

10. H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザ感染野鳥の病理学的検索

県北家畜保健衛生所

○矢口 裕司 鹿島 悠幹
大矢 祥子 大谷 芳子

平成28年11月から平成29年3月にかけて野鳥における H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザ（以下、H5N6 亜型 HPAI）ウイルスの感染が全国的に確認され、その陽性数は25種 212羽に及んだ。茨城県でも死亡野鳥6種62羽（図1）から H5N6 亜型 HPAI ウイルスが検出された。そこで、野鳥の H5N6 亜型 HPAI の病理学的特徴を見出すとともに、併せて一部の検体について、免疫組織化学検査（以下、免疫染色）及び遺伝子検査を実施したので、その概要を報告する。

今回の発生概要

平成28年11月から平成29年3月にかけて搬入された死亡野鳥は、29種 243羽であった（表1）。搬入された全ての死亡野鳥は気管及びクロアカスワブを採材し、免疫クロマト法による簡易キット（エスプラインAインフルエンザ：富士レビオ）及び発育鶏卵接種によるウイルス分離を実施した。陽性検体は、当所で遺伝子検査を実施し、H5 亜型を確認した後に、指定の検査機関で確定検査を行った。その結果、6種62羽から H5 亜型ウイルスが分離され、すべて H5N6 亜型 HPAI ウイルスであった。

陽性野鳥は、5湖沼から発見・回収され、回収地点により野鳥監視重点区域が11か所設定された（表2）。特に水戸市の千波湖と大塚池では多数の H5N6 亜型 HPAI ウイルス分離個体が発見され、感染拡大が懸念されたため、水戸市は湖沼周囲を石灰散布するなどのウイルス拡散防止対策を講じた。

死亡野鳥の病理学的検査

1 剖検所見

外貌検査では、感染個体数が多かった水戸市の千波湖等で死亡したコブハクチョウとコクチョウの一部で、結膜の出血や血便がみられた。また多くの個体の剖検所見で、肝臓、脾臓及び腸管に出血や壊死病変がみられた（図2）。

2 病理組織検査

（1）材料と方法

搬入された死亡野鳥のうち110羽について、剖検及び病理組織検査を行った。それらの H5N6 亜型 HPAI ウイルス分離の別は、ウイルス分離個体6種55羽、ウイルス分離陰性個体15種55羽であった（表3）。

剖検後、主要臓器、脳、皮膚を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施した。

免疫染色は、肝臓、膵臓、脾臓、肺、心臓、腸管、皮膚のパラフィン切片を用いて実施した。パラフィン切片を0.3%過酸化水素水加メタノールで10分間反応させ、pH9.0の緩衝液（DAKO）に浸漬してマイクロウェーブ処理（700W, 5min×2回）による抗原賦活化を実施後、室温に30分以上静置した。一次抗体は、抗インフルエンザAマトリックス蛋白マウスモノクローナル抗体（Lifespan Biosciences）を1,000倍希釈し、4℃で一晩反応させた。二次抗体にはヒストファインシンプルステインMAX-PO（MULTI）（ニチレイバイオサイエンス）を、発色基質にはシンプルステインAEC溶液（ニチレイバイオサイエンス）を使用し、マイヤーヘマトキシリンで対比染色を実施した。

（2）結果

ア ウイルス分離陽性個体

病理組織検査では、肝臓及び膵臓に壊死巣が多数認められ（図3）、一部の個体では、脾臓及び脳の壊死巣、腸管粘膜の出血が散見された。鳥種別では、コブハクチョウ、コクチョウ及びカンムリカイツブリで肝臓の壊死病変が認められたが、ユリカモメでは肝臓病変を示した個体は少数で病変も軽度であった（表4）。また、オオハクチョウ及びホシハジロでは、肝臓に病変は認められなかった。膵臓病変は、鳥種に関わらず実施した全羽で壊死病変が認められた。

免疫染色では、肝臓・膵臓・脾臓・脳・腸管のHE染色でみられた病変部と一致して多数の陽性反応が認められた（図3）。さらに、HE染色で病変形成が明瞭でない臓器（肺の毛細血管、腸管の神経節及び血管内皮、心臓の心筋細胞、結膜の粘膜及び真皮の血管内皮、皮膚の羽軸及び羽毛上皮など）でも陽性反応が認められた個体が多くあった（図4、表5）。

イ ウイルス分離陰性個体

ウイルス分離陰性であったコブハクチョウ3羽、コクチョウ1羽において、膵臓の壊死病変がみられ、免疫染色で膵臓の腺房細胞や羽軸などに陽性反応が確認された（表6）。その他の検体については、高病原性鳥インフルエンザを疑う壊死病変は認められず、免疫染色も陰性であった。

パラフィン包埋切片の遺伝子検査

免疫染色では、一次抗体が結合する抗原はA型インフルエンザウイルスに共通する蛋白のため、H亜型の区別は出来ない。そのため、ウイルス分離陰性個体のうち、免疫染色で陽性を示した4羽の陽性反応が、今回発生しているH5亜型であるか確認するため、パラフィン包埋切片の遺伝子検査を実施した。

免疫染色で陽性を示した4羽のパラフィンブロックについて、スライス幅5 μ mを5枚薄切したものを材料とし、パラフィン包埋切片用のRNA抽出キット（Rneasy FFPE：QIAGEN）を用いてRNAを抽出し、「高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」で指定されているA型インフルエンザウイルスH5遺伝子及びNP遺伝子に特異的なプライマーを用いてコンベンショナルPCRを実施した。その結果、4羽中3羽でH5及びNP遺伝子が検出された（表6）。

