

SPF 豚にみられた豚マイコプラズマ性 肺炎類似所見の検討

静岡県中小家畜試験場 坂野文俊・河原崎達雄・知久幹夫・堀内 篤・曾根 勝
 静岡県家畜衛生研究所 柴田昌利*・溝口 徹 (* 現静岡県畜産課)
 全農家畜衛生研究所 岡田宗典・阪野哲也・佐藤静夫

豚マイコプラズマ性肺炎 (MPS: Mycoplasma pneumoniae of swine) は *Mycoplasma hyopneumoniae* (以下 Mhp) に起因する呼吸器疾病である。本病は日本各地の養豚場に広く浸潤し、発育遅延や飼料効率の低下、さらに二次感染を引き起こす慢性疾病として、養豚産業に甚大な経済的損失を与えている^{6,7,11)}。

写真1は、MhpをSPF豚に実験感染させた際

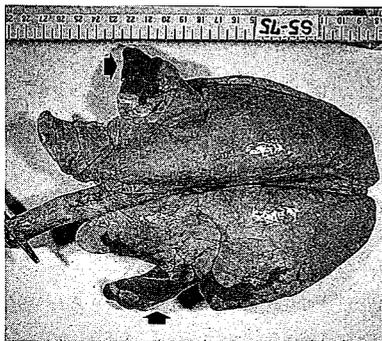


写真1 MPS 肉眼肺病変 (Mhp 実験感染豚), 矢印に示す [原図 全農家衛研]

のMPS肺病変である。病変部は、赤色に肝変化し、特に、前葉、中葉の前縁部に形成されることが多く、健康部の境界が明瞭であるのが特徴である。

一方、SPF環境下において、写真2に示すように、小指の爪ほどの極めて面積が小さいMPSに類似した肉眼所見 (以下MPS様病変) がみられることがある。MPS様病変は、表1に示すとおり、306頭中19頭 (6.2%) にみられた。しかし、呼吸器症状を呈する豚は認められなかった。

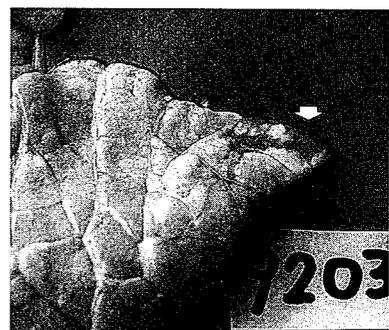


写真2 MPS 様病変, 矢印に示す

表1 MPS 様病変保有率

日 齢	0~30	50	80	120	150	>150	合 計
病 変 保 有	8/53	0/17	0/25	0/18	11/176	0/17	19/306 (6.2%)
呼 吸 器 症 状	0/53	0/17	0/25	0/18	0/176	0/17	0/306
陽性頭数/検査頭数 保有率:(%)							

SPF 豚にみられた豚マイコプラズマ性肺炎類似所見の検討

また、発育成績を、生時からと場出荷までの DG で比較しても、図 1 に示すとおり、病変保有豚は 668g、非保有豚は 678g と、肺病変の有無による発育の差は認められなかった。

さらに、この農場の Mhp 抗体は図 2 に示すとおり、抗体価は極めて低く推移し、感染と思われるような有意な抗体の上昇は認められず、Mhp 感染農場とは思われなかった。

そこで、これら MPS 様病変が、Mhp に起因するものであるか否か解明する必要にせまられたので、病原検索を実施した。

材料と方法

1) 検査材料

同一 SPF 農場の豚を日齢別に鑑定殺し、MPS

図 1 MPS 様病変保有豚の発育成績

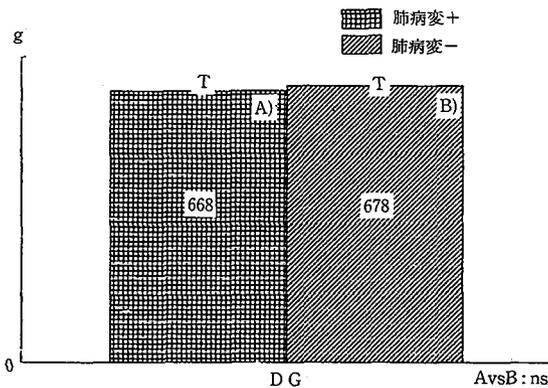
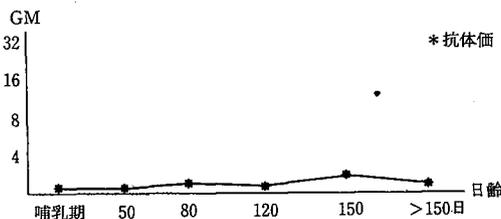


