<sup>2)</sup>, 高島阿里子<sup>1)</sup>, 名越雅高<sup>1)</sup>, 長内利佳<sup>3)</sup>, 久保正法<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>富山県食肉検査所 <sup>2)</sup>動物衛生研究所 <sup>3)</sup>宮城県仙台家畜保健衛生所)

Ohba, T., Shibahara, T., Kobayashi, H., Takashima, A., Nagishi, M., Osanai, R. and Kubo, M. (2009).

Multifocal granulomatous hepatitis caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter pigs.

*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 54, 2-7.

## 1. はじめに

*Actinobacillus pleuropneumoniae* は *Pasteurellaceae* 科に属する通性嫌気性、芽胞無形成性、非好酸性、グラム陰性桿菌である<sup>20)</sup>。*A. pleuropneumoniae* は伝染性が高く、しばしば致死性の豚胸膜肺炎を引き起こすことから、本疾患は養豚産業における経済的損失の原因となっている<sup>8)</sup>。本疾患は全ての年齢の豚に発症し、壊死性、出血性気管支肺炎と漿液線維素性胸膜炎を特徴とする<sup>7, 14, 15)</sup>。他の部位の病変は非常に稀であるが、滲出性髄膜炎と腎炎<sup>12)</sup>、壊死性骨髄炎と線維素性化膿性関節炎<sup>10)</sup>、心内膜炎、線維素性心外膜炎<sup>6)</sup>、化膿性関節炎と腱滑膜炎<sup>5)</sup>の報告がある。

本菌は、呼吸器上皮、扁桃、被胞化した肺の嫌気下の環境に存在することができる<sup>3, 22)</sup>。と畜搬入豚では、*A. pleuropneumoniae* は、すべて胸部の病変から検出されている<sup>2, 6, 14, 16)</sup>。

著者 (T. Ohba および T. Shibahara, 未発表) は、2005年9月と11月に、2頭のと畜場搬入豚に多発性肉芽腫性肝炎を見出した。細菌分離は行われなかったが、その病変は牛の *Actinobacillus lignieresii*<sup>21)</sup>、豚の *Actinobacillus porcitosillarum*<sup>18)</sup> による病変を連想させるものであった。そこで、と畜場搬入豚における多発性肝炎と *Actinobacillus* 属菌を含む病原細菌との関連を明らかにするため、著者は、66,894頭の豚を調査して11頭が *Actinobacillus* 属菌に関連した肝炎を発症していたことを明らかにした。これらの症例の病理学的所見と菌の分離について詳述する。

## 2. 材料および方法

## 動物

2006年10月31日から2007年6月13日(8カ月半)の間、富山県内の食肉処理場の処理ラインで、42農場由来の66,894頭の豚を肉眼的に検査した。このうち、10農場(A1, A2, B, C, D, E, F, G, H, I)由来の19頭の肝臓に多発性白色小結節がみられた。これらの

19頭の豚(症例1-19)について、病理組織学および細菌学的検索を実施した。

## 組織学および免疫組織化学的検索

死後、30分以内に肝臓、肺、脾臓、心臓、腎臓とリンパ節(肝門、縦隔、下顎、浅頸、そけい、膝窩、腸骨下、腸間膜、内腸骨)を採取した。それらは10%リン酸緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィンに包埋した。組織切片(厚さ3 $\mu$ m)について、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、グラム染色を行った。

ストレプトアビジン・ビオチン-アルカリホスファターゼキット(Histofine SAB-POキット;ニチレイ、東京)を用いた免疫組織化学染色を実施した。一次抗体には、抗*A. pleuropneumoniae*血清2型ウサギポリクローナル抗体<sup>1)</sup>を用いた。切片は、ヘマトキシリンで対比染色し、顕微鏡下で観察した。陰性コントロールには、一次抗体として正常ヤギ血清またはPBSを用いた染色を行った。

