

豚の全身性 *Actinobacillus suis* 感染症佐々木羊介^{1, 2)†}KABALI Emmanuel^{2, 3)}芝原友幸²⁾小林秀樹²⁾清水稚恵⁴⁾森田大輔⁴⁾久保正法²⁾

1) 明治大学農学部 (〒214-8571 川崎市多摩区東三田1-1-1)

2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

3) University of Zambia (Department of disease control, Box 32379, Lusaka, Zambia)

4) 北海道石狩家畜保健衛生所 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘3)

(2010年8月20日受付・2010年12月3日受理)

要 約

重度の消瘦が認められた30日齢の離乳豚を剖検したところ、線維素性胸膜肺炎がみられた。病理組織学的に、肺胸膜、心外膜および腎臓髓質に多数の壊死巣が認められ、その周囲を核が伸長した好中球が層状に取り巻く像が確認された。これらの病変部にはグラム陰性菌塊が認められた。同様の病変は肝臓、脾臓、腸間膜および大脳にも認められた。免疫組織化学的に、このグラム陰性桿菌は抗*Actinobacillus suis*血清に対して陽性反応を示した。病変部から病原菌の分離培養ができなかったため、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片からDNAを分離した。16S rRNA遺伝子の一部を増幅・塩基配列解析した結果、分離したDNAは*A. suis*と高い相同性がみられた(100%の相同性, 650bp比較)。以上の成績から、*A. suis*がこの子豚に壊死性胸膜肺炎、心外膜炎および腎炎を引き起こしたと考えられた。

——キーワード： *Actinobacillus suis* 感染症, 壊死性胸膜肺炎, 全身感染。

----- 日獣会誌 64, 381~384 (2011)

豚から分離される *Actinobacillus* 属菌には *A. suis*, *A. pleuropneumoniae*, *A. porcitosillarum*, *A. minor* および *A. rossii* があげられる [1]。この中で、*A. suis* と *A. pleuropneumoniae* は豚への病原性が問題となる [2, 3]。 *A. suis* はグラム陰性、非運動性、通性嫌気性を示す *Pasteurella* 科の球桿菌であり [4]、わが国では過去に2報のみ報告されている [5, 6]。本菌は高い衛生状態の農場においても、さまざまな日齢の豚に感染し [7]、敗血症、関節炎、肺炎、腸炎、髄膜炎、流産、心内膜炎および皮下膿瘍を含むさまざまな病態を引き起こす [8]。

今回、われわれは発育不良がみられた豚群について病性鑑定を実施した。そのなかで、*Actinobacillus* 感染症が疑われた離乳豚1例において、免疫組織化学的検査およびホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織からの16S rRNA遺伝子塩基配列の相同性検索による菌種の同定の結果、*A. suis* 感染症と診断した症例について報

告する。

材料および方法

母豚105頭を飼養する一貫経営農場において、2010年2月頃より、離乳後10~20日の豚に発育不良が散見され、死亡する豚が増加した。同年4月に、同症状を示した30日齢の離乳豚1頭について病性鑑定を実施した。当該農場では衛生状態は良好であり、25日齢にて全豚に対して萎縮性鼻炎、豚胸膜肺炎および豚サーコウイルス2型 (PCV2) のワクチン接種を行っていた。

剖検後、主要臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋後薄切片し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびグラム染色を施して鏡検した。

主要臓器のパラフィン切片に対して、ウサギ抗 *A. suis* および PCV2 血清に対する免疫組織化学的検査を実施した。操作は市販のキット、(ヒストファイニン プルステイン MAX-PO (MULTI) キット, ニチレイ

† 連絡責任者：佐々木羊介 (明治大学農学部農学科動物生産学研究室)

