

## 8 Allele 特異的 PCR 法による牛伝染性鼻気管炎ウイルス鼻粘膜ワクチン株 簡易識別法の検討

中部家畜保健衛生所  
○斉藤 妙子

### 要 約

日本初の鼻腔内投与型ワクチンとして、牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV)、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス及び牛 RS ウイルス含有牛呼吸器病生ワクチンが発売され注目されている。しかし生ワクチンであるため、発症牛からの分離ウイルスがワクチン株か野外株かを識別することが防疫上で重要である。特に IBR は届出伝染病で、病性鑑定 (病鑑) 時には迅速且つ正確な判断が求められる。本ワクチンに含まれる IBRV 株 (経鼻 V 株) 及び野外株の識別法として IBRV ゲノム全長の制限酵素切断パターン (RFLP) について昨年度報告したが、今回、簡便に識別できる方法として一塩基変異を検出可能な Allele 特異的 PCR 法 (ASPCR 法) を用いた識別を試みた。

IBRV 株は、LA 株、国内標準株の No. 758、国内注射ワクチン (注射 V) 株 No. 758-43、経鼻 V 株、過去の病鑑において呼吸器症状を呈する本ワクチン接種牛から分離された 3 株、過去県内で分離された野外株 2 株の計 9 株を用いた。経鼻 V 株の特徴として全塩基配列中 58793 番目の塩基がアデニン (A) からチミン (T) に変異しているという既報を元に、これら 9 株の Intergenic 領域 (58075-59035 番目) 約 960bp の PCR 産物の増幅された塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。次にこの T/A-allele を識別できるように、T 及び A に対応した各 allele 特異的プライマーを作成し、両者がそれぞれ特異的に検出できる最適な PCR 条件 (アニーリング温度) を検討した。

シーケンスの結果、58793 番目の塩基は、経鼻 V 株及び本ワクチン接種牛から分離された株 3 株は T、それ以外の LA 株、No. 758 株、注射 V 株、過去県内で分離された野外株 2 株は全て A であった。また他の配列は全て同一であったが T/A-allele の次の塩基 (58794 番目) が他の株は A であるのに対し、LA 株は G と A が混在していた。このため、allele 特異的プライマーは相補鎖側に設計し、LA 株にも対応できるよう 58794 番目に相当する塩基には A/G の相補即ち T/C のミックス塩基を使用したところ、全ての供試株の T/A-allele を識別できた。なお、PCR 反応におけるアニーリング温度は 62°C が最適であり、結果判明までの所要時間は約 2 時間であった。

令和元年度に報告した RFLP 法は IBRV ゲノム全長を得るために細胞培養が必要で、結果判明まで最短でも 1 週間程度時間を要するが、本法は迅速・簡便に識別ができるため、スクリーニング的に使用することが有用であると考えられた。

### はじめに

ワクチンの種類は大きくわけて生ワクチンと不活化ワクチンがあるが、生ワクチンは液性免疫だけでなく、細胞性免疫も誘導するため、ウイルス病に特に有効である [9]。

牛呼吸器病ワクチンには、従来から、注射タイプの生ワクチン (注射 V) が発売されていたが、2014 年 8 月、新しいタイプのワクチンとして牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV)

及び牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス (PIV3) 含有の国内初の鼻腔内投与型ワクチン (経鼻 V) が発売された。経鼻 V は、妊娠牛や移行抗体を保有する子牛にも投与可能で、注射 V と比べ、早期に鼻粘膜免疫を誘導できること、また接種方法が簡便であること、さらに令和 2 年度から、牛呼吸器病原因として最も多い牛 RS ウイルス含有の 3 種混合も発売されたことから、現場での注目が高まり使用

が増加している。

生ワクチンはウイルス病に対して有用である反面、ワクチン接種した発症牛から分離されたウイルスが、ワクチン株か野外株かの識別が防疫対応上重要となる。特に、経鼻Vに含まれるIBRは届出伝染病に指定されているため、迅速な対応が必要で、またヘルペスウイルスの性質上、潜伏感染するため、一度感染すると生涯体内に存在し、再活性化するとウイルスを排出するため[2]、診断にはワクチン株かどうかの見極めが非常に重要となる。しかしながら、経鼻Vには遺伝学的に識別可能なマーカーが無く、野外株との識別ができないのが現状であった。そこで、経鼻V株及び野外株の識別方法としてIBRVゲノム全長の制限酵素切断パターン(RFLP)について令和元年度の静岡県家畜保健衛生業績発表会で報告[6]したが、RFLPは、正確性は高い一方で結果判明まで時間を要するため、今回、迅速・簡便な方法として、一塩基変異を検出するallele特異的PCR法(ASPCR法)を用いた識別を検討した。

#### ASPCR法とは

ASPCRはallele specific PCRの略で、1989年に4人の研究者がほぼ同時に報告[4]、[5]、[7]、[10]し、各々が独立して命名したことから、ARMS法、ASA法、PASA法、ASPCR法、等複数の名前が用いられているが、本稿ではASPCR法を用いる。

本法は、既知の病因となる小変異や1塩基置換型遺伝子多型を調べるのに極めて有用な方法で、簡便で再現性があり、経済的な方法として、医療分野等で繁用されている。

各alleleに対しマッチしたプライマーで確実にPCR産物が増え、ミスマッチプライマーではPCR産物ができないようにしなければならないため、特異性及び正確性の高いプライマーを設計することと、非特異反応が見られない反応条件を検討することが検査系を確立するのに非常に重要になる[3]。ASPCR法に用いるプライマーの設計方法は、プライマーの3'末端塩基にミスマッチがあるとPCR産物ができにくい性質を利用するため、PCRの一方のプライマーの3'末端を標的DNAの変異部位に合わせるように設計し、変異塩基に併せたallele特異プライマーを2種類設計

する。すなわち、フォワードプライマーの1つは3'末端が正常塩基とマッチするもの(正常プライマーA)と、もう一つは変異塩基とマッチしているもの(変異プライマーB)となる。なお、リバースプライマー(C)は共通のものとする。このプライマーセットを用いて、正常プライマーAでPCR産物ができれば、検体は正常塩基配列を有しており、逆に変異プライマーBでPCR産物ができれば検体は変異塩基配列を有していることになる(図1)。

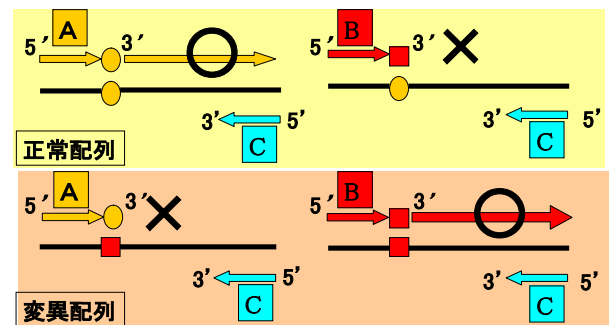


図1 ASPCR法の原理とプライマー設計

#### 試験に供したIBRV株

IBRV株は、LA株、国内標準株のNo.758、国内注射V株のNo.758-43、経鼻V株、病性鑑定(以下病鑑)において、呼吸器症状を呈する経鼻V接種牛から分離された株3株、過去県内で分離された野外株2株、の計9株について調査した(表1)。

表1 調査に用いたIBRV株

株名	備考
LA	BHV-1.1亜型(呼吸器型)標準株
No.758	国内標準株
注射V	国内注射ワクチン株No.758-43
経鼻V	国内鼻腔内投与Vワクチン株
分離1~3	経鼻ワクチン接種牛からの分離株
野外1	平成23年(2011年)県内分離株
野外2	令和元年(2019年)県内分離株

#### IBRV遺伝子配列シーケンス解析

経鼻V株の特徴として、全塩基配列中58793番目の塩基が他の株はアデニン(A)であるのに対し、チミン(T)に変化しているという報告[1]があるため、この変異を確認すべくシーケンス解析を実施した。

方法は、High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche) を用いてゲノム抽出を行った後、プライマーペア (NVL-UL27F/NVL-UL26R) [1] 及び PCR 酵素は KOD Fx Neo (東洋紡) を用いて PCR を実施、Intergenic 領域 (58075-59035 番目) 約 960bp について増幅を行った。得られた PCR 産物は Labpass PCR (COSMO Genetech) を用いて精製し、増幅された遺伝子断片の遺伝子配列をダイレクトシーケンス法 (北海道システムサイエンスに依頼) により決定した。続いて解析ソフト MEGA5 Ver. 5.10 [8] により塩基配列の比較解析を行った。

シーケンス解析の結果、既報 [1] の通り、58793 番目の塩基が経鼻 V 株及び経鼻ワクチン接種牛由来の分離株 1~3 のみ T に変化しており、他の株は A であった。アミノ酸レベルでは、終止コドンであったものが、ロイシンに変化していた (表 2)。そのため、この塩基の違いを識別する allele 特異的プライマーの作成を試みた。

また、識別したい allele の次の塩基が他株は A であるのに対し、LA 株のみ A とグアニン (G) が混在していた。なお他の配列は全ての株で同一であった。

表 2 IBRV ゲノム遺伝子配列  
塩基 (位置)

株名	(58793)	(58794)	アミノ酸
経鼻 V	T	A	ロイシン
分離 1~3	T	A	ロイシン
LA	A	A/G	-
No. 758	A	A	-
注射 V	A	A	-
野外 1	A	A	-
野外 2	A	A	-

### ASPCR 法用のプライマーの設計

シーケンス解析の結果から、LA 株は識別したい塩基 (58793 番目) の次の塩基 (58794 番目) が A と G が混在しており、allele 特異的プライマーを正鎖に設計すると 3' 末端が異なり LA 株が検出できなくなってしまうため、LA 株も検出できるように相補鎖側に設計した (図 2)。加えて 3' 末端から 3 番目をシトシン (C) と T の混合塩基をいれた。

また、PCR 反応には、3' エクソヌクレアーゼ活性を持つ PCR 酵素を用いたため、型別したい塩基の位置をプライマーの 3' 末端から 2 番目に来るように設計した。

さらに型別能をより増強させる目的で、すなわちミスマッチの場合でより強く伸長反応を抑制するように 3' 末端から 4 番目に無関係な変異を追加でいれた。

**allele 周辺配列**

経鼻 V 株	5'	GTGTTAACATCCTCGACTTGCCGGCCAG	3'
相補鎖	3'	CACAATTGTAGGAGCTGAACGGCCGGTC	5'
LA 株	5'	GTGTTAACATCCTCGACTTGCCGGCCAG	3'
相補鎖	3'	CACAATTGTAGGAGCTGAACGGCCGGTC	5'
	5'	GTGTAGACATCCTCGACTTGCCGGCCAG	3'
相補鎖	3'	CACATGTTAGGAGCTGAACGGCCGGTC	5'
他株	5'	GTGTTAACATCCTCGACTTGCCGGCCAG	3'
相補鎖	3'	CACAATTGTAGGAGCTGAACGGCCGGTC	5'