図 2 Mhp (GF) 抗体価の推移



様病変部乳剤19検体、正常肺の気管支肺胞洗浄液 (以下 BALF) 123検体を用いた。

肺乳剤は、病変部乳剤を Hanks 液で10%乳剤とした。正常肺の BALF は、鑑定殺後無菌的に肺を摘出し、滅菌 PBS を肺胞内に注入し洗浄し回収した。また、BALF は生体時においても、気管支ファイバースコープを用いて採取した。採取方法は図 3 に示すように、気管支より MPS 病変が形成されやすい右肺前葉内に可能な限り奥まで進め楔入し、滅菌 PBS で洗浄し回収した (写真 3)。

2) 細菌学的検索

(1) 細菌検査

10%ヒツジ血液加コロンビア寒天培地、変法 S

図 3 豚の肺の気管支分岐 (腹側から) (加藤原図を坂野改図)

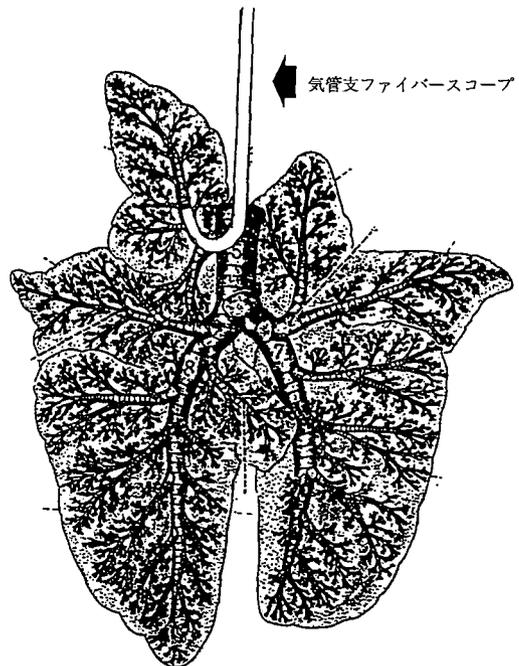




写真3 ファイバースコープによるBALFの採取

培地, マッコンキー寒天培地及びデキストローススターチ寒天培地に材料を接種し培養した。

(2) Mhp 検査

a) 分離培養法

病変部乳剤, BALF を BHL 培地および3%抗 *M. hyorhinis* 家兔血清加 BHL 培地⁷⁾で 10^{-8} まで段階希釈したものを 37°C で15週間培養した。

b) DNA プローブ法

プローブは Mhp 16S r-RNA 遺伝子内の特異領域に相補するオリゴDNA を合成し5'末端を ^{32}P で標識した。ハイブリゼーションはドット法により常法に従って行い, ^{32}P 標識DNAプローブと 60°C 3時間ハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラフィに供した後,X線フィルム上のスポットの強度により判定した^{1,2,3,4)}。

c) PCR 法

Mhp J株 DNA- λ gt11ライブラリーを作製, イムノ・スクリーニング法で46KDa 抗原タンパク質遺伝子の一部を得た。さらに, これを用いて本遺伝子の全領域をクローニングし, 全塩基配列を決定した。このデータを基にプライマーを合成した。検出用DNAの調製及びPCR法は常法に従った⁸⁾。

(3) その他のマイコプラズマ検査

病変部乳剤, BALF を BHL 培地⁷⁾で 10^{-8} まで段階希釈したものを 37°C で15週間培養し, *M. hyorhinis* と *M. flocculare* の分離を試みた。

4) 病理組織学的検査

肺病変部のパラフィン切片を作製し, 常法およびMhp 酵素抗体染色法を行い観察した。

5) MPS 様病変部の接種試験

(1) 接種方法

24日齢のSPF豚10頭を供試し, 接種区5頭と非接種区5頭に分け, 気管支ファイバースコープをもちいて, 病変部乳剤を右肺前葉内に接種した。

(2) 検査方法

1週間隔で経時的にBALFと血清を採取し, 4週間後に剖検を行い, 肺の観察と細菌検査を行った。肺については, 肉眼, 病理組織検査および細菌検査を行い, BALFについてはMhpの分離と出現細胞の種類を検査した。また, 血清については, 補体結合反応による抗体検査を実施し, 4倍以上を陽性と判定した。

成績

1) 細菌学的検索

表2に示すように, MPS様病変部のMhpの検出は培養法19検体, DNAプローブ法18検体, PCR法10検体について全例陰性であった。また, 正常肺のBALFについても, 培養法123, DNAプローブ法64, PCR法29検体全例陰性であった(写真4)。さらに, 多発性漿膜炎や関節炎の起因菌である *M. hyorhinis* および一部肺病変を形成するともいわれている *M. flocculare* も陰性であることが認められた。また, 病変部の細菌検査も全

