コンベンショナルおよび SPF 養豚場における

Haemophilus parasuis の汚染状況

天野 弘^{*1)} 梶尾規一¹⁾ 土屋 守¹⁾

柴田昌利¹⁾ 佐野幸男¹⁾ 杉山源吾²⁾

1) 静岡県家畜衛生研究所 (静岡県藤枝市青葉町 1-4-25, 〒426)

2) 静岡県中小家畜試験場 (静岡県菊川町西方 2780, 〒439)

(平成 4 年 12 月 16 日受付・平成 5 年 7 月 27 日受理)

Bacteriological and Serological Survey for *Haemophilus parasuis* in Conventional and SPF Pig Farms

Hiroshi AMANO^{*1)}, Norikazu KAJIO¹⁾, Mamoru TSUCHIYA¹⁾, Masatoshi SHIBATA¹⁾,
Sachio SANO¹⁾ and Gengo SHUGIYAMA²⁾

1) Institute of Animal Health, Shizuoka Prefecture, Fujieda-shi, Shizuoka-ken 426, Japan

2) Swine and Poultry Experimental Station, Shizuoka Prefecture, Kikugawa-cho,
Shizuoka-ken 439, Japan

SUMMARY

Haemophilus parasuis was isolated from the nasal cavity in 257 of 318 (80.8%) conventional pigs reared in 12 conventional farms in Shizuoka Prefecture, whereas 3 SPF farms were negative. Fifty-one (83.6%) and 10 (16.4%) of 61 isolates examined were shown to be of types I and II, respectively, by polyacrylamide-gel electrophoresis. Complement-fixation (CF) antibody against *H. parasuis* was detected in 171 of 203 (87.4%) conventional pigs, whereas 98 SPF pigs examined were negative for the antibody. Of the slaughter house pigs 278 cases examined had the CF antibody, while no correlation between the antibody titers and chronic serositis was demonstrated.—**Key Words** : Glasser's disease, *Haemophilus parasuis*, SPF pig.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 46, 913~916 (1993)

要 約

静岡県下の健康なコンベンショナル豚 318 頭 (12 養豚場) 中 257 頭 (80.8%) から *Haemophilus parasuis* が分離されたが, SPF 豚 98 頭 (3 養豚場) はすべて陰性であった。分離菌の PAGE 型は, 61 株中 51 株 (83.6%) が I 型, 10 株は II 型であった。コンベンショナル豚の CF 抗体保有率は 87.4% であり, SPF 豚は全例が抗体陰性であった。調べたと畜場出荷豚 278 頭は全例抗体陽性であったが, 漿膜炎の有無と抗体価との関連性は見出されなかった。

——**キーワード** : グレーサー病, *Haemophilus parasuis*, SPF 豚。

-----日獣会誌 46, 913~916 (1993)

Haemophilus parasuis はグレーサー病の起因菌であるとともに^{6, 11)}, 豚の敗血症や肺炎を起こすことが知られている^{7, 9, 16)}。グレーサー病は線維素性多漿膜炎を特徴とする豚の疾病で世界各地で発生がみられる¹¹⁾。本病はコンベンショナル豚において離乳や輸送等のストレスが誘因となり, 子豚に散発的に発生する^{6, 11)}。しかしながら, 本菌は SPF 豚に対しては強い病原性を有し, 高い罹患率と死亡率を示すと報告されている^{11, 15, 16)}。そのため, SPF 豚の生産が盛んであるヨーロッパでは本病

は豚の重要な疾病の一つとして注目されている^{13, 15)}。わが国においても MORIKOSHI⁵⁾ らおよび著者ら¹⁾ は SPF 豚での発生例に遭遇し, 罹患率および死亡率とも高かったことを報告した。また, *H. parasuis* はコンベンショナル豚に広く浸潤していることが知られている^{6, 11, 12)}。NIELSEN¹²⁾ および RIISING¹⁵⁾ はコンベンショナル豚のほとんどが抗体を保有しているのに対し, SPF 豚の抗体保有率が低いことを報告している。わが国ではコンベンショナル豚の鼻腔からの *H. parasuis* 分離および抗体保

* 現住所 : 静岡県農政部畜産課 (静岡県追手町 9-6 〒420)

* Present address : Livestock Section of Agricultural Department, Shizuoka Prefecture, Shizuoka-shi, Shizuoka-ken, 420

有状況については報告がみられるが^{2,4,8)}, SPF 豚を対象にした抗体調査の報告は見当たらない。

今回, *H. parasuis* の浸潤状況を知る目的でコンベンショナル豚および SPF 豚の鼻腔から *H. parasuis* を分離し, 抗体保有状況について調査するとともに分離菌の PAGE 型¹⁰⁾について検査を実施した。