H5亜型であることが判明したため、さらに遺伝子解析を目的として、A型インフルエンザウイルスHA遺伝子の特異的に検出するプライマーを用いてPCRを実施した。得られたPCR産物についてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、データベースに登録されているHA遺伝子の塩基配列との比較を（国研）農研機構 動物衛生研究部門に依頼した結果、県内で流行したH5N6亜型HPAIウイルスのHA遺伝子と99%近縁であることが分かった。

考察

今回、H5N6亜型HPAIウイルスが感染した野鳥の病理組織検査により、ウイルス分離陽性個体では、剖検を実施した全ての鳥種で脾臓に壊死病変が認められた。この所見は、今回の野鳥のH5N6亜型HPAI発症における特徴所見と考えられた。過去の事例でも、野鳥におけるH5N1亜型HPAIの病理組織所見として、脾臓の壊死は特徴的な所見と報告されており^{1,2,3)}、野鳥のHPAIでは脾臓の採材・検査は重要であることが示唆された。

一方、HPAI感染家きんでは、脾臓以外の脳・心臓・腎臓・肉冠などにも壊死病変が認められ、免疫染色では壊死病変部及び全身の血管内皮細胞などに陽性反応が認められると報告されている^{4,5)}。今回、コブハクチョウやコクチョウをはじめ多くの個体で、脾臓と肝臓の壊死病変が認められたが、脾臓や脳の壊死病変を示す個体は少なく、心臓と腎臓では病変は確認されなかった。そのため、野鳥のHPAIでは、感染するウイルス量や鳥種別の感受性の違いによって、病変を形成する臓器が家きんと異なる可能性があると考えられた。

また、ウイルス分離陽性個体の免疫染色では、全身でウイルス抗原が確認され、特に感染野鳥の羽軸で多数の抗原が検出されたことから、ウイルス拡散を防止するためには、糞便のみならず羽軸の対策も重要であることを再認識した。また今回の発生では、HPAIの学術的知識が乏しい公園管理者などを指導する際に、特徴的な壊死病変や免疫染色によりHPAI感染を「見える化」することで、関係者間で対策の必要性の理解が深まり、発見場所周囲の消毒など迅速な拡散防止対策のきっかけとなった。このような取り組みは、動物疾病の地域診断機関である当所の責務であり、WHOが提唱するワン・ヘルスの実践と考える。

ウイルス分離陰性個体で免疫染色陽性を示した4羽については、いずれもH5N6 亜型ウイルスの感染が拡大していた水戸市内の千波湖で同時期に回収された個体であり、H5N6 亜型ウイルスの感染個体と推察された。そこで、パラフィン切片を用いた遺伝子検査を実施したところ、4羽中3羽でH5 亜型ウイルス遺伝子が検出され、解析の結果、昨年流行していたH5N6 亜型ウイルスに近縁であることが確認された。一般的にパラフィン切片を用いた遺伝子検査では、ホルマリン固定の影響により検出感度が落ちることが知られているが、今回のように壊死病変が認められ、免疫染色で多くの陽性反応が確認できる症例においては、十分に検出可能であった。

今回の野鳥におけるHPAI 感染に際して、ウイルス分離陰性個体でも病理組織検査で病変及び免疫染色陽性反応が確認された。野鳥のHPAI では、感染ウイルス量や死後経過時間によっては、必ずしもウイルスが分離できるとは限らないため、抗原検索と併せて病理組織検査を実施することでより正確に鳥インフルエンザウイルスの感染状況が把握できると考えられ、有意義であることが実証された。

稿を終えるにあたり、検査にご尽力及びご助言いただいた（国研）農研機構動物衛生研究部門 山本祐先生、内田裕子先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Teifke JP et al., Vet Pathol, 44(2), 137-143, 2007.
- 2) Keawcharoen J et al., Emerg Infect Dis, 14(4), 600-607, 2008 .
- 3) Kalthoff et al., Emerg Infect Dis, 14(8), 1267-1270, 2008.
- 4) 喜田宏, 鳥の病気 第6版, 鶏病研究会編, 14-17, 2006
- 5) 鬼塚ら, 宮崎県で発生したH5N6 亜型HPAI 2例の病理学的検索, 第160回日本獣医学会学術集会要旨集, 188, 2017