## 細菌学的検索

肝臓、肺、脾臓、心臓、腎臓、リンパ節(肝門、縦隔、下顎、浅頸、そけい、膝窩、腸骨下、腸間膜、内腸骨)について、チョコレート寒天培地およびV因子添加馬血液(5%)寒天培地を用いて、好気培養および嫌気培養(5%CO<sub>2</sub>ガス)を37 $^{\circ}$ C 48時間行った。分離株の生化学的特徴は、ID-テスト-HN-20Rapid(日本製薬、東京)、API20A(bioMerieux、東京)、API Staph(bioMerieux)、APICoryne(bioMerieux)、API20Strep(bioMerieux)、API20E(bioMerieux)とAPI NH(bioMerieux)を用いて判定した。*A. pleuropneumoniae*を同定するために、protective outer membrane lipoprotein(*omlA*)をコードしている遺伝子の有無について、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用いて調べた<sup>19)</sup>。さらに、血清型については、*A. pleuropneumoniae*の1から12の血清型に対するウサギ免疫血清を用い、スライド

表1 多発性肉芽腫性肝臓病変および豚胸膜肺炎の検出状況

農場	検査頭数	肉芽腫性肝臓病変の検出頭数 (%)	豚胸膜肺炎の検出頭数 (%)
A1*	3,718	8 (0.22)	1,043 (28.05)
A2*	5,871	2 (0.03)	1,495 (25.46)
B*	415	1 (0.24)	8 (1.93)
合計	10,004	11 (0.11)	2,546(25.45)

42農場由来 66 894 頭中,多発性肝臓病変(n=19)を検出した10農場 (A1, A2, B-I)のうち、農場 A1, A2, B は, *A. pleuropneumoniae* に関連した肝臓病変 (n=11)

表2 肉眼所見

症例 no.	農場	性別	剖検年月日	肉眼的病変					
				肝臓	肺	脾臓	心臓	腎臓	リンパ節
1	A1	♂	2006年11月15日	+	+	-	-	-	-
2	A1	♂	2006年11月15日	+	-	-	-	+	+ (胃肝門リンパ節)
3	A1	♂	2006年12月 6日	+	+	-	-	+	-
4	A1	♀	2006年12月20日	+	+	-	-	-	+ (胃肝門リンパ節)
5	A1	♀	2007年 4月18日	+	-	-	-	-	-
6	A1	♂	2007年 4月23日	+	-	-	-	-	-
7	A1	♂	2007年 4月27日	+	+	-	-	-	-
8	A1	♂	2007年 4月28日	+	+	-	-	+	+ (胃肝門リンパ節)
9	A2	♂	2007年 3月 8日	+	+	-	-	+	-
10	A2	♂	2007年 3月16日	+	+	+	-	+	+ (胃肝門リンパ節)
11	B	♂	2006年10月31日	+	-	-	-	-	-

-, Negative; +, Positive;

凝集テストにて判定したり。

### 3. 結果

#### 臨床所見

病理組織学的に肉芽腫性病変を認めた3農場 (A1, A2, B) における同病変と豚胸膜肺炎を有する豚の頭数を表1に示した。A1およびA2農場の豚胸膜肺炎の検出率 (28.05%および25.46%) は、他の8農場 (C-I) の0.83~14.96%よりかなり高かった。肝臓病変を呈した11頭のうち、8頭 (症例1-8)、2頭 (症例9および10)、1頭 (症例11) は、それぞれA1, A2, B農場から出荷されていた。また、多数の子豚がA1農場からA2農場に導入されていた。A1, A2およびB農場では子豚は、*A. pleuropneumoniae* の予防接種をしていなかったが、呼吸器系の病気の徴候を示した豚は、すぐに抗生物質で治療されていた。

#### 肉眼病変

白色結節 (図1) が、肝臓の実質のいたるところに、不規則に広がり、それらのいくつかは、多少の出血を伴っていた。本病変は豚回虫の感染による間質性肝炎

(“milk spots”) の病変よりも、小さく丸かった。寄生虫は、いずれの豚にも観察されなかった。

11頭中7頭 (症例1, 3, 4, 7-10) にみられた胸膜肺炎は、*A. pleuropneumoniae* による胸膜肺炎と類似していた (表2)。症例10の脾臓の横隔膜表面には暗赤色の出血巣がみられた (図2)。症例2, 4, 8, 10では胃肝門リンパ節が、腫脹していた。



図1 肝臓 (症例4)。出血を伴う多発性小白色病巣。スケール, cm



図2 脾臓(症例10)。横断面の脾頭部の出血巣(矢印)。スケール, cm。

#### 組織学および免疫組織化学的検索結果

アステロイド小体を伴う肉芽腫は、症例1-11の肝臓、症例4, 7, 9の肺、症例8の腸間膜リンパ節にみられ、アステロイドの中央部に *A. pleuropneumoniae* 抗原を検出した(表3)。免疫組織化学的に *A. pleuropneumoniae*