SPF 豚にみられた豚マイコプラズマ性肺炎類似所見の検討

例陰性であった。

2) 病理組織学的検査

肺病変部の病理組織は、炎症性変化がほとんど認められず、無気肺の状態であり、MPS 病変特有の細気管支周囲のリンパ球ろ胞形成はみられなかった。また、好中球の浸潤もみられず細菌によ

る二次感染は認められなかった (写真5)。

さらに、酵素抗体染色法を実施したが、細気管支上皮に Mhp の抗原は認められなかった。

3) MPS 様病変部の接種試験

表3に示すように、期間中、接種区、非接種区ともに呼吸器症状はみられず、剖検時に肺病変の

表2 細菌学的検査成績

	<i>M. hyopneumoniae</i>			<i>M. hyorhinis</i> <i>M. flocculata</i>		細菌
	培養法	DNA プローブ法	PCR 法	培養法	培養法	
MPS 様病変	0/19	0/18	0/10	0/19	0/19	0/19
BALF	0/123	0/64	0/29	0/123	0/123	NT

陽性/検体数 BALF: 気管支肺胞洗浄液 NT: 検査せず

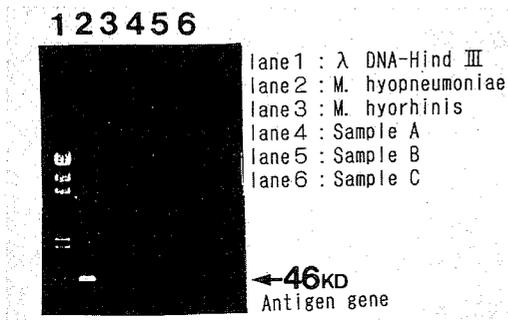


写真4 PCR 法による Mhp の検出試験

1列目は分子量マーカー、2列目は Mhp であり46KD 抗原遺伝子のバンドが認められた。しかし3列目の *M. hyorhinis*, および4列目以降のサンプルである MPS 様病変からの Mhp の検出は陰性である。

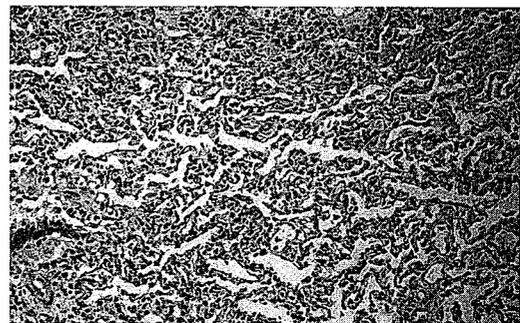


写真5 MPS 様病変病理組織 (150日齢)

炎症性変化は認められず、無気肺を呈す。

表3 MPS 様病変接種試験成績

試験区	供試頭数	呼吸器症状	肺病変	<i>M. hyopneumoniae</i>										細菌分離	
				分 離					抗 体 陽 性						
				0	1	2	3	4(週)	0	1	2	3	4(週)		0
接 種	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
非接種	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



写真6 MPS様病変接種区の肺
肺病変の形成は認められない。

形成は全頭認められなかった(写真6)。またBALFからMhpは分離されず、抗体の上昇も認められなかった。また、肺の細菌検査も陰性であった。

さらに、BALFの出現細胞の推移をみると、図4、5に示すように、接種区は非接種区と同様に、常に肺胞マクロファージが90%以上と優位であり、Mhp感染による好中球、リンパ球の増加は認められなかった。

考 察

近年ヨーロッパ諸国では、SPF養豚場が年5

~10%の割合でMPSに再汚染されていくことが問題となっている¹⁰⁾。そして、その場合には、すべての年齢の豚が発症し、症状も重篤になるといわれている⁹⁾。

今回、SPF豚の6.2%にMPS様病変が検出された。しかし、その病変部の面積は全例とも極めて小さいものであり、また病変保有豚は呼吸器症状がみられず、発育にも影響が認められなかった。マイコプラズマの中でも最も分離培養の困難なMhpの検出において、DNAプローブ法およびPCR法は、検出感度が優れ、かつ迅速に検出が可能な方法であることが報告されている^{1,2,3,4,8)}。

また、Mhp感染の場合、侵入したMhpは気管支の繊毛上皮細胞に付着、増殖し、上皮細胞の繊毛の脱落を起こすことが報告されている⁵⁾。

しかし、今回MPS様病変部および正常肺のBALFからのMhpの検出については、培養法、DNAプローブ法、PCR法、いずれも陰性であり、酵素抗体染色法による気管支の繊毛上皮細胞のMhp抗原検出においても陰性であった。さらに、多発性漿膜炎や関節炎の起因菌である*M. hy-*