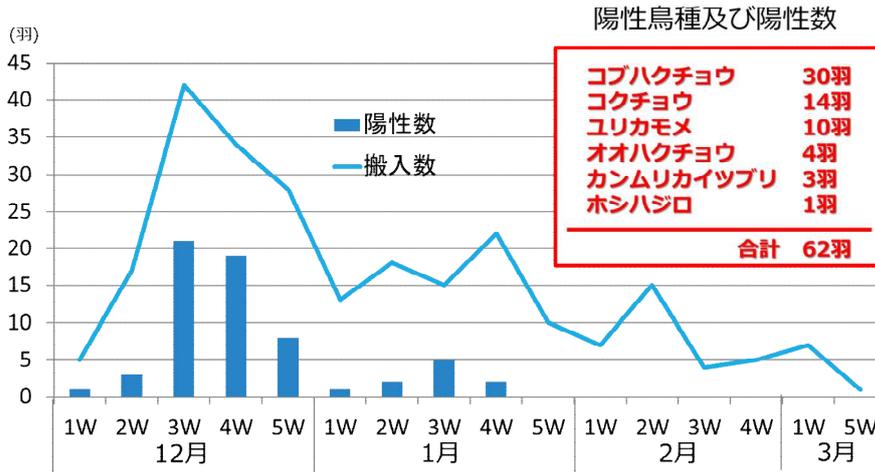


図1 死亡野鳥の搬入件数及び検査陽性数の推移

表1 搬入された死亡野鳥の分類

内訳	羽数	鳥種														
搬入数	243羽	29種 オオハクチョウ, コブハクチョウ, コハクチョウ, コクチョウ, キンクロハジロ, ヒシクイ, マガモ, オナガガモ, ホシハジロ, スズガモ, トモエガモ, カルガモ, ヒドリガモ, オカヨシガモ, オオタカ, ハイタカ, ノスリ, チョウゲンボウ, カイツブリ, カンムリカイツブリ, フクロウ, ユリカモメ, ウミネコ, カモメ, バン, オオバン, カワウ, コジュケイ, スズメ														
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">水きん類</th> <th colspan="2">陸生・留鳥</th> <th rowspan="2">合計</th> </tr> <tr> <th>冬鳥</th> <th>外来種</th> <th>猛禽類</th> <th>その他</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>128</td> <td>60</td> <td>24</td> <td>31</td> <td>243</td> </tr> </tbody> </table>			水きん類		陸生・留鳥		合計	冬鳥	外来種	猛禽類	その他	128	60	24	31	243
水きん類		陸生・留鳥		合計												
冬鳥	外来種	猛禽類	その他													
128	60	24	31	243												

表2 野鳥監視重点区域

地区名	湖沼	発見場所	発見日	指定日	鳥種	陽性羽数	解除日
水戸・ひたちなか	大塚池	水戸市大塚池	11/29	12/2	オオハクチョウ		
	干波湖	水戸市千波湖	12/6	12/6	ユリカモメ		
		水戸市桜川	12/19	12/19	コクチョウ	58	3/10
	諸川ダム	水戸市泉町	12/15	12/19	ユリカモメ		
潮来・鹿嶋	名平洞	水戸市田野町	12/20	12/26	ホシハジロ		
		ひたちなか市田宮原	12/24	12/26	ユリカモメ		
	北浦	鹿嶋市須賀	12/18	12/19	ユリカモメ		
		鹿嶋市爪木	12/25	1/4	ユリカモメ	5	3/5
		鹿嶋市沼尾	12/28	1/4	オオハクチョウ		
		鹿嶋市前川	1/11	1/17	オオハクチョウ		
鹿嶋市中	1/19	1/24	オオハクチョウ				



図2 コブハクチョウの剖検所見

表3 病理検査材料サンプル数

	陽性個体		陰性個体		合計	
	搬入数	病理	搬入数	病理	搬入数	病理
コブハクチョウ	30	30	8	5	38	35
コクチョウ	14	13	6	5	20	27
ユリカモメ	10	7	4	1	14	8
オオハクチョウ	4	2	21	18	25	20
カンムリカイツブリ	3	2	4	1	7	3
ホシハジロ	1	1	5	2	6	3
オナガガモ	0	0	26	2	26	2
マガモ	0	0	11	6	11	6
バン, オオバン	0	0	39	9	39	9
カワウ	0	0	10	0	10	0
猛禽類	0	0	24	4	24	4
スズメ	0	0	8	2	8	2
計	62	55	166	55	228	110

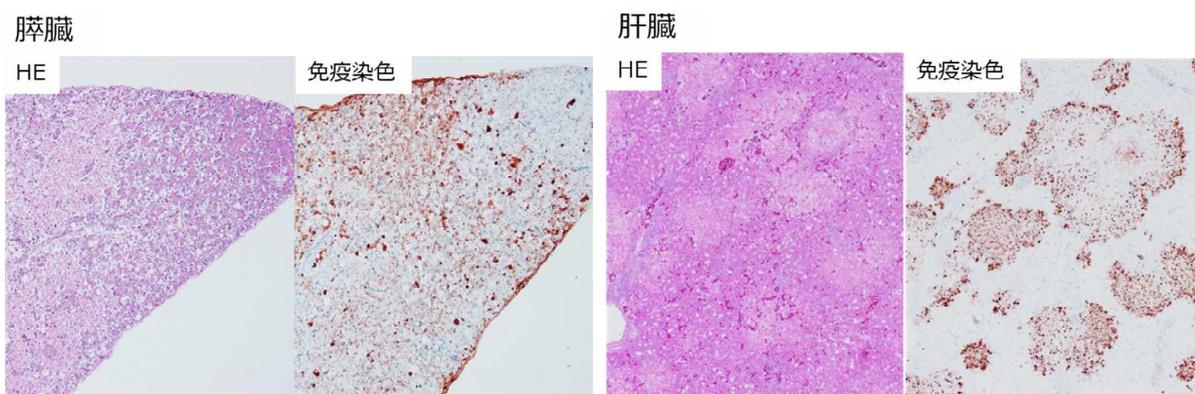


図3 病理所見及び免疫染色結果

表4 鳥種別における壊死病変を示した臓器の割合

鳥種	肝臓	脾臓	脾臓	腸管	脳
コブハクチョウ	100% 6/6	100% 6/6	40% 2/5	50% 3/6	20% 1/5
コクチョウ	92% 11/12	100% 12/12	50% 5/10	17% 2/12	13% 1/8
ユリカモメ	14% 1/7	100% 6/6	20% 1/5	0% 0/6	0% 0/1
オオハクチョウ	0% 0/2	NT	0% 0/2	0% 0/2	100% 1/1
カンムリカイツブリ	100% 1/1	NT	100% 1/1	100% 1/1	NT
ホシハジロ	0% 0/1	100% 1/1	0% 0/1	0% 0/1	NT