抗原陽性の化膿性病変が、症例1, 3, 8, 10の肺、症例10の脾臓でみつかった。

*A. pleuropneumoniae* 抗原陽性の肝臓病変は、化膿性から肉芽腫性の多発性炎症であった。肉芽腫は好中球、好酸球、類上皮細胞、異物巨細胞、膠原線維から構成され、それらはアステロイド小体の周囲に集積し、アステロイド内にグラム陰性無芽胞性桿菌がみられるものもあった(図3a)。この細菌は *A. pleuropneumoniae* 抗原陽性であった(図3b)。

3例(症例4, 7, 9)の肺の組織所見は肝臓のそれと類似し(図4a)、大量の *A. pleuropneumoniae* 抗原がアステロイド小体の中心で検出された(図4b)。症例1, 3, 8, 10の肺において、*A. pleuropneumoniae* 抗原を含む化膿性病変を認めたが、アステロイド小体はみられなかった。しかし、症例8の腸間膜リンパ節では、*A. pleuropneumoniae* 抗原と共にアステロイド小体を伴う肉芽腫病変がみられた。症例10の脾臓病変は、好中球浸潤と壊死巣から成り、肉芽腫とアステロイド小体

表3 病理組織学所見および免疫組織化学的所見

症例 no.	肝臓	肺	脾臓	心臓	腎臓	リンパ節
1	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	化膿性炎/+	-/-	-/-	-/-	-/-
2	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	ND	ND	ND	ND	-/-
3	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	化膿性炎/+	-/-	ND	-/-	-/-
4	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	-/-	ND	ND	-/-
5	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	ND	ND	ND	ND	ND
6	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	ND	ND	ND	ND	ND
7	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	ND	ND	ND	-/-
8	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	化膿性炎/+	ND	ND	-/-	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+ (腸間膜リンパ節)
9	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	-/-	ND	-/-	-/-
10	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	化膿性炎/+	化膿性炎/+	-/-	-/-	-/-
11	アステロイド小体を伴う肉芽腫性炎/+	ND	ND	ND	ND	-/-

病変/*A. pleuropneumoniae* 抗原

-, Negative; +, Positive; ND, not done

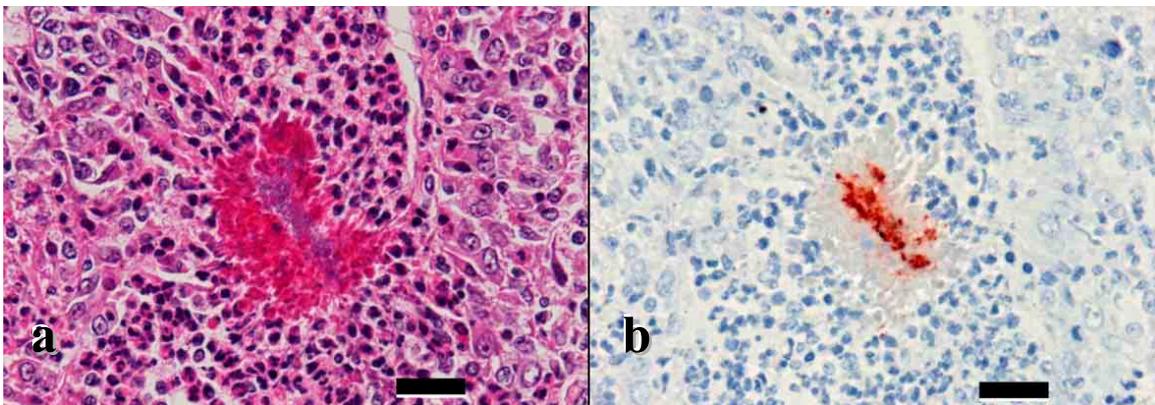


図3 肝臓(症例8), (a, b)。

- (a) 肉芽腫性病変における好酸性のアステロイド小体。アステロイド小体の中央には多数の細菌が、周囲には好中球、好酸球、類上皮細胞がみられた。HE染色。Bar, 25  $\mu$ m。  
 (b) (a)の細菌に一致して *A. pleuropneumoniae* 2型が陽性である。免疫組織化学染色。Bar, 25  $\mu$ m。

