野外豚における *Corynebacterium pyogenes*-protease 沈降抗体の検索

川平 実* 古和嗣男* 弓場照雄* 土井米一郎* 原 文男**

(昭和 50 年 2 月 24 日受付)

A Survey on Anti-protease Precipitin against *Corynebacterium pyogenes* in swine.

MINORU KAWAHIRA, T. KOWA, T. YUBA, Y. TSUCHIE and *F. HARA

(Ezu Livestock Hygiene Service Center and *Animal Health Laboratory, Prefecture of Shimane)

SUMMARY

A field survey was carried out to examine the diagnostic value of the gel precipitation test (GPT) with crude protease as antigen for the infection of swine with *Corynebacterium pyogenes*. The crude protease antigen was prepared from a 72-hour-old culture in modified VL medium incubated under anaerobic conditions.

All pigs bearing abscesses caused by *C. pyogenes* on the body surface were positive for the slide GPT. Old pigs with no visible lesions were also positive

for this test at the rate of 11.2%. The rate of positive reactors to the slide GPT was 2.5% in pigs under 60 days old, 15.1% in pigs more than 70 days old, and 25.0% in breeding sows. The transmission of colostral maternal anti-protease precipitin to baby piglets seemed to be negligible. These findings suggested that the slide GPT with crude protease antigen might be available for an epizootiological survey on corynebacterial infection in swine.

Corynebacterium pyogenes (以下 CP) は、LUCET⁷⁾が牛の膿瘍から本菌を分離して以来、多くの研究者¹¹⁾によって各種動物の化膿巣から分離されている。WARD¹⁷⁾は豚の多発性関節炎、肺その他の臓器の化膿巣から本菌を分離し、わが国においても豚の体内および体表局所の化膿巣から本菌を分離した報告例は少なくない^{1,4,5,10,12,14,16)}。

LOVELL¹⁰⁾は CP の培養液中に産生される Hemolysin とウサギ赤血球を用いて各種動物の Anti-hemolysin titer を測定し、この方法は Herd の CP 感染を知るために有用であると報告した。また、宮城⁹⁾は CP の多糖体を用いた間接血球凝集反応によって CP 感染を知り得ることを報告した。

最近竹内¹⁵⁾は、CP 培養上清の crude-protease 活性成分を抗原として、化膿巣の形成あるいは CP 感染を受けた豚の血清について寒天ゲル内沈降反応を試み、本反応系は CP 感染症の血清学的診断に応用可能であることを示唆した。今回著者は、本反応系を野外例に応用し、日齢別および豚群別に主として同一豚を追跡調査し体表から認められる膿瘍の発生観察と抗 CP-crude protease 沈降抗体の検出を行ない、さらに移行抗体の本反応系への影響について検討した。また、検体として吸血汙紙 (Blood Sampling Paper, 以下 BSP) を応用した場合 (BSP 法) と分離血清を応用した場合 (Serum 法、以下 S 法) の比較も試みた。

材料および方法

検査期間：本検査は昭和 49 年 6 月から 11 月の期間に実施された。

検査豚：島根県江津家畜保健衛生所管内の一貫経営の養豚家 19 戸を選び、これらの農家が飼養中の繁殖豚、哺乳中の子豚とその母豚および 60 日齢の子豚を無作為に抽出して検査に供した。

CP-crude protease (CP-P)：CP の野外株を変法 VL 液体培地に 37℃ で 72 時間嫌気培養し、竹内¹⁵⁾の方法によって CP-P を用意した。-20℃ に凍結保存し、後述の寒天ゲル内沈降反応の検査時に pH 7.2 の M/15-リン酸塩緩衝液 (CP-P) で 4 倍に希釈して用いた。

図1 S法、抗原 No.1 と血清 No. 2, 3, 4
Ba 抗原 No.8 と血清 No. 9, 10, 11 と
の間に沈降線が認めれる。

* 島根県江津家畜保健衛生所 (島根県江津市郷田)