**LA 株は正鎖では 3' 末端が異なる (A、G)  
allele 特異的プライマーは相補鎖に設計**

図 2 各 IBRV 株の T/A-allele 周辺配列

作成したプライマー配列は (表 3) のとおりで、フォワードプライマー (F-RA-4) は各 PCR 共通、リバースプライマーは 2 種類作成し、R2-T-1-Y は T-allele 特異的、R2-A-1-Y は A-allele 特異的で増幅長は約 385bp となった。

表 3 設計したプライマー配列

primer 名	配列
F-RA-4	5'-GCACACCGTGTATTTGCGG-3'
R2-T-1-Y	5'-GGCAAGTCGAGGATGGYAA-3'
R2-A-1-Y	5'-GGCAAGTCGAGGATGGYTA-3'

### ASPCR 法の反応条件

PCR 酵素は KOD-Plus (東洋紡) を用い、PCR 反応液は、1 検体あたり、10×PCR Buffer for KOD-Plus 2.5 μl、2mM dNTPs 2.5 μl、25 mM MgSO<sub>4</sub> 1.0 μl、KOD-Plus (1U/μl) 0.5 μl、水 15.5 μl、Forward Primer (10 μM) 1 μl、Reverse Primer (10 μM) 1 μl、Template DNA 1 μl で調整した。PCR 反応条件は、94°C 2 分加熱後、94°C 15 秒 (熱変性)、58°C~64°C 30 秒 (アニーリング)、68°C 1 分 (伸長反応) を 30 サイクル後、最後に 68°C 5 分処理した。アニーリング温度については 58°C、60°C、62°C、

64℃のうちで最適温度を検討した。なお、PCR装置は Veriti (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

PCR 反応で得られた PCR 産物は、GelRed (Biotium) 加 2%アガロースゲル (同仁化学研究所) を用いサブマリン泳動槽 (Mupid) で 100V30 分泳動を行った後 UV 下で観察した。

## 成績

### 1) アニーリング温度の検討

58℃や 60℃では各プライマーの特異性が低く、エクストラバンドが検出された。一方 62℃、64℃にすると各プライマーの特異性が高まりエクストラバンドも検出されなかった。62℃で、目的サイズのバンドが最もはっきり検出された。(図 3)。

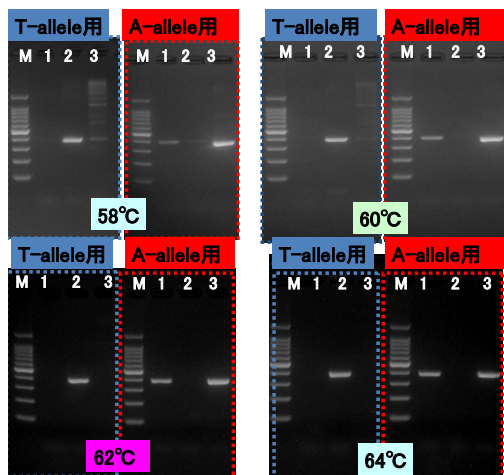


図 3 アニーリング温度の検討

M:100bp ラダー、1:LA 株 (A-allele)、2: 経鼻 V 株 (T-allele)、3: 注射 V 株 (A-allele)

### 2) ASPCR 法による供試株の検出

T-allele 株のみ検出するプライマーでは 経鼻 V 株及び経鼻 V 接種牛から分離された株 3 株のみでバンドが検出された (図 4-1)。

一方、A-allele のみ検出するプライマーでは、LA 株、No. 758 株、注射 V 株、野外株 1、2 が全て検出された (図 4-2)。

## 考察

IBRV 遺伝子配列シーケンス解析の結果、既報のとおり IBRV 全ゲノム配列中 58793 番目の塩基は経鼻 V 株のみ T で他の株は A であることが確認でき、この塩基の違いを識別する

プライマーを設計し、ASPCR 法により経鼻 V 株と他株との識別が可能であると考えられた。

しかしながら、LA 株において、T/A-allele の次の塩基が、他株は A であるのに対し、A と G が混在していたため、allele 特異的プライマーは相補鎖の向きに設計し、LA 株にも対応できるよう、C と T の混合塩基をいれることで全ての株で識別可能となった。

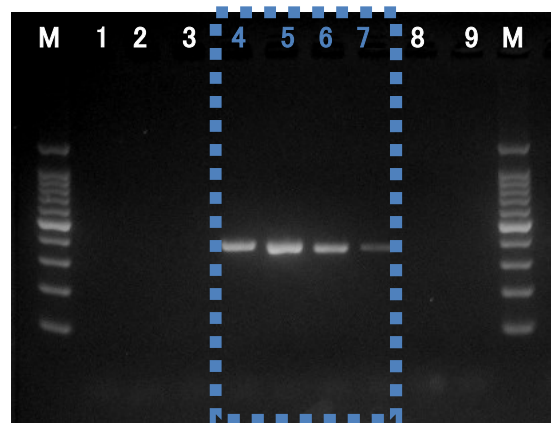


図 4-1 T-allele 識別プライマー

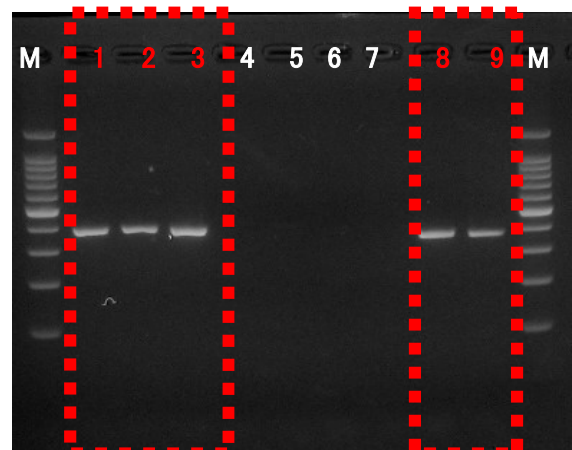


図 4-2 A-allele 識別プライマー

図 4 ASPCR 法による試供株の検出  
M:100bp ラダー、1:LA 株、2: No. 758 株、3: 注射 V 株、4: 経鼻 V 株、5~7: 経鼻 V 接種牛から分離された株 1~3、8: 平成 23 年県内分離株、9: 令和元年県内分離株

また、今回作成した ASPCR 法でのアニーリング温度は 62℃が最適であり、今回供した検体において、T-allele 用プライマーで経鼻 V 株のみが、A-allele 用プライマーではそれ以外の株のみが検出され、経鼻 V 株とそれ以外の株が識別可能であった。

昨年度報告した RFLP と比較すると、RFLP

は IBRV ゲノム全長を得るために細胞培養が必要で、結果判明まで最短でも 1 週間程度時間を要するが、本法は 2 時間程度で判定でき、検体到着日当日に判定可能である。本法をスクリーニング的に使用することで経鼻 V 株と野外株とを迅速、簡便に識別する方法として有用であると考えられた。

### 謝 辞

この稿を終えるにあたり、allele 特異的プライマーの作成にご助言いただいた(国)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研部門の楠本正博先生に深謝いたします。

### 参考文献

- [1] Fulton RW, d' Offay JM et al: Vaccine, 31, 1471-1479(2013)
- [2] 川口寧：獣医微生物学、三上彪監修、第 3 版、187、文永堂出版、東京 (2015)
- [3] 成沢邦明：臨床検査, 43, 1641-1647(1999)
- [4] Newton CR, Graham A et al:Nucleic Acids Res. , 17, 2503-2516(1999)
- [5] Okayama H, Curiel DT et al:J. Lab. clin. Med. , 114, 105-113(1989)
- [6] 斉藤妙子：第 61 回静岡県家畜保健衛生業績発表会集録、20-24(2020)
- [7] Sommer SS, Cassady JD et al:Mayo. Clin. Proc. , 64, 1361-1372(1989)
- [8] Tamura K, Peterson D et al:Mol. Biol. Evol. , 28, 2731-2739(2011)
- [9] Tizard IR :イラストでみる獣医免疫学、古澤修一、保田昌宏、多田富雄監訳、第 7 版、238-239、interzoo 出版、東京 (2011)
- [10] Wu DY, Ugozzoli L et al:Proc. Natl. Acad. Sci. , 86, 2757-2760(1989)

## 9 豚熱ワクチンの効果的な接種方法の検討

西部家畜保健衛生所

○松本 侍那子、松井 繁幸

### 要 約

豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針に基づき実施している免疫付与状況等確認検査において、令和2年6月に実施した第2回目の調査では、管内の肥育豚における抗体陽性率は73.4%と低い状況であった。

そこで、抗体陽性率の向上による豚熱防疫の強化を目的に、ワクチン抗体価に影響を与える要因（接種日齢、接種後日数、及び移行抗体等）について調査し、その結果から効果的なワクチン接種方法について検討を行った。

その結果、接種日齢及び接種後日数が抗体価に影響を与えることが明らかになったものの、その影響度は小さかった。また、ワクチン接種前の子豚のもつ抗体、すなわち移行抗体がワクチン接種による抗体産生に影響を与えることが明らかになり、移行抗体が一定以上残存している状況でワクチン接種をすると、その後の抗体価は上昇せず、逆に移行抗体が一定未満であればワクチン接種後の抗体価は上昇する傾向にあることが明らかになった。

一方で、農場内における移行抗体の保有状況はばらばらであることから、移行抗体の消失時期は一定ではなく、接種の適正日齢を一律に決定することは困難と考えられた。

以上より、今後の肥育豚へのワクチン接種方法として、農場毎の母豚免疫付与状況を調査した上で、高免疫母豚群と低免疫母豚群とに分け、子豚の接種日齢を2期に分ける方法や、肥育豚へは2回接種を行う方法等が考えられた。

### はじめに

令和元年10月、静岡県内において死亡野生イノシシにおける豚熱ウイルス感染が確認されたことをうけ、本県は豚熱ワクチン（以下、ワクチン）接種推奨地域に指定され、令和元年11月から飼養豚等へのワクチン接種を開始した。以降、豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針[1]に基づき、ワクチン接種農場を対象に6か月毎の免疫付与状況等確認検査を実施している。

令和元年12月に実施した第1回目の免疫付与状況等確認検査では、繁殖豚で90.4%（529/585頭）、肥育豚で97.8%（1,120/1,145頭）の抗体陽性率であったのに対し、令和2年6月に実施した第2回調査では繁殖豚で95.9%（639頭/666頭）、肥育豚で73.4%（599/816頭）と肥育豚の免疫付与率が低く、豚群の抗体陽性率80%未満でワクチンの追加接種を実施した農場は59.2%（29/49農場）であった。