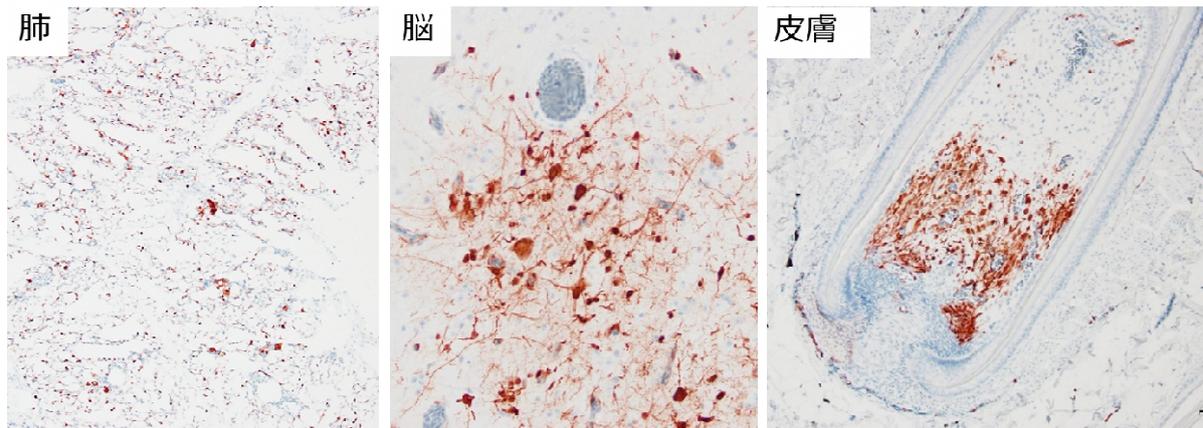


図4 病変形成を伴わない部位における免疫染色結果

表5 鳥種別における免疫染色陽性を示した臓器の割合

鳥種	肝臓	脾臓	脾臓	肺	心臓	腸管	脳	皮膚
コブハクチョウ	100% 6/6	100% 6/6	100% 5/5	100% 6/6	100% 5/5	83% 5/6	100% 5/5	100% 30/30
コクチョウ	92% 11/12	100% 12/12	60% 6/10	90% 9/10	78% 7/9	73% 8/11	100% 8/8	92% 12/13
ユリカモメ	43% 3/7	100% 6/6	20% 1/5	100% 6/6	100% 6/6	20% 1/6	100% 1/1	33% 1/3
オオハクチョウ	50% 1/2	NT	50% 1/2	0% 0/2	100% 2/2	50% 1/2	100% 1/1	100% 1/1
カンムリカイツブリ	100% 1/1	NT	100% 1/1	100% 1/1	100% 1/1	100% 1/1	NT	100% 2/2
ホシハジロ	0% 0/1	100% 1/1	0% 0/1	100% 1/1	100% 1/1	0% 0/1	NT	NT

表6 パラフィン切片のPCR結果

No.	鳥種	簡易検査	ウイルス分離	病変	免疫染色	検索臓器	FFPE-PCR	
							H5	NP
1		-	-	病変あり	+	脾臓、肝臓、皮膚	-	-
2	コブハクチョウ	-	-	病変あり	+	脾臓、肝臓、皮膚	+	+
3		-	-	病変未確認	+	皮膚	+	+
4	コクチョウ	-	-	病変あり	+	皮膚	+	+

1 1. 茨城県における豚由来病原細菌の薬剤耐性獲得状況

県北家畜保健衛生所

○藤井 勇紀 高安 真理子
都筑 智子 大谷 芳子

近年、世界的な薬剤耐性（AMR）問題に対応するため、人、動物、環境分野の連携によるワンヘルスアプローチの取組が重要であることが国際的認識であり、家畜衛生分野では、抗菌剤慎重使用の徹底にむけた対策・指導を推進していく必要がある。特に養豚分野の抗菌剤販売量は、獣医療全体の60%以上を占め、O116等の豚由来多剤耐性大腸菌が全国に広がりつつあるなど、早急にAMR対策を推進すべき領域である。このような背景から、過去23年間に県内で分離された豚由来病原細菌の薬剤耐性獲得状況調査を行ったので、その概要について報告する。

薬剤感受性試験

1 材料

平成6～28年の23年間に分離された豚由来病原細菌のうち、病性鑑定1件につき各菌種1株のみを選抜した8菌種709株を供試した（表1）。

2 方法

（1）薬剤耐性率、耐性薬剤数の増減と新規耐性株の出現の確認

9系統17薬剤とその他系統3薬剤の計20薬剤（表2）についてディスク拡散法による薬剤感受性試験を実施した。平成6～17年をステージⅠ、平成18～28年をステージⅡとし、ⅠからⅡにかけての薬剤耐性率（以下、耐性率）及び耐性薬剤数の増減について有意差の有無を検討した（耐性率： χ^2 検定、耐性薬剤数：t検定、有意水準： $P<0.05$ ）。またステージⅡで初めて出現した耐性株（以下、新規耐性株）の確認を行った（表3）。