** 島根県家畜衛生研究所 (島根県出雲市塩冶町)

図2 BSP法, 抗原紙 No.1 と吸血紙 No.5, 6 との間に沈降線が認められる。

血清: 繁殖豚を含む 60 日齢以上の豚は耳静脈から, 哺乳中の子豚は森井ら⁹⁾の方法によって 1~2 ml 採血し, その一部は BSP に応用し, 他は血清分離に用いた。BSP は室温で乾燥したのち, 直ちにビニール袋に密封して 4℃ に保存し, 血清は -20℃ に凍結保存して検査に用いた。

寒天ゲル内沈降反応法: S 法では, スライドガラス上に溶解した 0.5% 寒天液を 1 ml 均等に流し 37℃ で一夜乾燥したのち, さらに溶解した 1% 寒天加 PBS を 2~3 ml 均等に流し, 適度にかためたゲル上にストローで 3.5mm~4.0mm の穴を図 1 に示すように作り, 中央に抗原液をその周囲に血清を入れて 25℃~30℃ で 3 日間乾燥を防ぎながら反応させ沈降線をルーペで観察した。BSP 法では, シャーレ内に 1% 寒天加 PBS ゲルを作り, 図 2 に示すように直接 BSP をゲル上に応用し, S 法と同様に 25℃~30℃ で 4 日間反応させ判定した。

成 績

1. 繁殖豚の CP-P 沈降抗体検出成績

可能な限り産次の新旧が pair なるように, 管内の一貫経営の養豚家 11 戸から各 2~3 頭の繁殖豚を選び, 体表から認められる膿瘍 (体表膿瘍) の発生を観察するとともに, CP-P 沈降抗体の出現を調べた成績を表 1 に示した。

体表膿瘍は 32 例中 2 例に認められ, そのうちの 1 例では BSP 法と S 法の 2 反応で沈降線が認められ, 他の 1 例では 2 反応ともに陰性を示した。この陰性例の局所の病巣は血様水様液を含み, CP 感染時に認められる膿瘍とは異なっていた。

いっぽう, 体表膿瘍の認められなかった 30 例の CP-P 沈降抗体の検出では, BSP 法で 2 例, S 法で 7 例が陽性を示した。BSP 法で陰性で, S 法では陽性のものが 5 例みられ, S 法の抗体検出率が高かった。豚群によって沈降抗体検出率に差が認められた。

表 1 繁殖豚の CP-P 沈降抗体検出

豚群 No.	母 豚		検 査 成 績		
	No.	産次	体表膿瘍	BSP 法	S 法
1	G-2	1	—	—	—
	G-1	4	—	—	—
6	G-28	1	—	—	—
	G-24	1	—	—	—
	G-32	2	—	—	—
	G-36	5	—	—	—
3	G-15	1	—	—	—
	G-14	3	—	—	—
	G-13	4	—	—	+
9	VII	0	—	—	—
	VIII	0	—	—	—
	IX	1	—	—	—
	X	1	—	—	—
10	I	1	—	—	+
	II	2	—	+	+
	III	4	—	+	+
11	V	1	—	—	—
	VI	2	—	—	—
	IV	4	—	—	—
13	S-I	1	—	—	—
	S-II	1	—	—	—
	S-III	2	—	—	—
	S-IV	3	—	—	—
14	A-1	1	—	—	+
	A-8	2	—	—	+
	A-4	3	—	—	—
15	A-9	3	—	—	—
	A-13	3	—	—	+
16	M-1	4	+	—	—
	M-2	6	—	—	—
17	M-4	1	—	—	—
	M-5	2	+	+	+
陽性率 (%) *			3.1	6.3	25.0

* (陽性数/82頭) × 100

2. 肉豚の CP-P 沈降抗体検出成績

肉豚として育成中の子豚例について 60 日齢時と 120 日齢時の 2 回検査した成績を表 2 に示した。

体表膿瘍の認められた 1 例は, 2 回の検査とも BSP 法と S 法の 2 反応に陽性を示した。体表膿瘍の認められなかった 52 例では, 60 日齢時の検査で BSP 法で 1 例, S 法で 6 例が陽性を示し, 120 日齢時の検査では BSP 法で 2 例, S 法で 7 例が陽性を示した。60 日齢では無症状豚の 6 例が S 法で陽性, BSP 法陰性を示し, S 法による抗体検出率がすぐれたが, 120 日齢では前回 S 法陽性で BSP 法陰性例 6 例のうち 2 例が S 法と BSP 法の 2 反応に陽性を示した。