群として80%以上の抗体保有率がある場合に十分な免疫が付与されていると判断され

るため[1]、第2回調査の状況においては、肥育豚での免疫付与状況は十分とは言えず、豚熱発生のリスクが高い状況となっている。

そこで、抗体陽性率の増加による豚熱防疫の強化を目的に、ワクチン抗体価に影響を与える要因について調査し、効果的なワクチンの接種方法について検討を行った。

### 材料と方法

#### 1) 抗体価に影響を与える要因分析

ワクチン接種による抗体産生に影響を与える要因を分析するため、肥育豚での免疫付与率の低下がみられた第2回免疫付与状況等確認検査の結果について、統計解析による分析を行った。

##### a. 免疫付与状況等確認検査

免疫付与状況等確認検査は令和2年6月から7月に実施した。検査対象農場は管内全養豚農場（49農場）とし、ワクチン接種後4週間以上経過した豚の血清について、ELISA法による抗体価測定を行った（豚コレラエライザキットⅡ；(株)ニッポ

ンジーン製)。抗体価は、被検血清抗原陽性ウェルの吸光度から被検血清抗原陰性ウェルの吸光度を引いた値を、指示陽性血清抗原陽性ウェルの平均吸光度から指示陽性血清陰性ウェルの平均吸光度を引いた値で除した値（以下、S/P 値）で評価した。

b. S/P 値とワクチン接種日齢、及び接種後日数との関係

S/P 値を従属変数、ワクチン接種日齢と接種後日数を独立変数とした重回帰分析を行った。

また、S/P 値に対する接種日齢の影響分析として、接種後日数による要因を排除した分散分析を行った後、sheffe 法による多重分析を行った。S/P 値に対する接種後日数の影響分析として、接種日齢による要因を排除した分散分析を行った後、sheffe 法による多重分析を行った。

## 2) 移行抗体の影響調査

子豚へのワクチン接種による免疫付与における移行抗体の影響について明らかにするため、管内 A 農場（母豚 100 頭、一貫経営）の飼養豚を用いて調査を行った。

a. 調査対象豚

A 農場で飼養する母豚から、その産仔の第 3 回免疫付与状況等確認検査時（令和 2 年 11 月実施予定）における日齢が、約 70 日齢、90 日齢、110 日齢、130 日齢、150 日齢となる分娩予定の母豚について予め ELISA による抗体価を調査し、各日齢で S/P 値の高い個体と低い個体をそれぞれ 1 頭ずつ調査に用いた。さらに、これらの母豚の産仔を 3 頭ずつ、計 30 頭を調査に用いた。

b. 調査方法

母豚は令和 2 年 7 月 19 日に採血し、子豚は豚熱ワクチンの接種予定 2 週間前（25～35 日齢）、豚熱ワクチン接種の前日（40～50 日齢）、及び 11 月 20 日（71～149 日齢）で採血し、それぞれ ELISA 法（豚コレラエライザキット II）により S/P 値を測定した（図 1）。ただし、3 回目免疫付与状況等確認検査時に約 150 日齢となる子豚については、ワクチン接種予定 2 週間前の採血は試験計画時に既に経過していたため実施しなかった。

c. 調査内容

母豚の抗体価と子豚の移行抗体の関係と、

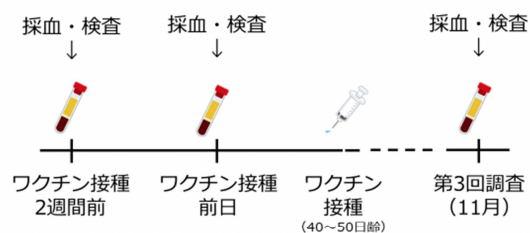


図 1 採血・検査スケジュール

母豚の S/P 値、及びその子豚のワクチン接種前日の S/P 値の相関係数を算出した。

また、ワクチン接種前後における子豚の S/P 値の推移について、同腹豚を一群として接種後約 30 日（A 群、B 群）、45 日（C 群、D 群）、60 日（E 群、F 群）、85 日（G 群、H 群）、100 日（I 群、J 群）の平均 S/P 値を比較した。

## 成 績

1) 抗体価に影響を与える要因分析

a. S/P 値を従属変数、接種日齢と接種後日数を独立変数とした重回帰分析

回帰モデルは有意 ( $p < 0.01$ ) であったが、決定係数は 0.076 と非常に低かった。接種日齢、接種後日数ともに係数は有意で ( $p < 0.1$ )、接種日齢が 0.117、接種後日数が 0.265 であった。

b. ワクチン接種日齢と S/P 値の関係

S/P 値は 30 日齢未満で最も低く、50～59 日齢が最も高かった（図 2）。

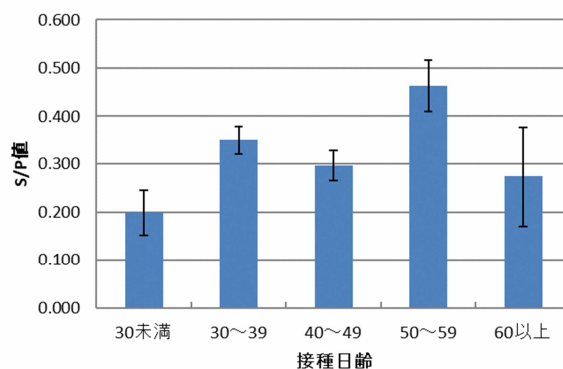


図 2 接種日齢と S/P 値の関係

c. ワクチン接種後日数と S/P 値の関係

S/P 値は接種後日数 30 日未満で最も低く、70～89 日まで上昇した（図 3）。

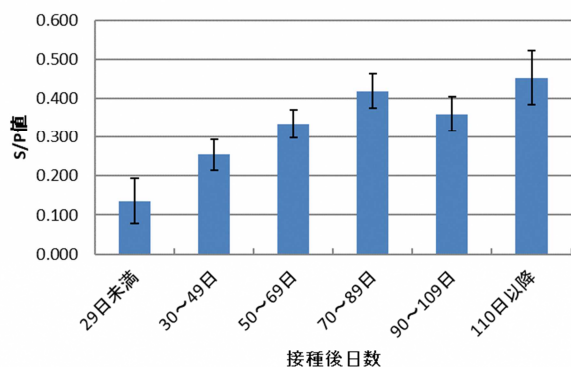


図3 接種後日数と抗体価の関係

## 2) 移行抗体の影響調査

### a. 母豚の抗体価と子豚の移行抗体の関係

調査した母豚の S/P 値は、平均 0.805、標準偏差 0.271、最小値 0.301、最大値 1.199 だった。また、母豚の抗体価と子豚の移行抗体（ワクチン接種前日の S/P 値）の間には、相関係数 0.822 と強い正の相関が認められた。さらに、母豚の S/P 値が 1.1 以上ある場合には、その産仔の 40~50 日齢における S/P 値は 0.5 以上と、高い値で移行抗体が残存していた。

### b. ワクチン接種前後における子豚の S/P 値の推移

図 4 にワクチン接種直前の S/P 値が高い（S/P 値 0.3 以上）豚群（以下、高 S/P 値群）の個体毎の抗体価の推移を、また図 5 にはワクチン接種直前の S/P 値が低い（0.3 未満）の豚群（以下、低 S/P 値群）の個体毎の抗体価の推移を示した。高 S/P 値群では、すべての豚でワクチン接種後も抗体価は上がり、移行抗体よりも低い S/P 値で推移していた。これに対し、低 S/P 値群では多くの豚群でワクチン接種後に抗体価が上昇していた。

## 考 察

今回、豚熱ワクチンによる免疫付与状況の改善を目的に、第 2 回免疫付与状況等確認検査の結果を用い、ワクチン抗体価に影響を与える要因分析と、移行抗体がワクチン抗体に与える影響について調査を行った。

要因の分析では、接種日齢と接種後日数が S/P 値に正の影響を与えていることが明らかになったものの、これら 2 要因における影響

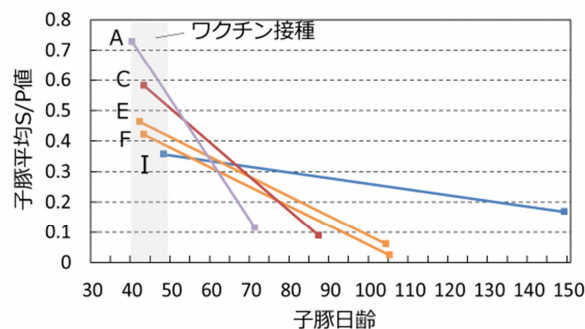


図4 ワクチン接種後の抗体価推移（高 S/P 値群）

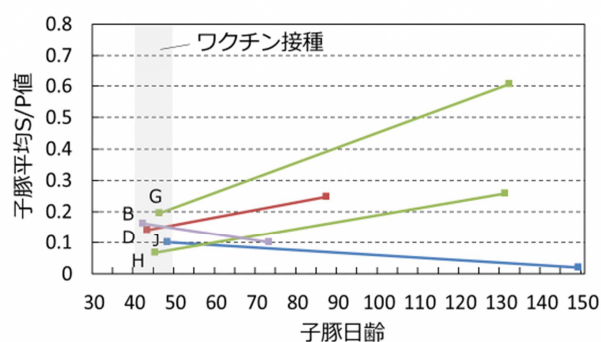


図5 ワクチン接種後の抗体価推移（低 S/P 値群）

度は非常に小さいことが明らかになった。

また、母豚の S/P 値、すなわち子豚への移行抗体がワクチン抗体価に影響を与えることが明らかになった。今回の結果からは、子豚のワクチン接種前の S/P 値が 0.3 未満であれば、接種後の抗体価は上昇する傾向にあったため、理論的に言えば、S/P 値が 0.3 未満になる日齢を待ってワクチン接種をすれば、免疫状況は改善されるものと思われる。しかしながら、母豚の免疫付与状況、すなわち子豚の移行抗体は今回の調査でも示されたように農場内ではばらついており、ワクチン接種する現場において、毎回母豚ごとに接種日齢を変更するのは、規模の小さい農場を除いてはほぼ不可能と思われる。したがって、母豚個体毎に接種日齢を変える等の対応ではなく、当該農場で抗体陽性率 80% となるような接種日齢を決めて対応していく方法が現実的と思われる。その一つの方法として、農場毎の母豚免疫付与状況を調査した上で、高免疫母豚群と低免疫母豚群とに分け、子豚の接種日齢



を2期に分ける方法が考えられる。あるいは、農場の母豚免疫付与状況を調査するのが困難である場合等には、肥育豚へは30～40日齢と60～70日齢の2回接種を行う方法が考えられる。ただし、本方法については、生産者が負担するワクチン接種に対する費用や、接種業務における家畜保健衛生所の労働負担に関する問題点を解決する必要がある。