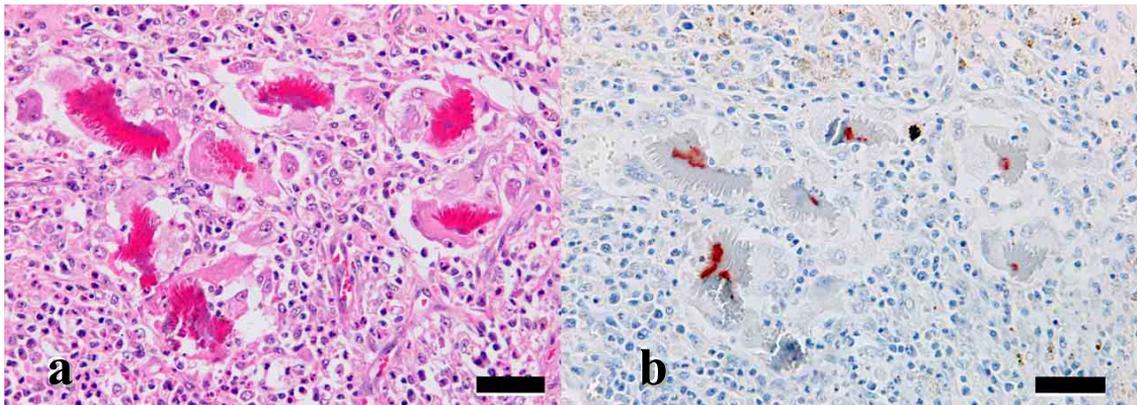


図4 肺 (症例9), (a, b)。

(a) 肉芽腫病変における多数のアステロイド小体。HE 染色。Bar, 50 μm。

(b) アステロイド小体内の菌塊は, *A. pleuropneumoniae* 2型陽性。免疫組織化学染色。Bar, 50 μm。

はみられなかった。この病変部にグラム陰性桿菌が広く認められ, *A. pleuropneumoniae* 2型のポリクローナル抗体と明らかに反応した。その他の臓器には, 病変や病原体はみられなかった。

A1, A2, B農場由来の症例1から11とは別に, 他の農場 (C-I) 由来の8例にも肝臓病変がみられた。これらの肝臓病変は上記11症例のものとは異なり, 小葉間好酸球浸潤 (6例) または巣状壊死 (2例) によ

って特徴づけられた。

*A. pleuropneumoniae* の分離

*A. pleuropneumoniae* は, 肝臓 (症例2, 4, 5, 8-11), 脾臓 (症例10), 肺 (症例1, 3, 4, 7-10) から分離された (表4)。すべての分離株は, スライド凝集テストで, *A. pleuropneumoniae* 2型に対してのみ強く反応した。

表4 *Actinobacillus pleuropneumoniae* およびその他の細菌の分離

症例 no.	肝臓	肺	脾臓	心臓	腎臓	リンパ節
1	-	App 2	<i>Staphylococcus</i> spp. uGPB	<i>Staphylococcus</i> spp. uGPG	-	- (胃肝門及び腸間膜リンパ節)
2	App 2	ND	-	ND	ND	<i>Staphylococcus</i> spp. (胃肝門リンパ節) - (腸間膜リンパ節)
3	-	App 2	-	ND	-	ND
4	App 2 <i>Streptococcus</i> spp. uGNB	App 2	<i>Streptococcus</i> spp.	ND	-	- (胃肝門リンパ節)
5	App 2	ND	ND	ND	ND	ND
6	-	ND	ND	ND	ND	ND
7	-	App 2	ND	ND	ND	ND
8	App 2	App 2	ND	ND	-	ND
9	App 2 <i>Staphylococcus</i> spp.	App 2 <i>E. coli</i> <i>Streptococcus</i> spp.	-	<i>E. coli</i> <i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. uGPB	<i>Streptococcus</i> spp.	ND
10	App2 <i>Streptococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp.	App 2	App 2 uGNC	-	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp. (胃肝門, 腸間膜リンパ節) <i>Staphylococcus</i> spp. (腸間膜リンパ節) <i>Micrococcus</i> spp. (腸骨下リンパ節) uGPC (腸間膜, 浅頸リンパ節) uGNC (浅頸, 膝窩 腸間膜リンパ節)
11	App 2 <i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND

-, Negative; ND, not done  
\* - = Negative; ND = not done  
App 2; *A. pleuropneumoniae* 2型  
uGPB = グラム陽性桿菌 (未同定)  
uGNB = グラム陰性桿菌 (未同定)  
uGNC = グラム陰性球菌 (未同定)

また、*Streptococcus* spp. が肝臓（症例4, 10）、肺（症例9）、脾臓（症例4）、心臓と腎臓（症例9）、胃肝門リンパ節と腸間膜リンパ節（症例10）から、*Staphylococcus* spp. が、肝臓（症例9, 10）、脾臓と心臓（症例1）、心臓（症例9）、腎臓（症例10）、胃肝門リンパ節（症例2）、腸間膜リンパ節（症例10）から、および *Escherichia coli* が肝臓（症例11）、肺と心臓（症例9）から分離された（表4）。A1, A2, B農場由来の11症例とは別の他の農場（C-I）由来の8例の肝臓からは、細菌は分離されなかった。

#### 4. 考察

本研究における11頭の豚の調査結果から、*A. pleuropneumoniae* 2型感染は肝臓に肉芽腫性病変を生じることが示された。扁桃<sup>23)</sup>および肺<sup>3)</sup>における *A. pleuropneumoniae* の長期生存に関する報告に加え、今回の調査結果では、肝臓でも *A. pleuropneumoniae* が長期生存する可能性が示された。さらに、リンパ節と脾臓にも、感染することもわかった。

肝臓の病変は慢性的な肉芽腫であり、急性の化膿性病変や豚回虫<sup>13)</sup>感染による間質性肝炎（“milk spots”）とも異なっていた。*A. pleuropneumoniae* による胸腔領域以外の臓器の病理学的変化は、わずかに報告されているだけである。髄膜炎と腎炎<sup>12)</sup>、骨髄炎と関節炎<sup>10, 11, 17)</sup>、心膜炎<sup>6)</sup>、中耳炎<sup>9)</sup>の報告がある。これらは化膿性病変で若い豚（約10週齢）でみられ<sup>9-12)</sup>、*A. pleuropneumoniae* 2型<sup>6, 10)</sup>、3型<sup>5, 17)</sup>、6型<sup>6)</sup>の感染でおこる。*A. pleuropneumoniae* 3型を実験的に感染した1頭の豚では、化膿性関節炎と髄滑膜炎がみられた<sup>5)</sup>。近年、と畜場搬入豚における肉芽腫性リンパ節炎と肺炎の一部が、*A. porcitonissillarum* に関連していることが明らかになった<sup>18)</sup>。今回の肝臓の組織学的所見は、*A. porcitonissillarum* に感染した豚のリンパ節と肺の病変の所見と非常によく類似していた。今回の肝臓の *A. pleuropneumoniae* 罹患豚11頭は、3農場（A1, A2; B）から出荷されていた。農場 A1 から農場 A2 に多数の子豚が導入されていたことから、感染の拡大はおそらく A1 から A2 への感染豚の導入によるものと考えられた。

この報告の要点は、これまで豚胸膜肺炎の原因と考えられていた *A. pleuropneumoniae* が、多発性肉芽腫肝炎を引き起こすことである。

なお、本研究の一部は、「Multifocal granulomatous hepatitis caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter pigs.」(J. Comp. Pathol., 2008 ;

139: 61-6.) にて公表した。

#### 5. 要約

66,894頭のと畜場搬入豚を調べたところ、*A. pleuropneumoniae* 2型に起因した肝臓の多発性肉芽腫が3農場から搬入された11頭に検出された。肝臓の病変は、中央部にグラム陰性細菌塊を有するアステロイド小体とその周囲の類上皮細胞、多核巨細胞からなっていた。リンパ節と脾臓にも、同様の病変がみられた。また、肺にも同様の病変あるいは化膿性病変をみとめ、その一部に *A. pleuropneumoniae* 2型が検出された。