図4 BALFにおける出現細胞の推移(接種区)

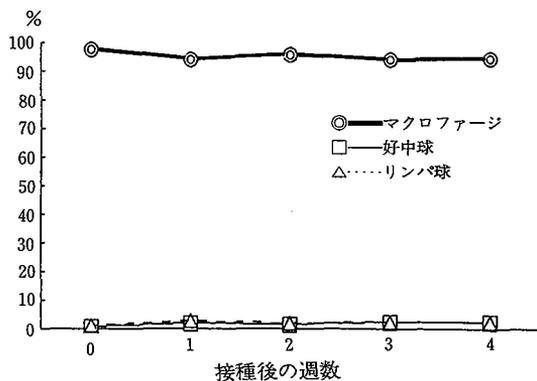
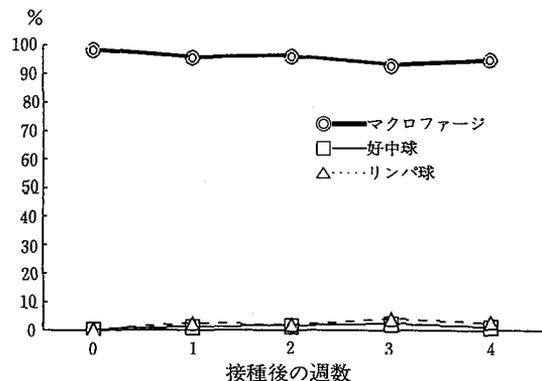


図5 BALFにおける出現細胞の推移(非接種区)



SPF豚にみられた豚マイコプラズマ性肺炎類似所見の検討

orhinis および一部肺病変を形成するともいわれている *M. flocculare* も陰性であることが認められた。また、MPS 様病変部は、その他の細菌についても培養法を実施したが、全例陰性であった。

MPS 病変の病理組織学的特徴は、気管支周囲組織におけるリンパ様細胞の著しい浸潤、また、これらの部位におけるリンパ濾胞の過形成がみられることといわれている^{5,6,7,11)}。しかし、MPS 様病変は、炎症性変化はほとんど認められず無気肺の状態であり、Mhp および微生物感染がうたがわれる所見は認められなかった。

MPS 様病変部の接種試験では、肺病変の形成は認められなかった。また、期間中の BALF からも Mhp をはじめその他病原性細菌の分離は陰性であった。そして、BALF 中の出現細胞は常に肺胞マクロファージが優位であり、Mhp 感染にみられる好中球、リンパ球の増加は認められなかった。

以上より、今回 SPF 豚にみられた MPS 様病変は Mhp およびその他の細菌による肺病変ではないことが明らかになった。

最後に本試験にご指導をいただいた日本獣医畜産大学沢田拓士教授、日生研 八木橋 武先生、ならびに Mhp 酵素抗体染色法をしていただいた農林水産省家畜衛生試験場 久保正法先生、DNA プローブ法 PCR 法をしていただいた日本製粉中央研究所 瀬戸泰裕先生、布藤 聡先生、全農家畜衛生研究所 種田貴至先生に深謝する。

参考文献

- 1) 岡田宗典, 他, (1992). 第19回日本マイコプラズマ学会記録, 44-46.
- 2) 岡田宗典, 他, (1992). 第113回日本獣医学会講演要旨集, 200.
- 3) 布藤 聡, 他, (1992). 第111回日本獣医学会講演要旨集, 193.
- 4) Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S & Mori, Y. (1992). J. Clin. Microbiol., 30, 1509-1513.
- 5) Mebus, C. A. & Underdahl, N. R. (1977). Am. J. Vet. Res., 38, 1249-1254.
- 6) 森 康行, (1987) マイコプラズマ肺炎. 獣医界, 129, 30-36.
- 7) 森 康行, 山本孝史, (1988) ブタのマイコプラズマ. マイコプラズマとその実験法. 編者: 尾形 学 他, 近代出版, 145-157.
- 8) 瀬戸泰裕, 他, (1991). 第111回日本獣医学会講演要旨集, 194.
- 9) W hittlestone, P. (1983). Infectious agents in respiratory diseases of pigs. In the Veterinary Annal. England, 128-136
- 10) W hittlestone, P. (1985). Bull. Inst. Past. 339-373.
- 11) 山本孝史, (1987) マイコプラズマ感染症. 豚病学第3版. 編者: 熊谷哲夫 他, 近代出版, 426-435.