表 1 の成績と同じく S 法の抗体検出率が高かった, この成績でも豚群によって沈降抗体検出率に差が認められた。

3. 母・子豚の CP-P 沈降抗体検出成績

一貫経営の養豚家 6 戸からそれぞれ 2~3 頭の繁殖豚とその子豚 2~3 頭を pair で無作為に選び, 生後 10, 90 および 150 日の 3 回 CP-P 沈降抗体の出現と体表膿

表2 肉豚の CP-P 沈降抗体検出

豚群 豚 No.		検査日齢と成績					
		60 日			120 日		
		体表 膿瘍	B S P 法	S 法	体表 膿瘍	B S P 法	S 法
No.							
2	(10頭)	—	—	—	—	—	—
4	(8頭)	—	—	—	—	—	—
7	H-10	—	—	—	—	+	+
	11	—	—	—	—	—	—
	12	—	—	+	—	—	+
	13	—	—	—	—	—	—
	14	—	—	+	—	—	+
8	15	—	—	—	—	—	—
	H-25	+	+	+	+	+	+
	26	—	—	—	—	—	—
	27	—	—	—	—	—	—
	28	—	—	—	—	—	—
	29	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	—	—
	31	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—
	33	—	—	+	—	—	+
34	—	—	—	—	—	—	
12	(5頭)	—	—	—	—	—	—
13	(5頭)	—	—	—	—	—	—
18	M- 5	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	+	—	+	+
	7	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—
19	M- 9	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	—	—	—
	12	—	—	+	—	—	+
	13	—	—	+	—	—	+
陽性率(%) *		1.9	1.9	13.2	1.9	5.7	15.1

陽性率(%) * 1.9 1.9 13.2 1.9 5.7 15.1

* (陽性数/53頭) × 100

瘍の発生をしらべた成績を表3および表4に示した。

体表膿瘍はこれら豚群の追跡調査中母豚および子豚の全例に認められなかった。母豚ではS法で9例中6例が3回の検査時を通して陽性を示した。いっぽう、CP-P沈降抗体陽性を示した母豚の子豚16例では10日齢時の検査で1例陽性であったが、以後の検査で陰転した。いっぽう、CP-P沈降抗体陰性の母豚の子豚では、9例全例が検査中陰性であった。

4. 各日齢豚の CP-P 沈降抗体検出成績

日齢別にCP-P沈降抗体検出を試みた成績を表5に示した。

今回検査した60日齢以下の子豚、70日齢以上の肉豚および120日齢以上の繁殖豚の全頭について、S法による検出率で比較すると、その検出率は日齢の増加とともに高くなり、畜舎に長期に飼養される繁殖豚において最も高く64例中16例に陽性を認め、16%を示した、今回調査した250例中33例が陽性を示し13.2%の検出率であった。

表3 母・子豚の CP-P 沈降抗体検出(1)

豚群		検査日齢と成績									
		豚 No.	10日			90日			150日		
			体表 膿瘍	B S P 法	S 法	体表 膿瘍	B S P 法	S 法	体表 膿瘍	B S P 法	S 法
No.											
10	母豚 I	—	—	+	—	—	+	—	—	+	
	子豚 {	1	—	—	—	—	—	—	—	—	
		2	—	—	—	—	—	—	—	—	
		3	—	—	—	—	—	—	—	—	
	母豚 II	—	+	+	—	+	+	—	+	+	
	子豚 {	4	—	—	—	—	—	—	—	—	
		5	—	—	—	—	—	—	—	—	
		6	—	—	—	—	—	—	—	—	
	母豚 III	—	+	+	—	+	+	—	+	+	
	子豚 {	7	—	—	—	—	—	—	—	—	
8		—	—	+	—	—	—	—	—		
9		—	—	—	—	—	—	—	—		
11	母豚 IV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	子豚 {	16	—	—	—	—	—	—	—	—	
		17	—	—	—	—	—	—	—	—	
		18	—	—	—	—	—	—	—	—	
	母豚 V	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	子豚 {	19	—	—	—	—	—	—	—	—	
		20	—	—	—	—	—	—	—	—	
21		—	—	—	—	—	—	—	—		