材料および方法

検査材料

コンベンショナル豚および SPF 豚の鼻腔からの *H. parasuis* の分離および抗体保有状況の調査は 1989 年 4～10 月に実施した。コンベンショナル豚の検査対象は静岡県下の種豚 50～120 頭飼育規模の一貫経営の 12 農場に飼育されている外見上健康な豚計 318 頭であった。SPF 豚の検査対象豚は静岡県中小家畜試験場が作出し, 静岡県下の SPF 養豚場 3 戸で飼育されている健康豚計 98 頭であった。調査対象農場のいずれにおいても過去にグレーサー病の発生はなかった。鼻腔からの菌分離は 1 農場当たり無作為に抽出した 30 日齢未満の哺乳豚とその母豚, さらに 50, 80, 120, 150 日齢の各々 3～5 頭について実施した。これらのうち定量培養はコンベンショナル豚では 7 農場 55 頭, SPF 豚では 1 農場 25 頭について行った。抗体検査は 30 日齢未満の豚を除く菌分離に供試した豚全頭について実施した。

と畜場出荷豚の調査では 1990 年 9～11 月に静岡県下の A 食肉センターに健康豚として出荷された 1,331 頭について肉眼的検査を実施した。このうち漿膜炎を有していた 239 頭, 対照として肺炎の認められた 39 頭および無病巣豚 24 頭について補体結合 (CF) 抗体検査を実施した。

細菌学的検査

H. parasuis の分離培養には澤田ら³⁾の S 培地から新鮮酵母エキスを, ヘミンおよびプロムクレソールパーブルを除き β -NAD を増量した培地 (変法 S 培地) を用いた。組成は鶏肉液 10%, カザミノ酸* 0.5%, ポリペプトン S* 0.5%, 塩化ナトリウム 0.5%, 寒天末 1.5%, 鶏血清 5%, β -NAD* 0.02% であった。鼻腔からの *H. parasuis* 分離では滅菌綿棒で鼻腔を拭い, それをペプトン液に浸漬し冷蔵して実験室に輸送した。輸送後, 浸漬したペプトン液 50 μ l を変法 S 培地に塗布した。なお, 定量培養ではペプトン液で 10 倍段階希釈し, 各希釈液の 50 μ l を培地に塗布した。37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養した後, 実体顕微鏡下で斜光によりコロニーを観察し, 疑わしいものを釣菌した。釣菌した菌を各種性状検査に供試し, 衛生現象陽性, CAMP テスト陰性, カタラー

ゼ陽性およびウレアーゼ陰性を示したものを *H. parasuis* と同定した。また, 定量培養で 18 時間後に発育した総コロニー数を総菌数とした。

分離菌の SDS-PAGE 型別は LAEMMLI¹⁴⁾ の法に従い 15% ゲルを用いて 8 農場のコンベンショナル豚の鼻腔由来 61 株について実施した。判定は MOROZIMI ら¹⁰⁾ および両角⁷⁾ の報告に従って I および II 型に分類した。

血清学的検査

CF 反応は農林水産省家畜衛生試験場から分与された *H. parasuis* 長崎株 (血清型 5, PAGE 型 II) の 100°C 加熱抗原⁹⁾を用いてマイクロプレート法で実施した。被検血清は 60°C, 30 分間非働化し, 3% 羊血球, 3 単位の溶血素および 2 単位の補体を使用し, 補体には新鮮子牛血清を 1% 添加した。判定は 50% 以上の溶血阻止がみられた最高希釈倍数を CF 抗体価とし, 抗体価 4 倍以上を抗体陽性と判定した。

成 績

鼻腔からの *H. parasuis* 分離

コンベンショナル豚の鼻腔からの *H. parasuis* の分離成績を図 1 に示した。検査した全農場の豚から *H. parasuis* が分離され, 各農場での分離率はいずれも 60% 以上であった。分離率を日齢別にみると, 30 日齢未満, 50 日齢および 80 日齢の子豚は 95% 以上と高く, 日齢が進むに従って分離率が低下する傾向にあった。いっぽう, SPF 農場の豚から *H. parasuis* は分離されなかった。図 2 にコンベンショナル豚および SPF 豚の鼻腔からの総分離菌数と *H. parasuis* の分離菌数を示す。若齢期 (< 30, 50 および 80 日齢) における *H. parasuis* の分離菌数は 1 スワブ当たり $10^6 \sim 10^7$ colony forming unit (CFU) と高く, 総菌数とはほぼ同程度の菌数であった。120 日齢および 150 日齢の肥育豚の総菌数は子豚と同程度であったが, *H. parasuis* の分離菌数は子豚より低か

図1 健康なコンベンショナル豚の鼻腔からの *H. parasuis* 分離状況

* カザミノ酸: Difco Laboratories, U.S.A.