これらの結果より、これらの多発性肉芽腫性肝炎は、先在する肺の *A. pleuropneumoniae* 2型感染病変から、播種して発生したことが示唆された。

#### 6. 謝辞

本研究をまとめるにあたり、情報の収集と解析にご協力いただいた埼玉県中央家畜保健衛生所 油井武先生、静岡県中部家畜保健衛生所 和久田高志先生、新潟県中越家畜保健衛生所 村山修吾先生に深謝いたします。また、病理組織標本の作製にご協力いただいた動物衛生研究所 小林勝先生、動物衛生研究所 嶋田恵美先生、写真作製にご協力いただいた動物衛生研究所 藤沢敏夫先生に深謝いたします。最後に研究の遂行上ご協力を賜った富山県食肉検査所ならびに富山県東部および西部家畜衛生保健所のスタッフの皆様から感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) Asawa, T. et al. (1995) Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from piglets with pleuropneumonia. J. Vet. Med. Sci., 57: 757-759.
- 2) Baarsch, M. et al. (2000) Pathophysiologic correlates of acute porcine pleuropneumonia. Am. J. Vet. Res., 61: 684-690.
- 3) Baltes, N. et al. (2005) Deletion of the anaerobic regulator HlyX causes reduced colonization and persistence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine respiratory tract. Infect. Immun., 73: 4614-4619.
- 4) Bosse, J. T. et al. (2002) *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. Microbes. Infect., 4: 225-235.

- 5) Brandreth, S. R. and Smith, I. M. (1987) Comparative virulence of some English strains of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotypes 2 and 3 in the pig. Res. Vet. Sci., 42: 187-193.
- 6) Buttenschon, J. et al. (1997) Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. Zentralbl. Veterinarmed. A., 44: 271-280.
- 7) Cho, W. S. and Chae, C. (2004) Expression of nitric oxide synthase 2 and cyclooxygenase-2 in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Pathol., 41: 666-672.
- 8) Chung, J. W. et al. (2007) Outer membrane proteome of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: LC-MS/MS analyses validate in silico predictions. Proteomics., 7: 1854-1865.
- 9) Duff, J. P. et al. (1996) Otitis in a weaned pig: a new pathological role for *Actinobacillus Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet. Rec., 139: 561-563.
- 10) Jensen, T. et al. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae* osteomyelitis in pigs demonstrated by fluorescent in situ hybridization. Vet. Pathol., 36: 258-261.
- 11) Kaige, N. et al. (1983) Posterior paralysis in pigs due to *Haemophilus pleuropneumoniae* infection. Nippon. Juigaku. zasshi., 45: 251-254.
- 12) Madsen, L. W. et al. (2001) *Actinobacillus pleuropneumoniae* demonstrated in situ in exudative meningitis and nephritis. Vet. Rec., 149: 746-747.
- 13) Nakagawa, M. et al. (1983) Pathological studies on white spots of the liver in fattening pigs. Natl. Inst. Anim. Health. Q., 23: 138-149.
- 14) Narita, M. et al. (1995) Effect of physical defenses of the respiratory tract on the development of pneumonia in pigs inoculated endobronchially with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Vet. Med. Sci., 57: 839-844.
- 15) Narita, M. et al. (1997) Immunohistopathological characterization of pig pneumonia caused by a combined Aujeszky's disease virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. J. Comp. Pathol., 117: 25-33.
- 16) Nicolet, J. (1988) Taxonomy and serological identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. Vet. J., 29: 578-580.
- 17) Nicolet, J. and Konig, H. (1966) On haemophilus-pleuropneumonia in swine. Bacteriologic, patho-anatomic and histological findings. Preliminary report. Pathol Microbiol., 29: 301-306.
- 18) Ohba, T. et al. (2007) Granulomatous lymphadenitis and pneumonia associated with *Actinobacillus porcitonisillarum* in a slaughter pig. J. Comp. Pathol., 137: 82-86.
- 19) Osaki, M. et al. (1997) Genetic diversity of the genes encoding the outer membrane lipoprotein (omlA) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Vet. Med. Sci., 59: 213-215.
- 20) Pohl, S. et al. (1983) Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bacteriol., 33: 510-514.
- 21) Rycroft, A. N. and Garside, L. H. (2000) *Actinobacillus* species and their role in animal disease. Vet. J., 159: 18-36.
- 22) Sheehan, B. et al. (2003) Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* genes important for survival during infection in its natural host. Infect. Immun., 71: 3960-3970.
- 23) Tonpitak, W. et al. (2007) Prevalence of "*Actinobacillus porcitonisillarum*" in porcine tonsils and development of a diagnosis duplex PCR differentiating between "*Actinobacillus porcitonisillarum*" and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Microbiol., 122: 157-165.