〒214-8571 川崎市多摩区東三田1-1-1

☎044-934-7826 FAX 044-934-7902

E-mail : yskssk@isc.meiji.ac.jp

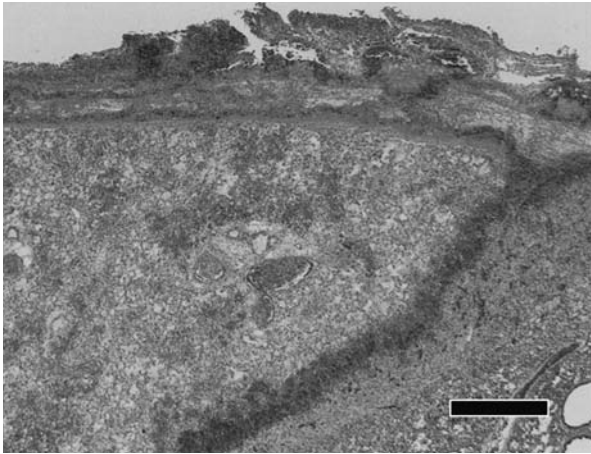


図1a 肺. 壊死病巣が肺実質と肺胸膜に認められる (HE 染色 Bar = 500 μ m)

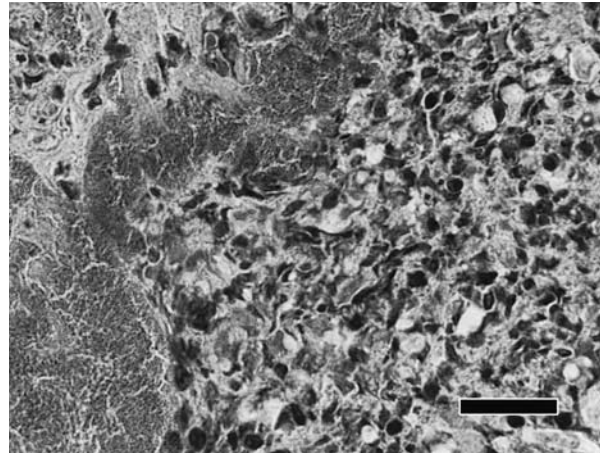


図2a 心臓. 心筋の壊死巣境界部位に細菌塊と核が伸長した好中球が多数みられる (HE 染色 Bar = 10 μ m)

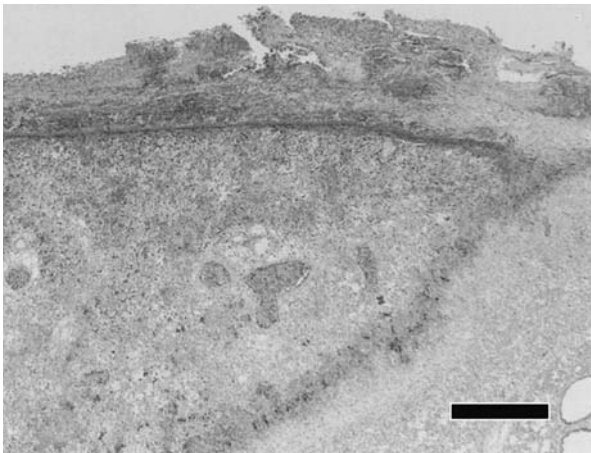


図1b 肺. 図1aの壊死病巣に一致して *A. suis* 抗原がみられる (免疫染色 Bar = 500 μ m)

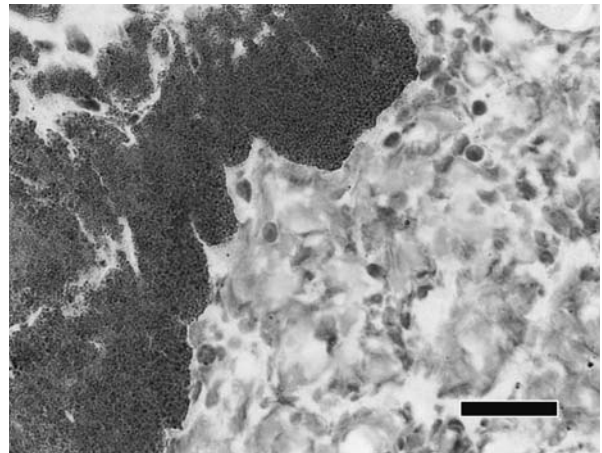


図2b 心臓. 図2aの細菌塊に一致して *A. suis* 抗原がみられる (免疫染色 Bar = 10 μ m)

(株, 東京) の手順に従った. なお, 肺についてはウサギ抗 *A. pleuropneumoniae* 1, 2 および 5a 型ならびに豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルス血清を用いた免疫組織化学的検査も実施した.