最近になって、岐阜県中央家畜保健衛生所がワクチンの接種適期を推定する統計モデルを開発した。これは、母豚30頭またはワクチン接種前の子豚30頭分の抗体保有状況データから、統計的に当該農場における接種適期を推定するもので、全国の家畜保健衛生所はそのモデルを無償で活用することが可能となっている。今後、当所管内においても、本モデルを活用して農場毎の接種適期を推定し、抗体陽性率の改善を図っていく予定である。

#### 参考文献

- [1] 農林水産大臣公表：豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針、14-27（2020）
- [2] 社団法人 全国家畜畜産物衛生指導協会・社団法人 畜産技術協会：豚コレラ防疫史、悠書館（2009）

## 10 CSF 免疫付与状況調査血清を用いた抗体検査成績と今後の活用方法の検討

中部家畜保健衛生所

○梶原 一洋、西原 由希子

### 要 約

令和元年 10 月に県内で野生イノシシの CSF 陽性が確認され、11 月中に全飼養豚への CSF ワクチン初回接種が完了した。令和元年 12 月及び令和 2 年 6 月に CSF 免疫付与状況調査を実施し、ELISA 検査に加え中和試験を実施した。S/P 値と中和抗体価の関係性を調べた結果、S/P 値と  $\text{Log}_2$  (中和抗体価) に直線で表すことができる相関関係 ( $r = 0.93$ ) が認められた。しかし、個体毎の S/P 値と  $\text{Log}_2$  (中和抗体価) の関係性を見るとばらつきが大きいため、ヒストグラムで表し集団で比較することで、より正確に農場の抗体分布が推定されることが考えられた。また、S/P 値から作成したヒストグラムを活用し、令和元年 12 月と令和 2 年 6 月の抗体価分布を比較した結果、繁殖豚間及び肥育豚間での抗体価の大きな変動が確認された。また、農場間で同様に比較したところ、抗体価の分布に差が認められた。免疫付与状況調査における ELISA 検査成績の S/P 値をヒストグラムで可視化することで、抗体価分布の把握や農家指導に活用できると考えられた。

### はじめに

令和元年 10 月に県内で野生イノシシの CSF 陽性が確認されたことを受け、11 月中に全飼養豚への CSF ワクチン初回接種が完了した。

その後、令和元年 12 月及び令和 2 年 6 月に豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針に基づき CSF 免疫付与状況調査を実施した。抗体検査成績とその活用方法について検討したので、報告する。

### 材料と方法

免疫付与状況調査の為に、管内の一貫経営養豚場 5 戸 (A から E 農場) 及び子取り経営養豚場 2 戸において、令和元年 12 月 (CSF ワクチン初回接種から 1 ヶ月後) に 210 頭 (繁殖豚 46 頭、肥育豚 164 頭)、令和 2 年 6 月 (CSF ワクチン初回接種から 7 ヶ月後、繁殖豚については 2 回目接種から 1 ヶ月後) に 210 頭 (繁殖豚 88 頭、肥育豚 122 頭) から採取した血清を用い、CSF ELISA 検査 (JNC 株式会社) を実施した。また、令和 2 年 6 月採取血清については併せて CPK-NS 細胞を用いた中和試験を実施した。これらの成績を元に、下記について調査した。

#### 1) S/P 値と中和抗体価の関係

令和 2 年 6 月の ELISA 検査及び中和試験の結果から、S/P 値と中和抗体価の関係を調査した。また、S/P 値と中和抗体価それぞれでヒストグラムを作成し、類似性を比較した。 $\text{Log}_2$  (中和抗体価) のヒストグラムの設定については、X 軸範囲を -0.5 から 12.5、幅を 1、階級個数を 13 で設定 (中和抗体価に変換した場合に 2 倍未満から 4096 倍まで 2 の階乗倍を各 1 つの階級に設定)。S/P 値で作成したヒストグラムについては、S/P 値と  $\text{Log}_2$  (中和抗体価) の関係から算出された回帰式にあてはめ範囲を設定して作図した。

#### 2) 令和元年 12 月と令和 2 年 6 月の S/P 値の比較

上記と同様の設定で、S/P 値から作成したヒストグラムを活用し、令和元年 12 月と令和 2 年 6 月の繁殖豚と肥育豚の抗体分布を比較した。

#### 3) 農場間の S/P 値の比較

上記と同様の設定で、S/P 値から作成したヒストグラムを活用し、令和 2 年 6 月の農場毎の抗体価の分布の傾向について調査した。

### 成 績

ELISA 検査成績は、令和元年 12 月は陽性 206

頭（繁殖豚 43 頭、肥育豚 163 頭）、疑陽性 3 頭（繁殖豚 2 頭、肥育豚 1 頭）、陰性 1 頭（繁殖豚 1 頭）だった（表 1）。令和 2 年 6 月は陽性 180 頭（繁殖豚 88 頭、肥育豚 92 頭）、疑陽性 14 頭（肥育豚 14 頭）、陰性 16 頭（繁殖豚 2 頭、肥育豚 14 頭）だった（表 2）。ELISA 疑陽性と判定された 14 検体のうち、11 検体で中和抗体価 2 倍以上だった（表 3）。

表 1 令和元年 12 月 ELISA 検査成績

	陽性	疑陽性	陰性	合計
繁殖豚	43 (20.5)	2 (1.0)	1 (0.5)	46 (21.9)
肥育豚	163 (77.6)	1 (0.5)	0 (0.0)	164 (78.1)
合計	206 (98.1)	3 (1.4)	1 (0.5)	210 (100.0)

カッコ内は全体の合計に占める割合 (%)

表 2 令和 2 年 6 月 ELISA 検査成績

	陽性	疑陽性	陰性	合計
繁殖豚	86 (41.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	88 (41.9)
肥育豚	94 (44.8)	14 (6.7)	14 (6.7)	122 (58.1)
合計	180 (85.7)	14 (6.7)	16 (7.6)	210 (100.0)

カッコ内は全体の合計に占める割合 (%)

表 3 令和 2 年 6 月 ELISA 及び中和試験結果

	ELISA			合計
	陽性	疑陽性	陰性	
中和 $\geq 2$	177 (84.7)	11 (5.3)	3 (1.4)	191 (91.4)
$2 <$	2 (1.0)	3 (14.4)	13 (6.3)	18 (8.6)
合計	179 (85.6)	14 (6.7)	16 (7.7)	209 (100.0)

カッコ内は全体の合計に占める割合 (%)

### 1) S/P 値と中和抗体価の関係

S/P 値と  $\text{Log}_2$ (中和抗体価) に直線の相関関係が認められ ( $r = 0.93$ )、 $y = 7.89x + 0.895$  の回帰式が得られた (図 1)。

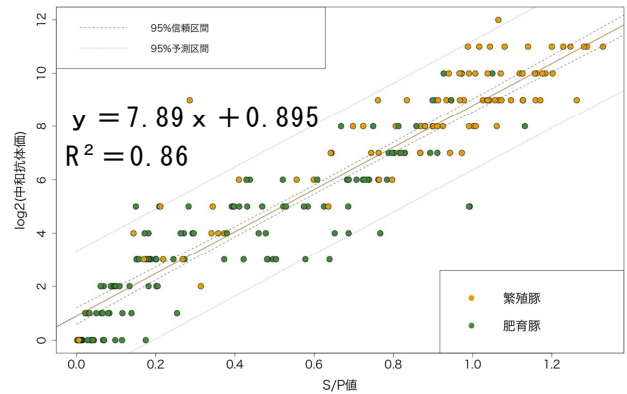


図 1 S/P 値と  $\text{Log}_2$ (中和抗体価) の関係

7 農場の中和抗体価と S/P 値の分布を繁殖豚と肥育豚に分けてヒストグラムで示した。(図 2)。

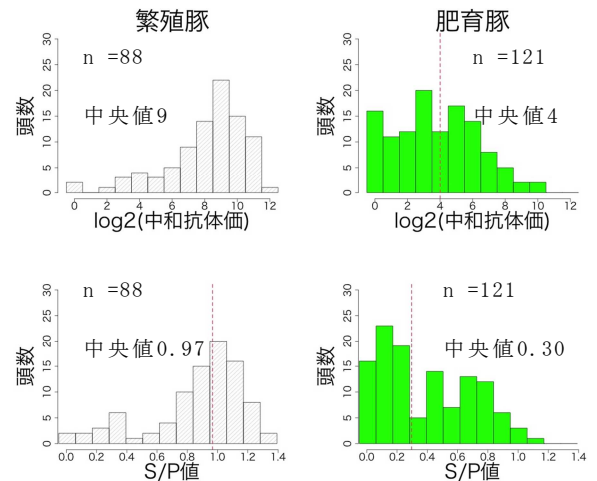


図 2 中和抗体価と S/P 値の関係 (7 農場合計)

また、A 農場及び D 農場の中和抗体価と S/P 値の分布を繁殖豚と肥育豚に分けてヒストグラムで示した (図 3、4)。

S/P 値と  $\text{Log}_2$ (中和抗体価) をヒストグラムにした時の傾向として、 $n = 100$  程度のもの (7 農場合計) の方が  $n = 10$  程度のもの (農場毎) と比較し、より正確に中和抗体価の分布が推定できた。また、抗体価の高い領域 (中和抗体価に変換すると 16 倍以上) の方が中和抗体価と S/P 値が類似していた。

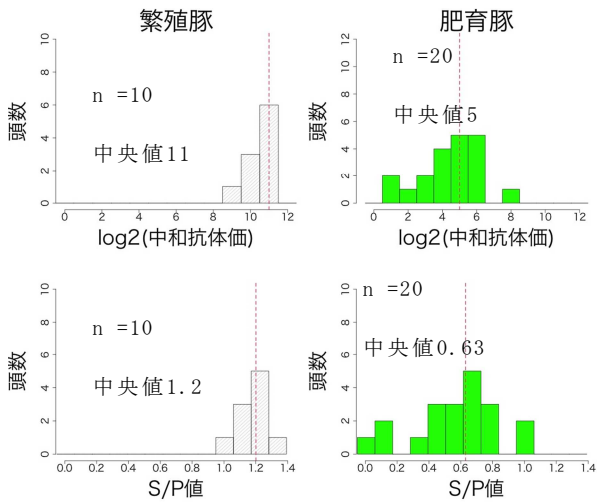


図3 中和抗体価と S/P 値の関係 (A 農場)