なお、20薬剤のうち、菌種ごとの既知の自然耐性薬剤は除いて試験を実施した。

（2）各菌種における適応薬剤の有効性の判定（表4）

市販抗菌剤の添付文書に明記された、各疾病の治療に使用可能な薬剤（以下、適応薬剤）について、本県の豚由来病原細菌に有効であるかを調査した。なお、ステージⅡの耐性率20%未満を有効、20%以上を無効と判定した。

3 成績

（1）薬剤耐性率、耐性薬剤数の増減と新規耐性株の出現の確認（表3）

ア *Echerichia coli*（以下、Ec）（図1,2）

耐性率は 16 薬剤中 11 薬剤 (ABPC,AMPC,CEZ,SM,GM,DOXY,NA,ERFX,OBFX,ST,CP) で有意な増加, OTC で有意な減少を認めた。耐性薬剤数の平均値は有意に増加し, 最大値も 3 剤増加した。CTF で新規耐性株が 3 株分離された。

イ *O116* を除いた *Ec* (図 3,4)

耐性率は 16 薬剤中 5 薬剤 (CEZ,GM,DOXY,ERFX,OBFX) で有意な増加, OTC で有意な減少を認めた。耐性薬剤数の平均値は有意に増加し, 最大値も 3 剤増加した。CTF で新規耐性株が 2 株分離された。

ウ *Salmonella Choleraesuis* (以下, SCh) (図 5,6)

耐性率は 16 薬剤中 7 薬剤 (ABPC,AMPC,KM,FRM,GM,NA,ST) で有意な増加, CP で有意な減少を認めた。耐性薬剤数の平均値は有意に増加したが, 最大値は変動しなかった。また CEZ,CTF で新規耐性株が分離された。

エ *Haemophilus parasuis* (以下, Hp) (図 7,8)

耐性率は 18 薬剤中 ST のみ有意な増加を認めた。耐性薬剤数の平均値は有意に増加し, 最大値も 3 剤増加していた。また PC,ABPC,KM,FRM,DOXY でそれぞれ数株, ERFX,OBFX で 5 株の新規耐性株が分離された。

オ *Actinobacillus pleuropneumoniae* (以下, App) (図 9,10)

耐性率は 19 薬剤中 NA のみ有意に増加し, 耐性薬剤数分布に有意差はなかった。また FF の新規耐性株が 7 株分離された。

カ *Pasteurella multocida* (以下, Pm) (図 11,12)

耐性率は 18 薬剤中 EM のみ有意な増加を認めた。耐性薬剤数の平均値は有意に増加し, 最大値も 4 剤増加していた。PC,ABPC で 10 株, OTC で 7 株の新規耐性株が分離された。

キ *Streptococcus suis* (以下, Ss) (図 13,14)

耐性率は 17 薬剤中 DOXY のみ有意に減少し, 耐性薬剤数分布に有意差はなかった。また PC で 1 株, ERFX,OBFX で 2 株の新規耐性株が分離された。

ク *Erysipelothrix rhusiopathiae* (以下, Er) (図 15,16)

耐性率は 17 薬剤中 OTC のみ有意な減少を認めたが, 耐性薬剤数分布に有意差はなかった。

ケ *Staphylococcus hyicus* (以下, Sh) (図 17,18)

耐性率は 18 薬剤中 PC,AMPC で有意に増加。耐性薬剤数の平均値は有意に増加し, 最大値も 4 剤増加していた。ERFX,OBFX で新規耐性株が 2 株分離された。

コ 全薬剤の耐性率 (図 19)

試験薬剤の全てを対象とした各菌種の耐性率は, *Ec* (32.6%→48.7%), *O116* を除く *Ec* (32.6%→43.2%), SCh (43.3%→55.7%), Hp (7.8%→12.5%), Sh (14.8%→21.9%) で有意に増加していた。

(2) 各菌種における適応薬剤の有効性の判定 (表 4)

ア Ec (適応薬 11 剤:ABPC,AMPC,CTF,KM,GM,OTC,DOXY,ERFX,OBFX,CL,ST)

第一次選択薬は GM, 第二次選択薬は CTF が有効で, その他は無効であった。

イ SCh (適応薬 6 剤:ABPC,KM,GM,OTC,CL,ST)

第一次選択薬は全て無効で, 第二次選択薬では CL のみ有効であった。

ウ Hp (適応薬 5 剤:PC,AMPC,ERFX,OBFX,ST)

第一次選択薬は PC,AMPC, 第二次選択薬は ERFX,OBFX が有効であった。

エ App (適応薬 7 剤:AMPC,CTF,DOXY,ERFX,OBFX,ST,FF)

第一次選択薬では AMPC, DOXY,FF, 第二次選択薬では CTF,ERFX,OBFX が有効で, ST のみ無効であった。

オ Pm (適応薬 9 剤: PC,ABPC,AMPC,CTF,KM,OTC,ERFX,OBFX,ST)

第一次選択薬では PC,ABPC,AMPC,KM,OTC, 第二次選択薬では CTF,ERFX,OBFX が有効であり, ST のみ無効であった。

カ Ss (適応薬 6 剤: PC,ABPC,AMPC,EM,OTC,ST ※全て第一次選択薬)