表4 母・子豚の CP-P 沈降抗体検出(2)

豚群 豚 No.		検査日齢と成績								
		10日			20日			150日		
		体表 膿瘍	B S P 法	S 法	体表 膿瘍	B S P 法	S 法	体表 膿瘍	B S P 法	S 法
14	母豚 A 1	—	—	+	—	—	+	—	—	+
	子豚 {	2	—	—	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—	—	—
	母豚 A 4	—	—	+	—	—	+	—	—	+
	子豚 {	5	—	—	—	—	—	—	—	—
		6	—	—	—	—	—	—	—	—
		7	—	—	—	—	—	—	—	—
15	母豚 A 9	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	子豚 {	10	—	—	—	—	—	—	—	—
		11	—	—	—	—	—	—	—	—
		12	—	—	—	—	—	—	—	—
	母豚 A 13	—	—	+	—	—	+	—	+	+
	子豚 {	14	—	—	—	—	—	—	—	—
		15	—	—	—	—	—	—	—	—

考 察

野外豚の血中CP-P沈降抗体の出現と体表膿瘍の発生との関係を日齢別および豚群別に追跡検査した。

CP-P沈降抗体は表1、表2および表5に示すように、体表面に膿瘍性疾患の認められた豚では1例を除き全例から検出された。この事実は、竹内ら¹⁵⁾、と畜場材料で検査した原ら⁵⁾および三代ら¹⁵⁾の成績と一致してい

表5 日齢別のCP-P沈降抗体検出率

検査豚			検査成績			検出率 *
日 齢	豚 群	頭 数	体表膿瘍	B S P 法	S 法	
子 60 日 以 下	A	24	0	0	2)	2.5
	B	36	0	0	0)	
	C	20	0	0	0)	
	計	80	0	0	2	
肉 70 日 以 上	D	36	0	0	0)	15.1
	E	32	2	0	10)	
	F	20	0	0	0)	
	G	18	0	0	6)	
	計	106	2	6	16	
繁 殖 240 日 以 上	H	18	0	0	2)	25.0
	I	20	0	4	6)	
	J	8	0	0	0)	
	K	10	0	0	6)	
	L	8	4	0	2)	
	計	64	4	4	16	
合 計		250	6	10	33	13.2

* S法による検出率

る。他方、今回の試験では、体内局所における膿瘍形成の有無が生体検査のため検査不能であったため、体表膿瘍の認められなかった豚に出現したCP-P沈降抗体の意義、今後の検討課題であろう。

CP-P沈降素は豚群によって検出率が異なり、さらに日齢と平行して高くなる傾向を示した。この傾向は LovELL⁹⁾が各種動物のCP-antihemolysin titerを測定して得た成績でも確認されている。これらの事実、一貫経営養豚に飼育される豚群のCP感染の推移は、比較的長期に飼養される繁殖豚を中心として検査を実施することで、把握可能なことを示唆するものと考えられる。

表3および表4に示したように、本反応系によって検出される移行抗体の出現は極めて低かった。このことから10日齢以上の子豚から検出されるCP-P沈降抗体は、概ね移行抗体ではなくCPの関与を示唆するものと考えられよう。

S法とBSP法の検出率をみた成績は、BSP法に比し、S法において高い傾向を示した。その差は表2に示されるように60日齢時検査より120日齢時検査において縮小された。このことは、S法では抗体の拡散が容易に行なわれるが、BSP法では濾紙からの抗体の拡散効率がS法に比較して劣るためと考えられる。このためS法で抗体価が高いものではBSP法でも反応するが、S法で抗体価が低いものはBSP法で陽性にでないことが予想され、膿瘍の発生が極めて少ない豚群での本反応系によるCP感染症の予察的検査には、S法が有力な検査手段であると考えられる。