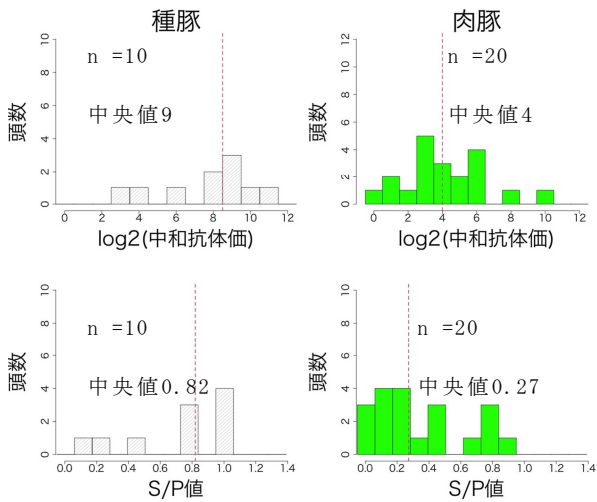


図4 中和抗体価と S/P 値の関係 (D 農場)

2) 令和元年12月と令和2年6月の S/P 値の比較

令和元年12月採血血清の S/P 値は繁殖豚が低く (中央値: 0.40)、肥育豚が高かったが (中央値: 0.65)、令和2年6月の S/P 値は繁殖豚が高く (中央値: 0.97) 肥育豚が低かった (中央値: 0.30) (図5)。

3) 農場間の S/P 値の比較

令和2年6月の S/P 値は A 農場のみ繁殖豚全ての S/P 値が高く (中央値: 1.2) 正規分布に近い形をしていた (図6)。肥育豚の S/P 値 (中央値: 0.63) も他農場 (中央値: 0.30) に比べ高い傾向にあった (図7)。

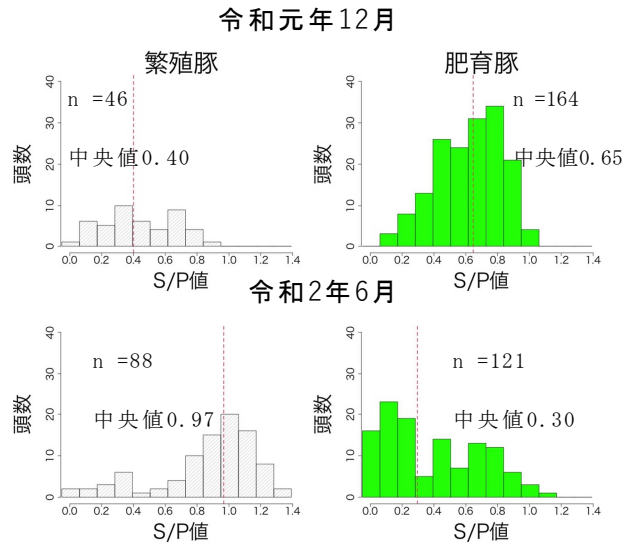


図5 令和元年12月と令和2年6月の S/P 値の比較

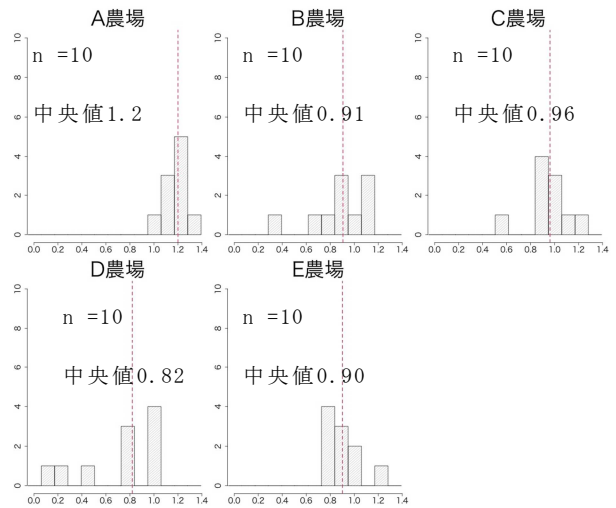


図6 一貫農場間の S/P 値分布の違い (繁殖豚)

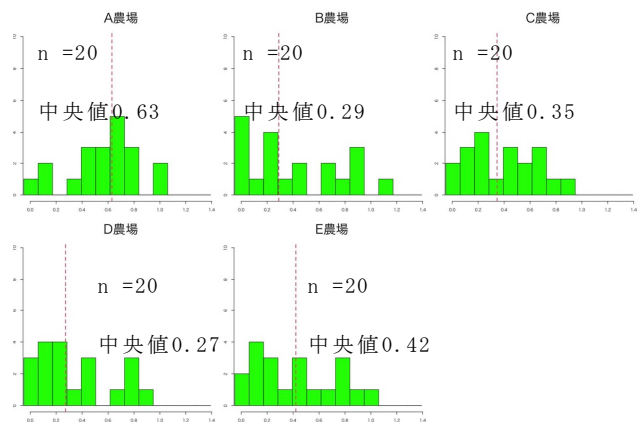


図7 一貫農場間の S/P 値分布の違い (肥育豚)

## 考 察

中和抗体価と S/P 値を比較したところ、既報のとおり S/P 値は、中和抗体価と相関が認められた[2]。個体毎の S/P 値と中和抗体価の比較ではばらつきが大きい(95%予測区間の幅が大きい)、ヒストグラムにすることで、群として S/P 値から中和抗体価の分布を把握できると考えられた。S/P 値と中和抗体価の関係性については、95%信頼区間の幅が狭いことから、回帰直線のばらつきは少なく、今後の検査においても活用できると考えられた。また、今回の調査では、中和抗体価に換算した場合に 16 倍以上の領域で特に S/P 値で作成したヒストグラムと  $\text{Log}_2$ (中和抗体価)で作成したヒストグラムが類似し、16 倍未満の領域では S/P 値で作成したヒストグラムの方が低い抗体価の領域に多く分布する傾向が見られた。この傾向について原因は不明だが、ELISA 検査の感度の影響も考えられた。

ELISA 検査で疑陽性だった 14 検体のうち 11 検体が中和試験で 2 倍以上だった。豚コレラ防疫史には、「移行抗体の影響で、ワクチンによる獲得免疫を示す抗体価が 1~2 倍という低いレベルに留まる場合があるが、抗体価は持続し数ヵ月後に強毒ウイルス感染を受けてもほとんど症状を示さず耐過することが実験的に明らかにされている。」[1]と記されており、この ELISA 検査による疑陽性個体なども CSF ウイルスの攻撃を受けても発症を防止できる可能性がある。このことから、単純に ELISA 検査の判定の“陰性”、“陽性”、の結果から、免疫付与率が高い・低いと判断するのは適切でない可能性があると考えられた。

令和元年 12 月と令和 2 年 6 月の豚群の S/P 値を比較し、繁殖豚で上昇した要因としては、2 回接種後であること、初回接種から時間が経過(約 7 ヶ月)していること等が考えられた。令和元年 12 月の肥育豚の S/P 値の分布は正規分布に近い形をしていたが、令和 2 年 6 月の S/P 値は低下した。この理由として、接種時の移行抗体や接種後日数等の影響が考えられたが、今回の調査においては、それらを正確に把握することはできなかった。

農場毎のヒストグラムの比較では、A 農場のみが他農場と比較し繁殖豚及び肥育豚の抗体分布が高くなった。繁殖豚においては、他農場が頸部へのワクチン接種だったのに対し、

A 農場では尻部に接種をしたことや、導入元が SPF 農場であることなどが考えられたが、要因の特定には至らなかった。

今後も CSF ワクチン接種は長期にわたり継続していくことが想定される。今後実施される免疫付与状況調査などの ELISA 検査結果(S/P 値)をヒストグラムに表すことで、農場での中和抗体価の分布を推定できることから、農場指導に活用することで CSF 防疫対策につなげていきたい。

## 参考文献

- [1] 今井正夫、石井達郎ほか：豚コレラ防疫史、12、社団法人全国家畜畜産物衛生指導協会・社団法人畜産技術協会 (2009)
- [2] 中根崇、岩本裕晶ほか：日獣会誌、55、783-788 (2002)

中部家畜保健衛生所  
○野元 孝子、杉本 郁子

### 要 約

令和2年5月、母豚280頭一貫経営の養豚場で肥育豚の死亡が発生した。原因究明のため、死亡豚の隣房で飼養されていた衰弱豚1頭の病性鑑定を実施した。解剖で、肺全体に腫脹及び硬結感がみられ、中葉及び後葉は線維素が析出し、胸壁との癒着が認められた。また、肺門リンパ節の腫脹が認められた。肺及び肺門リンパ節から分離された菌は生化学的性状検査、*omlA* 遺伝子の検出及び16S rRNA 遺伝子塩基配列解析の結果から *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) と同定され、血清型別ではゲル内沈降反応試験及びPCRの結果から15型と判定された。毒素遺伝子は *apxII*、*III* 及び *IV* が検出された。薬剤感受性試験では、アンピシリン、ゲンタマイシン、オキシテトラサイクリン、ドキシサイクリンに耐性であった。また、肺門リンパ節から分離されたサルモネラは、*Salmonella* Typhimurium 単相変異株(4:i:-) と同定された。病理組織学的検査では、線維索性壊死性胸膜炎、壊死性結腸炎が認められた。免疫組織化学的染色の結果、病変部に抗 App serotype-15 型家兔血清に対する陽性反応及び抗 *Salmonella* 04 家兔血清に対する陽性反応が認められた。

以上の結果から、解剖豚は App15 型による豚胸膜肺炎及び豚サルモネラ症と診断された。解剖所見で肺病変が強く出ていることから、死亡原因は豚胸膜肺炎による呼吸困難であると思われ、密飼い等の飼養環境の悪さによるストレスによって発症したと考えられた。併せて、サルモネラの保菌が病態を悪化させる一因となったと推察された。

### はじめに

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App) を起因菌とする豚胸膜肺炎は、急性の場合、肥育豚の急死の一因となり、慢性経過をとると、発育不良等を招く経済的損失の大きな豚の重要疾病である[5]。今回県内一養豚場で豚胸膜肺炎が発生し、県内で初めて App15 型が分離されたので、その概要を報告する。

### 材料及び方法

#### 1) 発生農場の概要

飼養頭数2,700頭規模の一貫経営(母豚280頭、子豚1,200頭、肥育豚1,200頭)で、畜舎はストール舎1棟、分娩舎3棟、肉豚舎4棟、子豚舎2棟の計10棟である。

数年前に種雄豚を導入して以来、導入は全くほぼ自家産である。離乳は21~28日齢である。

ワクチンは、母豚には、PRRS、日脳パルボ、PCV2、子豚には、App、PCV2、マイコプラズマを接種している。

#### 2) 病性鑑定

##### a. 検査材料

肉豚舎の衰弱豚1頭(LWD、肥育去勢、4ヶ月齢)を対象とした。また、細菌の精密検査として、分離された App 疑い菌4株(肺由来3株 No. 1~3、肺門リンパ節由来1株 No. 4) と PCR については、肺のパラフィンブロックから抽出した DNA 2検体 (No. 5~6) を追加で用いた。