* ポリペプトン S: 日本製薬(株)

* β -NAD: オリエンタル酵母工業(株)

図2 健康なコンベンショナル豚の鼻腔からの総分離菌数と *H. parasuis* 分離菌数

表1 豚鼻腔由来菌株のPAGE型別

農場	株数	I型	II型
A	9	8	1
B	4	2	2
C	6	4	2
D	15	13	2
E	8	6	2
F	11	11	0
G	4	4	0
H	4	3	1
計	61	51	10
(%)		(83.6)	(16.4)

注) 1頭から1株分離

った。いっぽう、SPF豚の鼻腔からの総分離菌数はいずれの日齢においてもコンベンショナル豚に比べて著しく低い傾向にあった。A～H農場から分離された61株のPAGE型別ではI型菌が51株(83.6%)で、残り10株(16.4%)はII型菌であった。II型菌は8農場中6農場から分離された(表1)。

血清学的検査

コンベンショナル農場の全例に抗体保有豚がみられ、203頭中171頭(87.4%)が陽性であった。各農場の豚の抗体保有率は57.9%から100%と高く、C、F、GおよびLの4農場では保有率100%であった(図3)。日齢別の平均抗体保有率では50日齢で69.0%と他に比べてやや低かったが、それ以降の日齢ではいずれも高率であった。母豚の抗体保有率は70.2%であった。

抗体価の分布をみるとほとんどの豚の抗体価は4倍から32倍であり、64倍以上の高い抗体価を持つ豚は8頭(3.9%)とわずかであった(表2)。各農場における抗体

図3 健康なコンベンショナル豚のCF抗体保有状況

表2 コンベンショナル豚のCF抗体価の分布

農場名	検査頭数	抗体価						
		<4	4	8	16	32	≥64	GM
A	15	2	0	3	4	4	2	14.9
B	15	2	1	3	7	2	0	10.5
C	15	0	0	6	5	4	0	14.9
D	20	5	4	6	1	4	0	7.0
E	23	1	5	13	2	1	0	6.7
F	13	0	0	4	6	3	0	14.9
G	19	0	0	0	7	9	3	27.9
H	19	6	4	1	2	0	3	4.8
I	18	4	2	6	5	1	0	10.7
J	14	5	2	4	2	1	0	7.4
K	14	4	5	2	3	0	0	5.6
L	18	0	0	2	7	9	0	20.9
計	203	32	23	50	52	38	8	13.5
	(%)	(15.6)	(11.2)	(24.5)	(25.5)	(18.6)	(3.9)	

注) GM: 幾何平均

表3 漿膜炎が認められたと畜場出荷豚のCF抗体保有状況

漿膜炎の有無	病変内訳	頭数	抗体価							幾何平均
			4	8	16	32	64	128	≥256	
有	心外膜炎	6	0	0	2	2	2	0	0	32.0
	胸膜炎	124	1	5	35	43	33	4	3	32.4
	腹膜炎	31	0	2	5	14	7	3	0	35.0
	多漿膜炎 ¹⁾	78	1	5	17	30	19	6	0	31.8
	計	239	2	12	59	89	61	13	3	32.4
無(対照)	肺炎 ²⁾	39	0	2	17	9	8	3	0	28.2
	無病巣	24	0	2	8	4	7	2	1	33.8
	計	63	0	4	25	13	15	5	1	30.3

¹⁾: 複数の漿膜炎病巣を保有 ²⁾: *Mycoplasma* 性肺炎, 結節性膿瘍等

価の幾何平均は15倍以下であったが、GおよびL農場ではそれぞれ27.9倍および20.9倍とやや高い傾向にあった。いっぽう、SPF農場では抗体保有豚は認められなかった。

と畜場出荷豚の病変別に分類した豚の抗体価の分布状

況を表3に示した。出荷豚の全例が抗体を保有していた。漿膜炎病巣をもつ豚の幾何平均は32.4倍で、肺炎および無病巣豚の30.3倍に比べやや高い傾向にあったが有意な差ではなかった。また、漿膜炎をもつ豚の中に128倍以上の高い抗体価を示す例は16例(6.7%)と少なかった。

考 察

わが国における豚の鼻腔内からの *H. parasuis* の分離率は44~70%と記載されている^{4,8)}。今回の調査では本菌はコンベンショナル農場の全例において高率に分離され、そのほとんどが分離率80%以上であり、過去の報告例に比べて高かった。このことについては地域や時期による違いもあり得るが、使用した変法S培地が菌分離に好適であったためとも考えられる。また、分離菌数も $10^4 \sim 10^7$ CFU/swabと多く、日齢別では若齢なほど分離率および分離菌数ともに高い傾向にあった。これらの結果から、*H. parasuis* がコンベンショナル豚に広く浸潤し豚の鼻腔内に常在化していること、および日齢により保菌状況が異なっていることが明らかとなった。いっぽう、SPF豚の鼻腔内から本菌は分離されず、調査したSPF養豚場には侵入していないものと考えられた。