肺のFFPE組織から10 μ mの厚さの組織切片を3枚作製した. 組織切片からのDNA抽出方法は, Liuら [9] の手順に従った (QIA DNA FFPE Tissue プロトコール, QIAGEN (株), 東京). DNA抽出後, 16S rRNA 遺伝子の一部をPCRにて増幅した. PrimerにはPag313 (大腸菌の16S rRNA ポジション 313位) 5'-CACACTGGGACTGAGACACGG-3' および Pag1128 (大腸菌の16S rRNA ポジション 1128位) 5'-AAGGATAAGGGTTGCGTCTCG-3' を用いた. 増幅産物の650bpについてGenBank/EMBLにより解析した.

肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓および肺を細菌分離材料とした. これらについて, チョコレート寒天培地および5%羊血液加寒天培地を用いて, 好気培養および微好気培養 (5% CO₂ ガス) を37 $^{\circ}$ C, 48時間実施した. また, 回腸

および結腸内容物について, DHL寒天培地 (栄研化学 (株), 東京) を用いて37 $^{\circ}$ C, 24時間好気培養を実施した.

剖検豚の各臓器を用いて豚コレラウイルス (扁桃), PCV2 (腸間膜リンパ節), PRRSウイルス (肺) および豚サイトメガロウイルス (腎臓と肺) の各特異遺伝子に対するPCRを実施した.

成 績

外貌上, 剖検豚は顕著に消瘦していた. 肺には線維索性胸膜肺炎がみられ, 胸水が著しく貯留していた. また, 心嚢水の貯留も認められた. さらに, 肝臓および腸管にはうっ血が認められた. その他の臓器に著変はみられなかった.

肺 (図1a, b), 肺胸膜, 心外膜 (図2a, b) および腎臓髓質 (図3a, b) では, 多数の壊死巣が認められ, その周囲を核が伸長した好中球が層状に取り巻く像が確認された. これらの病変部にはグラム陰性桿菌塊が認められ, 同様のさまざまな程度の病変は肝臓, 脾臓, 腸間

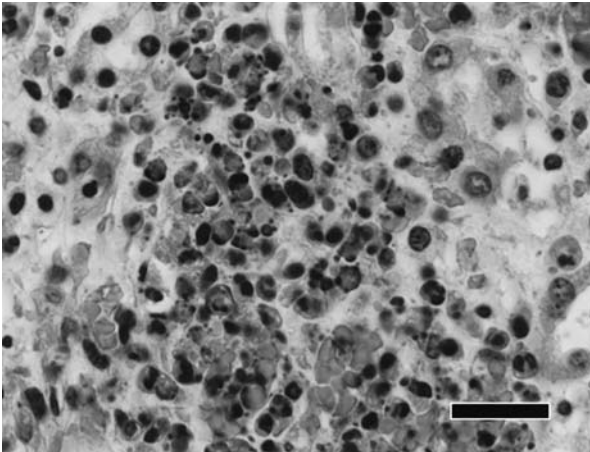


図3a 腎臓. 好中球の集簇巣が認められる (HE 染色 Bar = 10 μm)

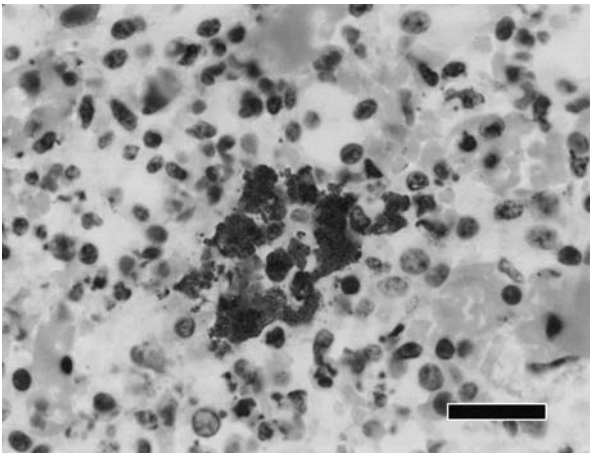


図3b 腎臓. 図3aの好中球の集簇巣に一致してA. suis抗原がみられる (免疫染色 Bar = 10 μm)

膜, 腸間膜リンパ節および大脳にも認められた。腎臓では, 髄質尿管上皮細胞に好塩基性核内封入体が多数認められた。小腸では, 粘膜上皮細胞の壊死とコクシジウムの寄生がみられた。回腸のパイエル板には多核巨細胞が出現していた。大腸では, 粘膜上皮細胞の剝離壊死および充うっ血が認められた。