##### b. 解剖

定法により実施した。

##### c. 細菌学的検査

一般細菌検査：主要臓器及び主要リンパ節について、5%羊血液寒天培地を用いて、37℃、24時間のCO<sub>2</sub>培養と嫌気培養を実施した。DHL培地を用いて、37℃、24時間の好気培養を実施した。肺及び肺門リンパ節は、これらに加え、β-NAD添加5%馬血液寒天培地を用いて、37℃、48時間のCO<sub>2</sub>培養を実施した。分離された菌について性状検査を定法により実施した。

サルモネラ検査：DHL で分離された菌は生化学的性状検査後、サルモネラ免疫血清及び相誘導用血清（デンカ生研）を用いて血清型別を行った。また、血清型同定のため、*Salmonella* Typhimurium(以下 ST)同定用 PCR を実施した [8]。

#### d. App の精密検査

菌種同定：生化学的性状検査として、溶血性、カタラーゼ、オキシダーゼ、ウレアーゼ、衛星現象の確認及び CAMP テストを行った。簡易キットは、ID テスト HN-20 ラピッド（日水製薬）を用いた。

遺伝子学的検査として、App 種特異遺伝子 *om1A* を標的とした PCR を実施した [7]。また、16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列の一部を決定し、EzBioCloud による 16SrRNA 遺伝子のシーケンス解析を実施した。

血清型別：血清型 1～15 参考株を免疫して作成した抗血清を用いたゲル内沈降反応試験（ゲル沈）を実施した。

莢膜合成遺伝子の型別：血清型 1、2、5、7 及び 15 型用 Multiplex PCR を実施した [4]。

Apx 毒素の遺伝子型別：Apx I～III の保有を確認するための apx CA PCR プロファイル [2] 及び ApxIV 毒素遺伝子 PCR [1] を実施した。

薬剤感受性検査：アンピシリン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリン、エンロフロキサシン、コリスチン、アモキシシリン、セフェピム、アジスロマイシン、ジョサマイシン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、スルファモノメトキシシンオルメトプリムの 14 薬剤について、一濃度ディスク法で実施した。

#### e. 病理組織学的検査

解剖後、常法に従い HE 染色を実施した。病変部について、免疫組織化学染色（以下 IHC）を実施した。家兎血清は、肺では抗 App serotype-1、2、5a、15 型家兎血清及び抗 PCV2 家兎血清を、各腸管では抗 *Salmonella* 04 家兎血清をそれぞれ一次抗体として用いた。

#### f. ウイルス学的検査

ペスチウイルス及びアフリカ豚熱の遺伝子検査を実施した。

## 成績

### 1) 発生の概要

令和 2 年 5 月中旬、肉豚舎の 1 棟の同一豚

房で 4 ヶ月齢の肥育豚が 2 頭死亡した。一週間前に子豚舎から移動した個体であった。翌日、子豚舎の 1 棟で 1 頭が死亡した。この 1 頭は前日死亡した 2 頭と同日生まれで、子豚舎では同房で飼養されていた。死亡豚の発育は良好であった。

同日の現地家保の立ち入り検査時の子豚舎内は、1 豚房に飼養頭数が多く、密となっていた（写真 1）。同房豚にパイルアップ、消化器症状、神経症状等の異状はみられなかった。

肉豚舎の 1 豚房あたりの飼養頭数は子豚舎に比べ、余裕があった。死亡が発生した豚房の同居豚に異状はなかったが、隣房の 1 頭が腹式呼吸を呈し衰弱していたため、当該豚を病性鑑定に供試した。



写真 1 子豚舎内の様子

### 2) 病性鑑定

#### a. 解剖

供試豚の外貌に異状はなかった。

解剖所見として、肺は全体的に腫脹し、硬結感があり、中葉及び後葉では線維素の析出がみられ（写真 2：左）、胸膜との癒着（写真 2：右上）も確認された。また、肺門リンパ節は腫脹していた（写真 2：右下）。

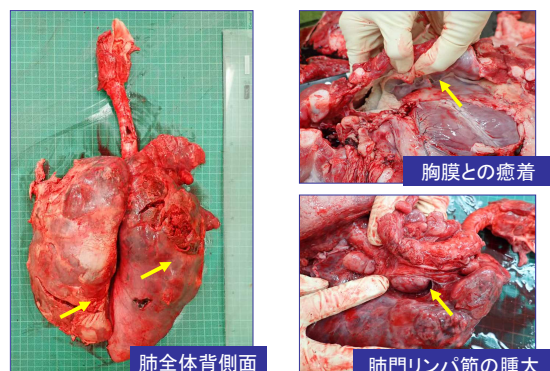


写真 2 解剖所見

b. 細菌学的検査

一般細菌検査：肺及び肺門リンパ節から、純培養的に分離された菌は、β溶血、ウレアーゼ陽性、マンニット陽性を示し、衛星現象がみられ、CAMPテスト陽性の性状が確認された。IDテストでは、App(ID:55%)または *Actinobacillus lignieresii*(ID:45%)と判定された。

また、肺門リンパ節からサルモネラが分離され、血清型別の結果、4:i:-と判定され、ST単相変異株と同定された。

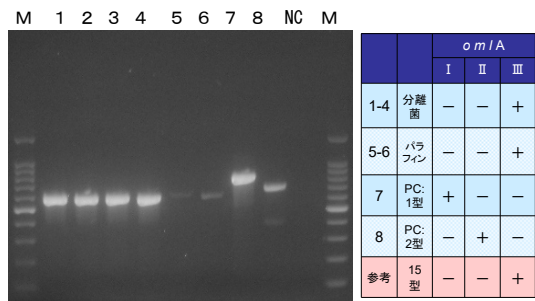
App菌種同定：*omlA* 遺伝子のPCRの結果、供試した検体は、すべて *omlA* IIIが陽性となった(写真3)。血清型によって検出されるバンドは異なるが、Appであればいずれかのバンドが検出される。

さらに、16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析の結果、App基準株と99.66%の一致率となった。

これらの結果と性状検査の結果と併せて、肺から分離された菌はAppと同定された。

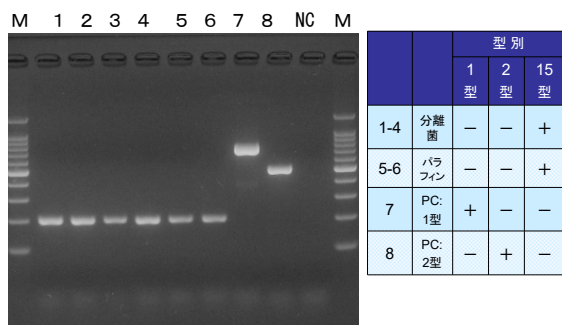
血清型別：ゲル沈の結果、供試菌4株は15型と判定された。

また、莢膜合成遺伝子のPCRですべての検体で、App15型を示す200bpのバンドが確認された(写真4)。



*omlA*I : 809bp *omlA*II : 687bp *omlA*III : 577bp M : 100bpラダー

写真3 種特異的遺伝子 *omlA* のPCR



1型 : 750bp 2型 : 500bp 15型 : 200bp M : 100bpラダー

写真4 莢膜合成遺伝子のPCR

毒素型別：apx CAプロファイルでは、apx II及びapx IIIの2本のバンドが検出された(写真5:上)。さらに二つ目のPCRでapx IVが検出された(写真5:下)。

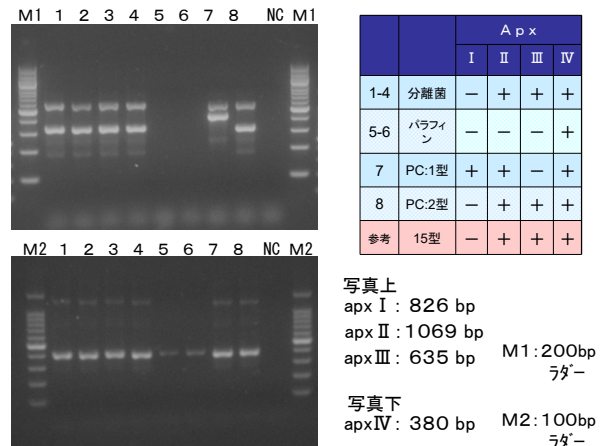


写真5 毒素遺伝子(上: apxCAプロファイル、下: apxIV)

薬剤感受性試験：アンピシリン、ゲンタマイシン、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリンの4薬剤に耐性を示した。

c. 病理組織所見

肺では凝固壊死が認められ、その周囲に燕麦様細胞の浸潤が認められた(写真6:上の左右、HE染色)。肺門リンパ節では、リンパ濾胞にマクロファージの浸潤、リンパ洞には好中球の浸潤が認められた。

IHCの結果、肺の壊死病変の辺縁部に一致して、抗App15型に対する陽性反応が認められた(写真6:下の左右、免疫組織化学的染色)。なお、PCV2は陰性であった。

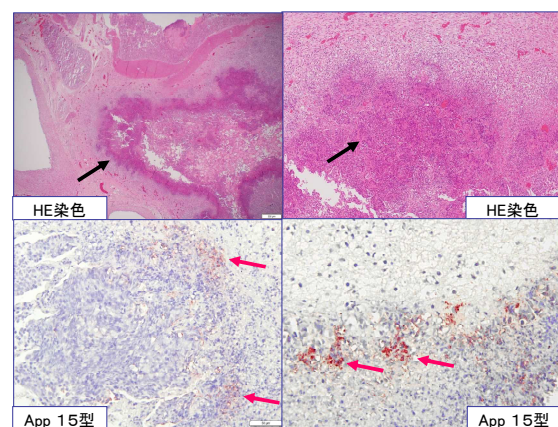


写真6 病理組織所見(肺)

また、壊死性結腸炎が認められ、腸管の各部位でも粘膜上皮細胞の脱落、表層の壊死が



認められた。それらの病変部位では、抗 *Salmonella* 04 家兎血清で、陽性反応が認められた。

#### d. ウイルス学的検査

ペスチウイルス及びアフリカ豚熱特異遺伝子は検出されなかった。

### まとめ及び考察

今回の事例は、病性鑑定の結果、App15 型による豚胸膜肺炎および豚サルモネラ症と診断された。解剖所見において肺病変が強く出ていることから、死亡原因は豚胸膜肺炎による呼吸困難であると考えられた。

豚胸膜肺炎の起病菌である App は、莢膜の抗原性の違いに基づき、血清型が決定され、現在、1 型から 16 型まで確認されている [5]。

App の血清型について、国内での分離で最も多いのは 2 型で、次いで 1 型、5 型の順であり、この 3 つの血清型で、全体の 9 割以上を占めるという報告がある [3, 5]。続いて 15 型、7 型が多く分離されている [3]。