PC,ABPC,AMPC,ST が有効で, EM,OTC は無効であった。

キ Er (適応薬 3 剤: PC,EM,OTC ※全て第一次選択薬)

PC,EM,OTC の全てが有効であった。

ク Sh (適応薬 6 剤:PC,AMPC,KM,EM,OTC,DOXY ※全て第一次選択薬)

KM,DOXY が有効, PC,AMPC,EM,OTC は無効であった。

考察

今回の対象菌種について, 有意に耐性率が増加していたのは, Ec で 11 薬剤, SCh で 7 薬剤, Hp,App,Pm で各 1 薬剤, Sh で 2 薬剤であり, 全薬剤でみても特に Ec と SCh の増加割合が大きかったことから, 腸内細菌 2 菌種 (Ec,SCh) で特に著しい耐性化の進行が確認された。

腸内細菌について, Ec は多剤耐性化に加え, 第二次選択薬である FQ 系薬剤でも耐性率増加が著しく, また CTF では新規耐性株が出現していた。これは近年, 本県に浸潤する多剤耐性大腸菌系統 O116 の影響と推察できるが, O116 を除外しても, 同様に FQ 系薬剤を含む複数薬剤で耐性率増加が認められた。このことから特定の多剤耐性系統株の蔓延のみが要因ではなく, 複数の血清型を有す大腸菌全体が抗菌剤の選択圧を受け, 耐性化が進行している可能性が示唆された。一方, SCh においても複数薬剤での耐性率増加や CTF の新規耐性株出現がみられたが, ステージ II で耐性薬剤数 9~10 の株が集中的に増加していたことから, 同一の多剤耐性パターンをもつ近縁株の拡散が示唆された。

今回の調査結果から, Ec は GM と CTF, SCh は CL のみしか適応薬剤の選択肢がないことが判った。このような多剤耐性菌に対しては, 有効な第一次選択薬が少なく, 慎重使用が困難なため, 早期の薬剤感受性試験と的確な薬剤選択により,

生産現場での抗菌剤の乱用を避けることが必要である。一方で、Ec は OTC 耐性率のみ有意な減少を認めた。これは健康豚由来 Ec の全国調査の傾向と一致する。今回、別途調査を行った結果、本県で販売された 1 頭当たりの OTC 平均使用量は他県の平均を大きく下回り、OTC 耐性率の減少との関連性が考えられた。

肺炎菌 (Hp,App,Pm) においても、Hp で全体耐性率、Hp,Pm で平均耐性薬剤数の有意な増加がみられ、Hp,Pm は耐性薬剤数の最大値が 3 剤以上増加するなど、耐性化が確認される。さらに、耐性率が有意に減少した薬剤は無く、Hp の FQ 耐性株、App の FF 耐性株など、抗菌スペクトルが広く、かつ汎用される薬剤で新規耐性株が出現していることは特に危惧すべき状況である。一方で、これら肺炎菌 3 種は複数の第一次選択薬で有効性が確認されたため、適切な情報提供により、第二次選択薬の使用量低減と慎重使用の実践が可能であると考えられた。

敗血症菌 (Ss,Er) , 皮膚炎菌 (Sh) においても、Ss,Sh で FQ 耐性株が出現しており、肺炎菌と合わせて、FQ 系薬剤の使用に関しては特に注意を呼びかけ早急な対策が必要と考えられる。また、Ss,Er,Sh も複数の有効な第一次選択薬の候補があった一方で、Sh では PC,AMPC,EM,OTC など既に無効である薬剤も多く、慎重使用の徹底により、これ以上有効薬剤を減らさないための取組みは必須である。

今回の調査から、腸内細菌 (Ec,SCh) における著しい耐性率の増加、また、肺炎菌 (Hp,App,Pm) での FF 耐性株や FQ 耐性株、敗血症菌 (Ss,Er) , 皮膚炎菌 (Sh) での FQ 耐性株等の新規発生がみられ、豚由来病原細菌の薬剤耐性化の進行が明らかになった。腸内細菌の耐性化が著しく増加していたのは、予防的に多用される経口投与型の抗菌剤により高頻度の選択圧を受けていた可能性や、菌種による薬剤耐性プラスミドの伝達頻度の違い等の要因が考えられる。特に前者の要因であった場合、腸内細菌群の耐性菌出現リスクは高くなり、また疾病発生との関連が示唆される腸内フローラの攪乱も起こりえるため、抗菌剤の予防的経口投与については、そのリスクについて十分な検討が必要と考えられる。加えて人に病原性をもつ SCh,Ss,Pm でも FQ 耐性や多剤耐性の獲得が確認されたため、ワンヘルスの観点から、この事実を関係獣医師へ広く発信する必要がある。

現在、県内の AMR 対策は取組みを開始したばかりである。現段階では説明会での反応や県内の抗菌剤使用状況から、関係者の AMR に対する意識は低いように感じられる。しかし、今回の試験結果を活用することで、有効な第一次選択薬の迅速な選択ができるため、慎重使用実施に向けての積極的な指導が可能となる。また、ツラスロマイシンやチルミコシン等、感受性ディスクが市販されていないことから試験を行えなかった薬剤についても、今後はディスク作成プロトコルを確立し、養豚現場で使用される全薬剤のデータ収集、関係者への情報提供を行うとともに、抗菌剤慎重使用の重要性を繰り返し啓蒙するなど、県内の AMR 対策を推進する体制づくりが急務である。