病変部にみられたグラム陰性桿菌は, ウサギ抗A. suis血清にのみ陽性反応を示した(表1)。A. pleuropneumoniae, PCV2およびPRRSウイルスの抗原は認められなかった。

肺のFFPE組織切片から分離したDNAをPCRにて増幅し, 16S rRNA遺伝子の一部を塩基配列解析した。解析の結果, 分離したDNAはA. suis (accession no. AY362899)と高い相同性がみられた(100%の相同性, 650bp比較)。

肺, 心臓および脾臓から病原細菌は分離されなかった。肝臓および腎臓からはEscherichia coliが分離された。回腸および結腸内容物からサルモネラは検出されな

表1 免疫染色によるA. suis抗原分布

臓器	抗A. suis血清
肺	+++
肺胸膜	+++
心臓	+++
腎臓	+++
肝臓	+
脾臓	+
腸間膜	+
腸間膜リンパ節	+
大脳	+
小脳	-
脾臓	-
胃	-

+++ : 重度, ++ : 中等度, + : 軽度, - : なし

かった。

肺からPRRSウイルス遺伝子, 腎臓と肺から豚サイトメガロウイルス遺伝子が検出された。豚コレラウイルス遺伝子およびPCV2遺伝子は検出されなかった。

考 察

A. suis感染症は臨床所見からH. parasuis感染症, E. coli感染症, A. pleuropneumoniae感染症, A. porcitisillarum感染症, PRRSと区別することが困難である[10]。さらに, A. suisはA. pleuropneumoniaeと類似した出血性線維索性胸膜肺炎を引き起こすこともあり[8], 菌の性状や臨床症状も酷似している[10]。本症例では, 組織学的検査より, 肺や心臓などの多くの臓器において, 核が伸長した好中球が壊死巣の周囲に認められた。この組織所見はA. pleuropneumoniae感染症において顕著かつ特徴的に認められる[11-13]。また, A. suisの全身感染では細菌性血栓栓塞が慢性にみられるが[10], 本症例では全身性の細菌性血栓栓塞は認められず, 病理組織学的所見ではA. suis感染症と診断することは困難であった。よって, 本症例の病性鑑定の初期段階にはA. pleuropneumoniae感染症が疑われ検査が進められた。しかし, 肺のFFPE組織切片による遺伝子検査の結果から, A. suisと仮診断し, さらに抗A. suis血清を用いた免疫組織化学的検査で病変部に一致して陽性反応を示したことからA. suis感染症と診断した。

一般的に, A. suis菌の分離培養には特殊な分離用選択寒地培地が必要であり, また抗生物質の投与により分離培養が困難となる場合がある[8]。本症例においてもA. suisの分離培養はできなかった。今回の症例のように菌分離が困難な場合や細菌検査が実施されず病理組織学的に細菌感染症を疑う症例では, FFPE組織切片を用いた16S rRNA遺伝子塩基配列の相同性による菌種の同定は有効な診断方法と考えられた。遺伝子学的検査と免

疫組織化学的検査を活用することにより、病原因子を容易に同定できるとともに、病理学的診断の精度を高めることができると考えられた。

最後に、本症例の病性鑑定を実施するにあたり、協力いただいた北海道石狩家畜保健衛生所の職員の皆様、千葉県中央家畜保健衛生所の関口真樹技師、山形県中央家畜保健衛生所の高野儀之技師、動物衛生研究所の山根逸郎研究員、川寫健司研究員、小林 勝検査技術専門員、嶋田恵美検査技術専門員、明治大学の瀧藤雄三教授、ならびにウサギ抗 *A. suis* および PCV2 血清を分与していただいた元動物衛生研究所の中澤宗生先生および鈴木孝子先生に深謝する。