県内で実施した病性鑑定で記録が確認できた平成 7 年以降では、App、もしくは App の疑いありと診断された事例は 19 件であった。血清型の内訳は、1 型が 3 件、2 型が 10 件、5 型が 1 件、11 型が 1 件、不明が 4 件で、国内の発生報告と同様、2 型が多数を占めていた。

App15 型は国内では 2003 年に初めて報告された血清型で、近年では 15 型の報告が増えてきており、香川、福岡、神奈川県等複数の県で発生の報告が挙げられている [7, 9, 10]。本県では、本事例が初めての分離事例となった。

App は血清型によって病原性に違いがあるため、分離菌の血清型別は重要な検査項目である [5]。分離菌の血清型別法としては、凝集試験やゲル沈が主に実施されてきたが、近年、型別を判定できる PCR も開発されている [4]。本県ではこれまで App の血清型別は自家作成した抗血清を用いた凝集試験で実施していたが、新しい血清型である 15 型には対応できていなかった。今回、実施した血清型別 Multiplex PCR は国内で優位に分離される型 1、2、5、7 及び 15 型を一斉に判別できるため、簡便かつ診断に有効であることが分かった。

また、App は血清型に関わらず病原性を有

していると言われており、その病原性の違いを決定づける要素は主に、I ~ IV までである Apx 毒素であることが分かっている [5, 6]。各 App 株の apx 毒素遺伝子保有パターンは各血清型で特異的である。今回の分離菌は、Apx II、III、IV の 3 種類を保有しており、これは既報の App15 型と同様のパターンであった [6]。

薬剤感受性試験では、オキシテトラサイクリンに耐性を示したが、他県で分離された 15 型の耐性傾向と同様であった [7, 9, 10]。

App は日和見感染症でもあり、一般的に、ストレスや他の病原体の感染が原因となり発症すると言われている [6]。今回の事例は、子豚舎での密飼いなどの飼養環境の悪さと肥育舎への移動のストレスが発症に至った主要原因と考えられた。併せて、ST 単相変異株が分離され、病理組織学検査でもその関与を疑う所見が得られたが、下痢等の臨床症状は確認されていないため、保菌状態であったと推察された。この保菌も重篤化の一因となったと考えられる。

本農場では、App 対策としてワクチンを接種していたが、現在市販されているワクチンは、App 1、2、5 型をターゲットとした血清型特異的であるため [5, 9]、15 型が関与した今回の発症には、十分な予防効果が得られなかったと考えられた。

病鑑後の対応として、水洗しか実施していなかった肉豚舎の消毒を実施した。また、飼料添加の抗菌性物質を耐性であったドキシサイクリンから、感受性を示したフロルフェニコールに変更し、現在の発生は低減されている。

ストレスの大きな要因であると考えられた密飼いについては、今後母豚数を減らすなど飼養頭数の管理を含めて計画的に改善できるよう指導を継続している。また、ST についても、保菌状況把握のための検査等を実施しており、清浄化を目指していく。

### 謝 辞

16S rRNA 遺伝子解析を実施していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 病原機能解析ユニット高松大輔先生、ゲル沈を実施していただいた 同寒地酪農衛生ユニット伊藤博哉先生、

IHC を実施していただいた 同病理ユニット  
芝原友幸先生に深謝いたします。

#### 参考文献

- [1] W.S Cho and C.Chae: The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology 37 56-60(2003)
- [2] T.Gram et al: Veterinary Microbiology 75(2000)43-57
- [3] H. Ito: All about SWINE 42, 23-28(2013)
- [4] H. Ito and M. Sueyoshi: JARQ 49(3) (2015)
- [5] 伊藤博哉：家畜衛生学雑誌、第 42 巻、第 2 号、29-60(2016)
- [6] 片山茂二：養豚の友、2020 年、7 月号、30-35
- [7] 森西恵子ほか：香川県家畜保健衛生業績発表会集録（2010）
- [8] 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門細菌・寄生虫研究領域腸管病原菌ユニット：サルモネラ(4:i:-)の同定マニュアル
- [9] 尾川寅太ほか：臨床獣医、393(10)38-43 (2015)
- [10] 山本英子ほか：神奈川県家畜保健衛生業績発表会集録（2019）

## 12 県内で発生したトリコモナス原虫寄生を伴う豚の下痢症

中部家畜保健衛生所

○金森 健太

### 要 約

豚に寄生するトリコモナス原虫(以下本原虫)で代表的なものは、*Trichomonas suis* が知られている。これらの病原性は明らかにされていないが、これまで本原虫が関与したと考えられる豚の下痢症が、国内でも数例報告されている。今回、本県でも本原虫が関与したと考えられる離乳子豚の下痢症が発生したことから、その概要について報告する。母豚 300 頭規模の一貫養豚農場で、2019 年 8 月から離乳後に下痢を呈し、死亡する豚が増加したことから病性鑑定を実施した。剖検では大腸粘膜に白色結節が形成され、病変部の直接鏡検で多数のトリコモナス様原虫が確認された。病理組織学的検査では、大腸陰窩上皮細胞が過形成し、陰窩腔内に多数の本原虫が寄生していた。陰窩上皮細胞が過形成していたことから Warthin-Starry 染色を実施したが、陰窩上皮細胞内に菌体は認められず、その他の検査で有意な所見は認められなかった。本症例では、本原虫以外に下痢を引き起こす可能性のある病原体は検出されず、過去の報告同様に、本原虫が下痢に関与したと考えられた。本県で行われた平成 25 年から令和 2 年 10 月までの豚病性鑑定事例を用いた回顧調査では、73 事例中 4 事例に本原虫の寄生が確認された。しかし寄生が確認された豚は下痢症状が認められず、陰窩腔内に本原虫が遊離するのみで、組織変化も認められなかった。これらの豚では感染数が少ないため、下痢を起こさなかったと考えられた。環境中に本原虫が多いと下痢症を引き起こす可能性があることから、清掃等の飼養管理の徹底が必要だと考えられた。

### はじめに

トリコモナス原虫は、肉質鞭毛虫門、鞭毛虫亜門、動物性鞭毛虫門、トリコモナス目に属する原虫で、犬、猫をはじめとした多くの哺乳類に感染する[2]。豚に寄生する主なトリコモナス原虫として、*Trichomonas suis*、*Trichomitus rotuda*、*Tetratrichomonas buttreyi* の 3 種が挙げられる[3]。これらの豚に寄生するトリコモナス原虫は病原性の詳細は明らかにされておらず、非病原性で豚と共生しているという報告もある[1]。その一方で我が国においては、80 年代後半から、九州地方において、トリコモナス原虫の関与が疑われる子豚の下痢症が複数報告され[3-6]、下痢を誘発する可能性が示唆されている。今回、本県においても、トリコモナス原虫が関与した子豚の下痢症に遭遇したことから、その概要について報告する。

### 発生概要

発生農場は母豚 300 頭規模の一貫経営農場で、ワクチンは母豚に、日本脳炎、パルボウイルス、萎縮性鼻炎、豚流行性下痢を接種し、子豚には、

サーコウイルス、マイコプラズマ及び豚丹毒ワクチンを接種していた。

本農場は、2019 年 8 月から、離乳後の子豚で灰色水様下痢を起こし、多い日は一日に 20 頭程度の死亡が確認された。例年、同時期に下痢が発生し、カビ吸着剤の投与を実施することで収束していたが、本症例では下痢が継続したことから、病性鑑定を実施した。

### 材料と方法

#### 1) 検査材料

灰色水様下痢を呈して衰弱していた豚 1 頭と死亡豚 1 頭を剖検に供し(No. 1 及び 2)、さらに No. 1 及び同居豚 3 頭の糞便併せて計 4 検体を以下の検査に供した。

#### 2) ウイルス学的検査

同居豚 3 頭の糞便を用いてラピッドテストローターアデノ II (積水メディカル株式会社)によるロタ・アデノウイルスの簡易検査を実施した。

#### 3) 細菌学的検査

No. 1 及び No. 2 の主要臓器及び体表リンパ節について、5%羊血液加寒天培地及び DHL 培地を

用いて、24時間、5%炭酸ガス及び嫌気培養を実施した。また、十二指腸内容物について DHL 寒天培地を用いて、大腸菌の定量培養を実施し、直腸便は、ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地で42°C24時間の増菌培養後、DHL培地に塗抹し、37°C24時間好気培養を実施した。

#### 4) 寄生虫学的検査

No. 1 と同居豚の計 4 頭の直腸便を用いて、浮遊法による虫卵検査を実施し、剖検豚は、直腸粘膜を用いた粘膜の直接鏡検を実施した。

#### 5) 病理組織学的検査

No. 1 と No. 2 は剖検した後、諸臓器の観察を行った。採材した臓器については、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィンに包埋した。薄切された切片については、HE 染色と特殊染色 (Warthin-starry 染色及び PAS 染色) を実施した。

### 結果

始めに本症例は、「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」に則り、豚熱及びアフリカ豚熱の関与を否定した後、病性鑑定を実施した。

#### 1) ウイルス学的検査結果

同居豚のロタ・アデノウイルス簡易検査は全て陰性だった。

#### 2) 細菌学的検査結果

主要臓器及びリンパ節から有意菌は検出されず、大腸菌の定量培養では、衰弱豚が  $4 \times 10^6$  CFU/g、死亡豚で  $1.1 \times 10^8$  CFU/g であった。一定量の大腸菌が検出されたが、No. 1 から分離された大腸菌は溶血性を示さず、No. 2 は死亡豚であったことから、これらは参考値とした。直腸便からサルモネラ菌は検出されなかった。

#### 3) 寄生虫学的検査

検査に供した 4 頭から虫卵は検出されず、直腸を用いた粘膜の直接鏡検では、運動性を有する多数のトリコモナス様原虫が確認された (図 1)。

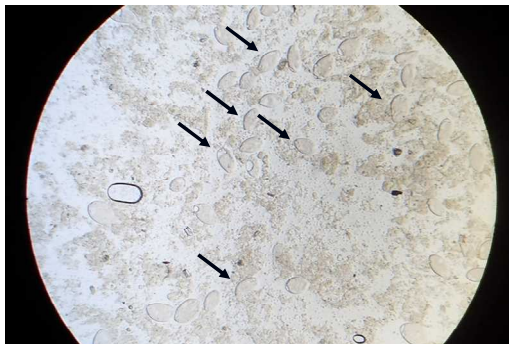


図 1 運動性を有するトリコモナス様原虫

#### 4) 病理組織学的検査

剖検では 2 頭に共通して、結腸及び直腸に  $\phi$  2~3mm の白色結節が散在性に認められ (図 2)、その他の臓器では No. 2 の胃に出血が見られた他、著変は認められなかった。病理組織学的検査では、No. 1 及び No. 2 共に盲腸、結腸及び直腸の陰窩上皮細胞が過形成したことにより、陰窩腔は異型を呈し、陰窩膿瘍も散見された。粘膜固有層への細胞浸潤も顕著で、粘膜は肥厚していた (図 3)。拡張した陰窩腔内には、円形から三日月様のトリコモナス原虫が多数寄生しており、これらは PAS 染色で陽性を示した (図 4)。Warthin-starry 染色では、過形成した陰窩上皮細胞内に菌体は確認されなかった。粘膜下織では、巨大な膿瘍が形成されていた。さらに、No. 2 の盲腸、結腸及び直腸では、細菌や滲出物を伴う粘膜表層の壊死も見られ (図 5)、胃では粘膜上皮細胞が脱落し、粘膜固有層の充出血が見られた。