表1 供試菌リスト

菌種	略号	分離疾病	株数			
			ステージ I (H6~H17)	ステージ II (H18~H28)	計 (H6~H28)	
腸内細菌	<i>Escherichia coli</i>	Ec	豚大腸菌症・浮腫病	73	124 (86)	197 (159)
	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	SCh	豚サルモネラ症	46	45	91
肺炎菌	<i>Haemophilus parasuis</i>	Hp	グレーサー病	22	44	66
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	App	豚胸膜肺炎	25	68	93
	<i>Pasteurella multocida</i>	Pm	豚パスツレラ肺炎	29	88	117
敗血症菌	<i>Streptococcus suis</i>	Ss	豚レンサ球菌症	40	69	109
	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Er	豚丹毒	8	10	18
皮膚炎菌	<i>Staphylococcus hyicus</i>	Sh	滲出性皮膚炎	6	12	18
計				249	460	709

※ () 内は0116の38株を除いた数

表2 供試薬剤リスト

薬剤系統	薬剤成分 (★は第二次選択薬)	略号	各菌種の試験実施薬剤								
			Ec	SCh	Hp	App	Pm	Ss	Er	Sh	
ペニシリン系	ペニシリン	PC	NT	NT	○	○	○	○	○	○	○
	アンピシリン	ABPC	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	アモキシシリン	AMPC	○	○	○	○	○	○	○	○	○
セフェム系	第1世代 セファゾリン	CEZ	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	第3世代 ★セフトロフル	CTF	○	○	○	○	○	○	○	○	○
アミノグリコシド系	カナマイシン	KM	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	ストレプトマイシン	SM	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	ネオマイシン	FRM	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	ゲンタマイシン	GM	○	○	○	○	○	○	○	○	○
リンコマイシン系	リンコマイシン	LI	NT	NT	NT	NT	NT	○	○	○	
マクロライド系	エリスロマイシン	EM	NT	NT	○	○	○	○	○	○	
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	OTC	○	○	○	○	○	○	○	○	
	ドキシサイクリン	DOXY	○	○	○	○	○	○	○	○	
キノロン系	ナリジクス酸	NA	○	○	○	○	○	NT	NT	○	
フルオロキノロン系 (FQ系)	★エンロフロキサシン	ERFX	○	○	○	○	○	○	○	○	
	★オルビフロキサシン	OBFX	○	○	○	○	○	○	○	○	
ペプチド系	★コリスチン	CL	○	○	○	○	○	NT	NT	NT	
その他系統	ST合剤	ST	○	○	○	○	○	○	○	○	
	クロラムフェニコール	CP	○	○	○	○	○	○	○	○	
	フロルフエニコール	FF	NT	NT	NT	○	NT	NT	NT	NT	
試験薬剤数			16	16	18	19	18	17	17	18	