CPによる豚の疾病に関する報告は、数多くみられ、膿瘍の病因は本菌の感染症とみる報告^{4,16,18,19)}と最近の

嫌気培養性の進歩により本菌以外の病原体も含めて検討する報告^{2,3,12,14)}がみられる。これらの報告は、病原側からみてCPが膿瘍形成過程に関与しており、CPと本菌以外の病原体との混合感染により膿瘍形成が完成されることを示唆していると考えられる。しかし病原体と宿主の関連において、膿瘍の発生あるいは形成機序に関する実験的に証明は未だない。

寒天ゲル内沈降反応、あるいはもっと感度の高い間接血球凝集反応法などによって抗体の検出を試みることは、宿主が病原に対してどのように反応しているかを知るひとつの手段であり、これらの疑問の解明に資すると考えられる。この際どの抗原を用いるべきか検討すべきであるが、抗原成分は可能な限り精製され、標準化されることが要望される。

ま と め

竹内ら¹⁵⁾のゲル内沈降反応を参照し、血清法S法と吸血濾紙法(BSP法)を用いて、管内の養豚場に飼育される豚について、抗*Corynebacterium pyogenes* protease沈降抗体の出現をしらべ、体表病巣の有無との関係を検討するとともに2, 3の調査を実施した。その結果以下の成績を得た。

1) CP-P沈降抗体は、体表膿瘍の認められた豚では1例を除き7例に、膿瘍の認められなかった豚でも11.2%検出された。

2) CP-P沈降抗体検出率は60日齢以下の子豚で2.5%、70日齢以上の肉豚で15.1%、240日以上繁殖豚で25.0%であった。

3) CP-P沈降抗体の検出ではS法がBSP法より鋭敏であった。

4) 移行抗体は10日齢の子豚6群、16例中1例にのみ認めた。

以上の成績と関連し若干の考察を行なった。

本論文に関して、多大なご助言とご校閲を賜った農林省家畜衛生試験場東 量三・竹内正太郎両氏、島根県家畜衛生研究所岩田明敏氏に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 東 量三, ほか: 水曜会記事, 7. 2 (1953).
- 2) 東 量三: 畜産の研究, 24, 1212, 1300 (1970).
- 3) BIBERSTEIN, E.L. et al.: *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 153, 1045, (1968).
- 4) 平棟孝志, ほか: 日獣会誌, 15, 111 (1962).
- 5) 原 文男, ほか: 島根県畜産関係機関業績報告会集録, p. 32 (1974).
- 6) LOVELL, R. J.: *J. Path. Bact.*, 49, 329 (1939).
- 7) LUCET, A.: *Ann. Inst. Pasteur.*, 7, 325 (1893).
- 8) 宮城哲元: 家畜診療, 120, 13 (1973).
- 9) 森井武男, ほか: 日獣会誌, 25, 123, (1972).
- 10) 三代英俊, ほか: 島根県畜産関係機関業績報告会集録, p. 38 (1973).
- 11) PURDOM, M. R. et al.: *Vet. Rev. & Annotations* 4, 15 (1958).
- 12) 笹原二郎, ほか: 水曜会記事, 3. 93

(1953). 13) 柴田重孝：日獣会誌，16，128 (1963). 14) 鈴木達郎，ほか：日獣会誌，26，188 (1973). 15) 竹内正太郎，ほか：第76回日本獣医学会抄録，p.25，(1973). 16) 上田貞善，ほか：日獣会誌，25，125 (1963). 17)

WARD, A.P.: *J. Bact.*, 2, 619 (1917). 18) 米谷武士，ほか：日獣会誌，23，716 (1970). 19) 安井，ほか：第60日本獣医公衆衛生学会講演要旨，p.58 (1963).