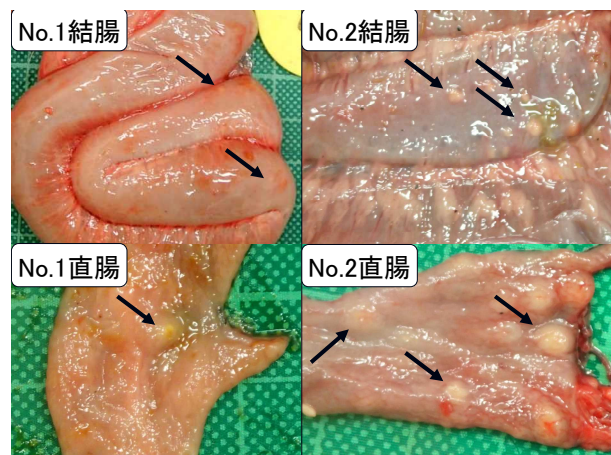


図 2 結腸及び直腸に認められた白色結節

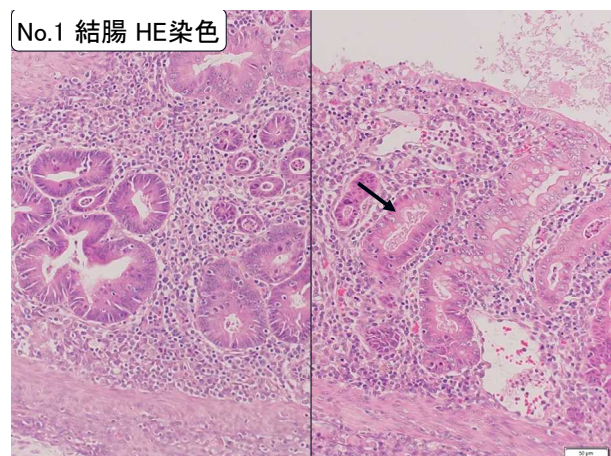


図 3 陰窩上皮細胞が過形成し、内腔に原虫を認める

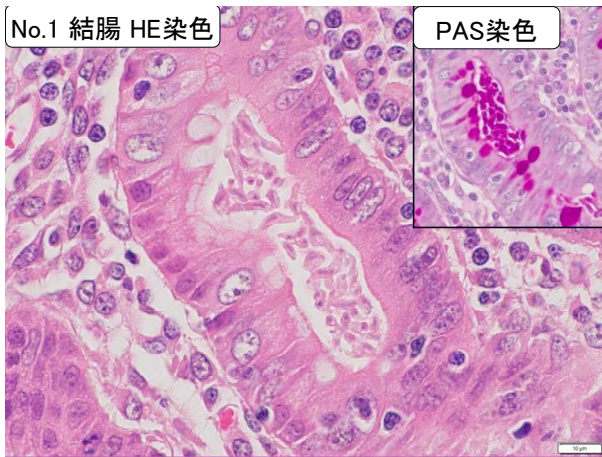


図4 円形から三日月様のトリコモナス原虫の寄生

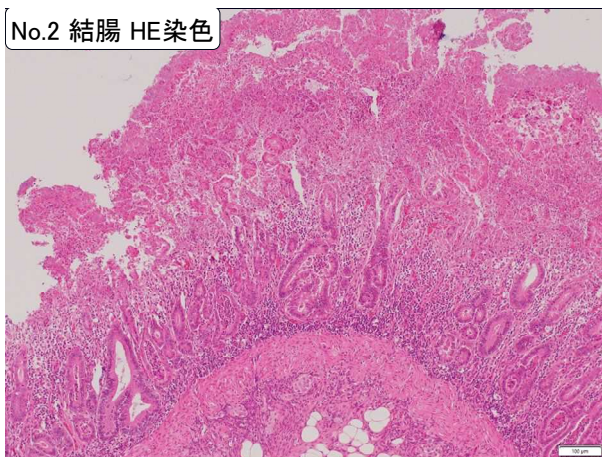


図5 細菌を伴う粘膜表層の壊死

### 考察

今回、剖検した2頭の豚に共通して、陰窩膿瘍を伴う大腸の陰窩上皮細胞の過形成が認められた。病理組織学的に同様の病変を引き起こす疾病として、*Lawsonia intracellularis* (L.i) による豚増殖性腸炎が挙げられる。豚増殖性腸炎は、主な病変を回腸に形成するが、盲腸や結腸にも病変を形成することがある。原因菌のL.iは、陰窩上皮細胞に寄生することから、Warthin-starry染色を実施し、菌体の存在を確認したが、今回の症例では確認されなかった。また、豚増殖性腸炎を発症していたとしても、抗生物質を投与することで、菌体が消失し、病変のみが残存する可能性も考えられたが、本症例では抗生物質は未使用であった。これらのことから、本事例にL.iが関与していた可能性は低いと考えられた。

また、過去のトリコモナス原虫寄生を伴った下痢症の発生事例と比較したところ(表1)、発

症日齢、症状及び組織所見はおおよそ共通しており、1991年及び2001年の鹿児島県の症例と同様に、大腸で形成された白色結節が、粘膜下織に膿瘍を形成しているという所見も共通していた。このように過去の症例と比較しても類似しており、トリコモナス原虫の寄生とそれに伴う病変以外に下痢を引き起こす要因が確認されなかったことから、本症例はトリコモナス原虫が下痢症に関与していた可能性が高いと考えられた。

表1 過去の症例との比較

症例	長崎県 (1988年)	長崎県 (2012年)	鹿児島県 (1991年)	鹿児島県 (2001年)	本症例
日齢	60	66	55	50	離乳~50
症状	下痢	下痢	下痢	下痢	下痢
剖検所見 (腸管)	なし	空回腸の 菲薄化	結腸に 白色結節	結腸に 白色結節	大腸に 白色結節
組織所見	—	—	粘膜下織に 膿瘍形成	粘膜下織に 膿瘍形成	粘膜下織に 膿瘍形成
陰窩腔内にトリコモナス原虫、陰窩上皮細胞の過形成、陰窩膿瘍					

※いずれの症例も、有意な病原体は検出されず

### 回顧調査

これまでの考察から、トリコモナス原虫が下痢に関与していると考えられたため、本県で行われた過去の病性鑑定事例について再度調査し、同様の事例の有無について確認し、比較検討した。

#### 1) 材料と方法

本県で平成25年から令和2年10月までに行われた豚病性鑑定73事例、154頭の十二指腸から直腸の組織切片658検体を用いて、鏡検により、陰窩腔内におけるトリコモナス原虫寄生の有無と病変の有無について確認した。

#### 2) 結果

豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)を発症していた豚の盲腸、原因不明の損耗を呈していた2事例の豚の盲腸及び盲腸と結腸、豚胸膜肺炎を発症していた豚の盲腸の、73事例中4事例(4頭5検体)からトリコモナス原虫が確認された(図6)。これらの豚は下痢症状を示さず、病理組織学的に粘膜固有層への細胞浸潤や、軽度の陰窩膿瘍が認められる程度で、顕著な組織変化は認められなかった。

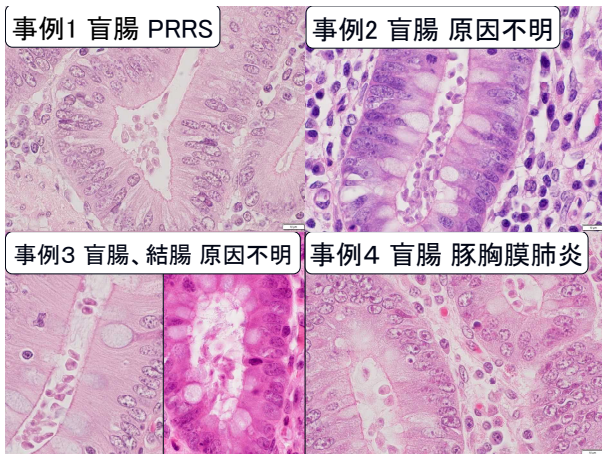


図6 回顧調査における陰窩腔内のトリコモナス原虫

### 総括

本症例では、離乳後の豚に下痢が認められ、トリコモナス原虫の寄生と、それに伴う陰窩上皮細胞の過形成や、陰窩膿瘍が認められた。その他、下痢症を引き起こす可能性のある要因は確認されなかった。また、過去のトリコモナス原虫の寄生を伴う事例や、下痢症に関与していた症例とも類似していたことから、本症例においても、トリコモナス原虫が下痢に関与したと考えられた。

No. 2の死亡豚では、これらの病変に加え、細菌を伴う粘膜表層の壊死が認められた。トリコモナス原虫は、腸内細菌を攪乱することで下痢を誘発すると考えられていることから[3]、No. 2はトリコモナス原虫が誘発した細菌性腸炎が悪化したことで、死亡に至ったと考えられた。

また、回顧調査におけるトリコモナス原虫の寄生が認められた事例では、寄生に伴う顕著な病変は認められなかった。これらは、下痢も認められなかったことから、トリコモナス原虫の感染数が少なく、病変形成にまで至らず、下痢を誘発しなかったと考えられた。本症例において、定量調査は行われていないが、過去の事例と比較して組織切片上のトリコモナス原虫の数や直接鏡検で多数のトリコモナス原虫が確認されたことから、環境中にトリコモナス原虫が多く、それらを摂取した豚の体内で更に増殖したことで下痢症を引き起こした可能性が考えられた。環境中にトリコモナス原虫が多く存在することで、本症例のような下痢症が誘発される可能性も考えられるため、発症を予防す

るには、清掃等の飼養管理の徹底が必要だと考えられた。

### 参考文献

- [1] BonDurant et al : New York, NY: Academic, 111~188 (1994)
- [2] 今井壯一： 獣医感染症カラーアトラス, 三上彪, 第2版, 554-555, 文永堂出版, 東京 (2006)
- [3] 北野良夫ら：日獣会誌, 44, 473~477 (1991)
- [4] 久保正法ら：臨床獣医, Vol. 6, No. 6 (1988)
- [5] 臧菌光輝：動物衛生研究所研究報告, No. 109, 17-23 (2003)
- [6] 鈴田史子：日獣会誌, 66, 797~800 (2013)