H. parasuis はSDS-PAGEによる全菌体蛋白プロファイルの相違から2つの型(PAGE I型, II型)に大別されている¹⁰⁾。健康豚の鼻腔から分離される多くの株がPAGE I型であり、グレーサー病および肺炎病巣から分離される株のほとんどがPAGE II型に属することから、II型菌はI菌に比べ病原性が強い傾向があると考えられている¹⁰⁾。MORIKOSHIら⁵⁾は鼻腔には両型菌が混在しその比率ではI型菌が多いことを報告している。今回もI型菌が主体を占めた。また、成績には示していないが、同一豚の鼻腔内にも両型菌の混在が認められたが、前述同様にI型菌が多い傾向にあった。しかしながら、病原性の強いII型菌がコンベンショナル豚の鼻腔に多く見出されたことから、コンベンショナル養豚場の豚が本病のSPF豚への感染源になり得ることが示唆された。

わが国における健康豚の *H. parasuis* に対する抗体の保有状況調査の報告は少ない。今回のコンベンショナル豚のCF抗体保有率は農場およびと畜場調査ともに著しく高く、菌分離の成績と同様 *H. parasuis* の広い浸潤が確認された。しかしながら、県内ではコンベンショナル豚のグレーサー病は多発していないことから、コンベンショナル豚ではストレス等による宿主の免疫機能の低下がない限り発病しないものと思われた。いっぽう、調査したSPF豚では抗体保有は認められなかったことから、これら抗体陰性のSPF豚は *H. parasuis* の感染により容易に発症する可能性があるものと考えられた。著者らは本菌のSPF豚への鼻腔内接種によりグレーサー病が

再現されることを確認している^(未発表)、と畜場出荷豚によく認められる慢性漿膜炎とグレーサー病との関連については不明である。そこで、今回、漿膜炎をもつ豚の抗体を調査し、抗体価の比較を試みたが、本菌感染とと畜場でみられた漿膜炎との関連性については解明できなかった。漿膜炎はいくつかの細菌性感染症において認められることから、この病変の発生原因を知るには他の各種細菌に対する抗体調査も必要であると思われた。グレーサー病は急性疾患であり、しかも本病の病巣から本菌が分離され難いことから^{6,9,16)}、漿膜炎病巣における *H. parasuis* 抗原の検出も検討する必要があると考えられた。

今回の調査から、SPF豚にグレーサー病が発生する危険度が高いと考えられることから、SPF豚の生産を推進する上で本病の予防対策の確立は不可欠と思われた。SPF豚の生産が盛んなヨーロッパでは、特にプライマリーSPF豚における本病の予防対策として不活化ワクチンが使用され^{13,15)}、効果をあげている。最近、わが国においても不活化ワクチンの製造が承認されたので、その効果が期待される。

引 用 文 献

- 1) 天野 弘, 梶尾規一, 土屋 守ほか: 日獣会誌, 46, 99-102 (1993)
- 2) 加藤和好: 臨床と細胞, 4, 337-341 (1977)
- 3) KUME K, SAWATA A, NAKASE Y: Jpn J vet Sci, 40, 65-73 (1978)
- 4) KUME K, NAKAI T, SAWATA A: Jpn J Vet Sci, 46, 641-647 (1984)
- 5) MORIKOSHI T, KOBAYASHI K, KAMINO T et al: Jpn J Vet Sci, 53, 667-669 (1990)
- 6) 両角徹雄: 豚病学, 熊谷哲夫ほか編, 第3版, 417-419, 近代出版, 東京 (1987)
- 7) 両角徹雄: 家畜衛試研究報告, 96, 193-197 (1991)
- 8) 両角徹雄, 加藤和好: 家畜衛試研究報告, 80, 5-10 (1980)
- 9) MOROZUMI T, HIRAMUNE T, KOBAYASHI K: Natl Inst Anim Health Q Jpn, 21, 121-128 (1981)
- 10) MOROZUMI T, NICOLET J: J Clin Microbiol, 23, 1022-1025 (1986)
- 11) NICOLET J, SCHOLL E: Diseases of Swine, 5th ed, 368-377, Iowa State University Press, Ames, Iowa (1981)
- 12) NIELSEN R: *Haemophilus Pasteurella and Actinobacillus*, 105-109, Academic Press, London (1981)
- 13) NIELSEN R, DANIELSEN V: Nord Vet Med, 27, 20-25 (1975)
- 14) LAEMMLI UK: Nature, London, 227, 680-685 (1970)
- 15) RIISING HJ: Zbl Vet Med B, 28, 630-638 (1981)
- 16) RILEY MGI, RUSSELL EG, CALLINAM RB: J Am Vet Med Assoc, 171, 649-651 (1977)