引用文献

- [1] Rycroft AN, Garside LH : *Actinobacillus* species and their role in animal disease, *Vet J*, 159, 18-36 (2000)
- [2] Auger E, Deslandes V, Ramjeet M, Contreras I, Nash JHE, Harel J, Gottschalk M, Olivier M, Jacques M : Host-pathogen interactions of *Actinobacillus pleuropneumoniae* with porcine lung and tracheal epithelial cells, *Infect Immun*, 77, 1426-1441 (2009)
- [3] Ojha S, Lacouture S, Gottschalk M, Macinnes JI : Characterization of colonization-deficient mutants of *Actinobacillus suis*, *Vet Microbiol*, 140, 122-130 (2010)
- [4] Miniats OP, Spinato MT, Sanford SE : *Actinobacillus suis* septicemia in mature swine : two outbreaks resembling erysipelas, *Can Vet J*, 30, 943-947 (1989)
- [5] 佐野 弘, 梶尾規一, 小柳謙司, 山本 明, 溝口 徹, 大村康治, 水口博之 : 幼豚における *Actinobacillus suis* 感染症の病理学的観察, *日獣会誌*, 37, 515-518 (1984)
- [6] 鈴木達郎, 池田章夫, 柳川芳輝, 原 康弘, 両角徹雄 : 哺乳豚における *Actinobacillus suis* 感染症例, *日獣会誌*, 48, 841-844 (1995)
- [7] Ojha S, Sirois M, Macinnes JI : Identification of *Actinobacillus suis* genes essential for the colonization of the upper respiratory tract of swine, *Infect Immun*, 73, 7032-7039 (2005)
- [8] Macinnes JI, Desrosiers R : Agents of the "suis-ide diseases" of swine : *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, and *Streptococcus suis*, *Can J Vet Res*, 63, 83-89 (1999)
- [9] Liu J, Mani S, Schwartz R, Richman L, Tabor DE : Cloning and assessment of tumorigenicity and oncogenicity of a Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line for influenza vaccine production, *Vaccine*, 28, 1285-1293 (2010)
- [10] Taylor DJ : Miscellaneous bacterial infections In : Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ. (Eds.), *Diseases of swine*, 9th ed, Iowa State University Press, Iowa, 817-843 (2006)
- [11] Ohba T, Shibahara T, Kobayashi H, Takashima A, Nagoshi M, Osanai R, Kubo M : Multifocal granulomatous hepatitis caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter pigs, *J Comp Pathol*, 139, 61-66 (2008)
- [12] Ohba T, Shibahara T, Kobayashi H, Takashima A, Nagoshi M, Araki M, Takizawa K, Kubo M : Prevalence of granulomatous pleuropneumonia associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter pigs, *J Vet Med Sci*, 71, 1089-1092 (2009)
- [13] Ohba T, Shibahara T, Kobayashi H, Takashima A, Nagoshi M, Kubo M : Granulomatous lymphadenitis associated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in slaughter barrows, *Can Vet J*, 51, 733-737 (2010)

Systemic *Actinobacillus suis* Infection in a Piglet

Yosuke SASAKI^{*†}, Emmanuel KABALI, Tomoyuki SHIBAHARA, Hideki KOBAYASHI, Chie SHIMIZU, Daisuke MORITA and Masanori KUBO

^{*} School of Agriculture, Meiji University, Higashi-mita 1-1-1, Tama-ku, Kawasaki, 214-8571, Japan

SUMMARY

A 30-day-old piglet showed severe emaciation. Macroscopically, fibrinous pleuropneumonia was detected. Histopathologically, necrotic lesions were found in the pleura, epicardium, and renal medulla, and were surrounded by numerous necrotic neutrophils. Gram-negative bacterial colonies were seen in the lesions. Similar lesions were also observed in the liver, spleen, mesenterium, and brain. Immunohistochemically, the bacteria were positively reacted with rabbit anti *Actinobacillus suis* serum. 16S rRNA gene segment from genomic DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections was amplified, and the base sequence analysis results indicated high homology with *A. suis* (100% similarity, based on a comparison of 650 bp). The present results indicated that *A. suis* caused necrotic pleuropneumonia, epicarditis and nephritis in the piglet.

— Key words : *Actinobacillus suis* infection, Necrotic pleuropneumonia, Systemic infection.

† Correspondence to : Yosuke SASAKI (School of Agriculture, Meiji University)

Higashi-mita 1-1-1, Tama-ku, Kawasaki, 214-8571, Japan

TEL 044-934-7826 FAX 044-934-7902 E-mail : yskssk@isc.meiji.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 381 ~ 384 (2011)