Haemophilus parahaemolyticus の感染による豚の胸膜肺炎例について

尾田 進* 鶴巻藤太郎* 渡辺藤四郎* 鍋谷政広* 安原敏治*

富所寿男* 宮田萬司* 神野一夫** 池村謙吾***

(昭和50年4月1日受付)

Pleuropneumonia in Swine Caused by Infection with *Haemophilus parahaemolyticus*
SUSUMU ODA, T.TSURUMAKI, T. WATANABE, M. NABETANI, T. YASUHARA, H. TOMIDOKORO,
M. MIYATA K. IKEMURA *K. KAMINO

(Chuo and Kambara Livestock Hygiene Service Centers, *Hygienic Laboratory Prefecture of Niigata)

SUMMARY

Expectant breeding swine weighing 100~120 kg died suddenly. Autopsy revealed that they were suffering from fibrinous pleuropneumonia caused by infection with *Haemophilus parahaemolyticus*. SPF swine on an infection experiment manifested the same symp-

tomies and postmortem changes as the clinical cases. The isolated organism was shown to be highly susceptible to aminobenzyl penicillin, chloramphenicol, erythromycin, oxytetracycline, tetracycline, furazolidon, and nitrofurantoin.

近年、豚の流行性肺炎 (SEP)^{7,9,10,13,19)} と異なる所見を呈する肺炎，すなわち，線維索性胸膜肺炎型の流行例について，大村ら(1972)¹⁴⁾は福井県で，また，淵上ら(1972)⁶⁾は長崎県で類似した疾病の発生例を報告し，病原検索の結果，いずれも *Haemophilus suis* の感染によるものであろうと述べている。

私どもは昭和47年12月，新潟県下の一養豚場で種豚候補豚として育成中の雌豚の急死例に遭遇し，病原検索を行なった結果，*Haemophilus parahaemolyticus* の感染による線維索性胸膜肺炎であることを知ったので，その成績を報告する。

材料および方法

可検材料：種豚候補豚として育成中に急死した。体重100~120 kg の雌豚2頭と，鑑定殺を行なった1頭，計3頭を供試した。

病理解剖および組織学的検査：上記の3頭を剖検し，各臓器を採材，10%ホルマリンで固定し組織標本を作成，ヘマトキシリン・エオジン染色を行ない鏡検した。

細菌学的検査：各臓器を可検材料とし，それぞれ10%血液寒天培地，普通寒天培地およびマツコンキー培地に

塗抹し，37℃で24~73時間培養した。また，血液寒天培地に塗抹した1枚は10% CO₂ 含有のジャー内で37℃で5~7日間培養を行なった。分離はそれぞれ，グラム染色を行ない菌型を確かめたのち同定区分した。

肺から多数分離された *Haemophilus* については Mφ-URRA の方法¹²⁾により，莢膜の有無を確かめ，*Staphylococcus* による衛星現象，溶血性の有無，XおよびV因子の要求性を検査し，さらに生化学的性状の検査ならびに一濃度ディスク (昭和) による各種薬剤に対する感受性についても検査を行なった。なお，これらの各種検査には分離 *Haemophilus* が，V因子要求性であったことから，各培地にV因子を添加して試験を行なった。

XおよびV因子は荒井²⁾の方法に準じて作成した。すなわち，X因子はウサギの脱線血50 mlに濃塩酸でpH 1.5に修正した生理食塩液を150 ml加え，さらにペプシン1.5 gを加え55℃で24時間消化後，5N-NaOHでpH 7.6に再修正し4,000 rpm 30分間遠沈し，その上清を120℃ 15分間高圧滅菌して作成した。V因子はドライ・イースト50 gに0.2 M-KH₂PO₄ 溶液100 mlを加え85℃で20分間加熱後，3,000 rpm 10分間遠沈し，上清をpH 7.2に調整しSeitz 濾過滅菌して作成した。これらの両因子は氷室に保存し用いるのぞみ，各培地に5%あて添加した。

分離菌の病原性の検討：体重40 kg前後のSPF豚2頭をもちい感染実験を行なった。感染の方法は5%，V

* 新潟県中央家畜保健衛生所 (新潟県西蒲原郡西川町大字川崎)

** 新潟県蒲原家畜保健衛生所 (新潟県三条市大字北入蔵)

*** 新潟県衛生研究所 (新潟市曾和字古川314-1)