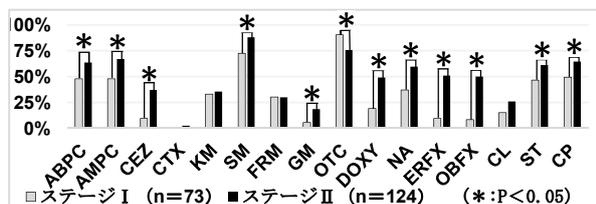


図1 耐性率：Ec

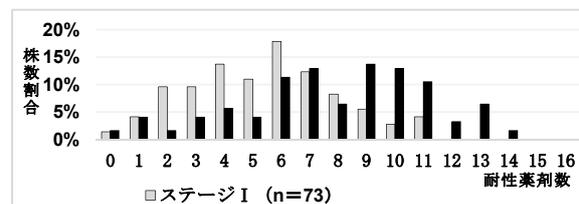


図2 耐性薬剤数分布：Ec

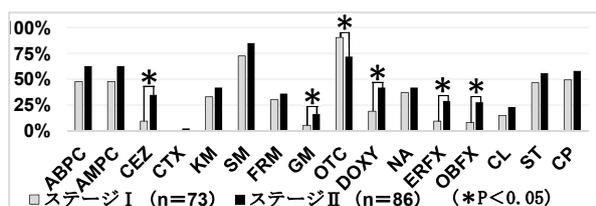


図3 耐性率：O116 除く Ec

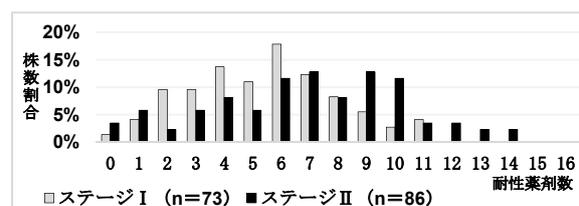


図4 耐性薬剤数分布：O116 除く Ec

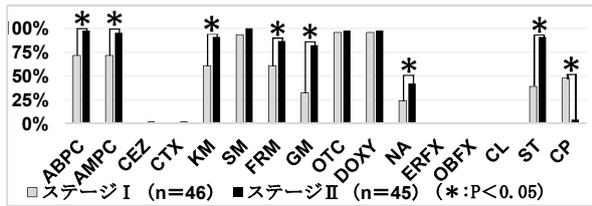


図 5 耐性率 : SCh

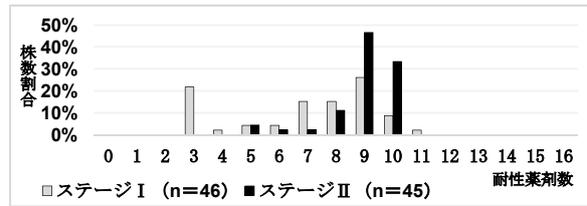


図 6 耐性薬剤数分布 : SCh

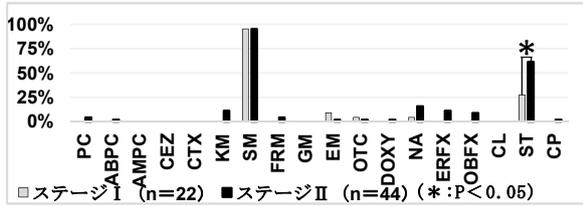


図 7 耐性率 : Hp

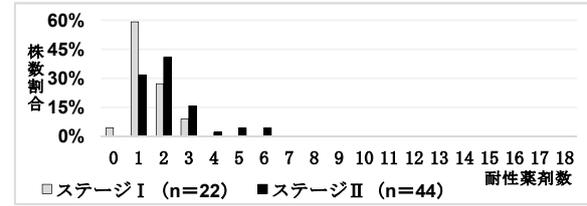


図 8 耐性薬剤数分布 : Hp

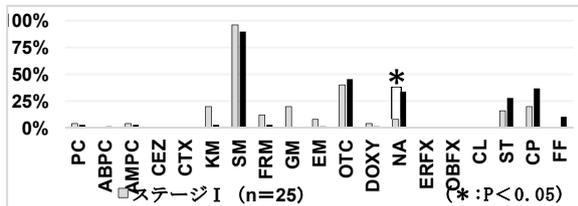


図 9 耐性率 : App

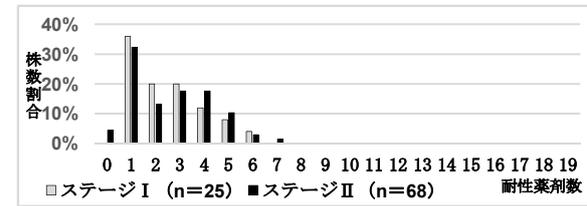


図 10 耐性薬剤数分布 : App

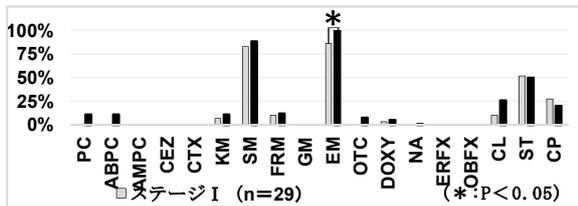


図 11 耐性率 : Pm

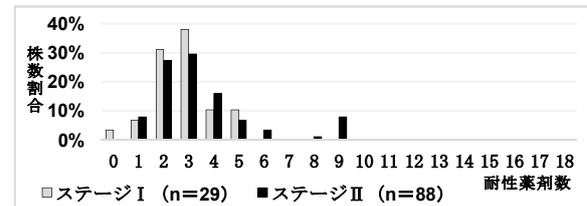


図 12 耐性薬剤数分布 : Pm

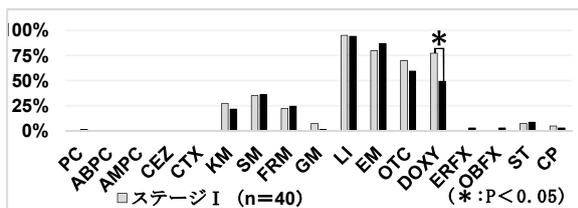


図 13 耐性率 : Ss

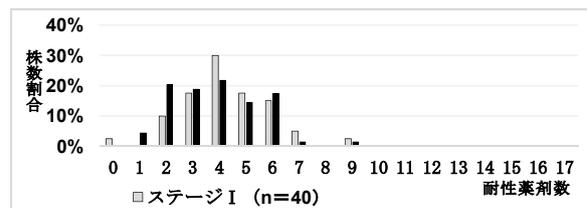


図 14 耐性薬剤数分布 : Ss

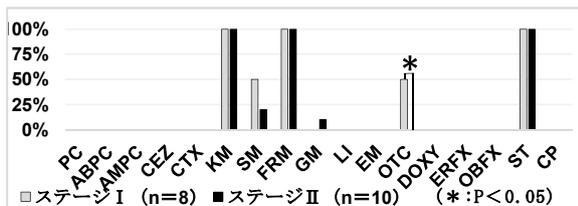


図 15 耐性率 : Er

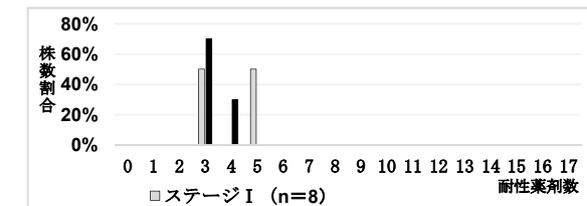


図 16 耐性薬剤数分布 : Er

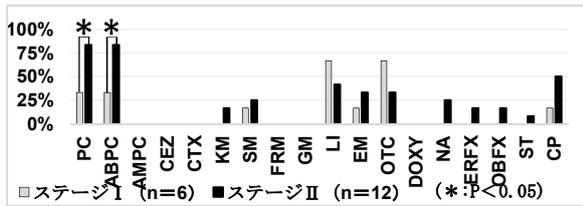


図 17 耐性率 : Sh

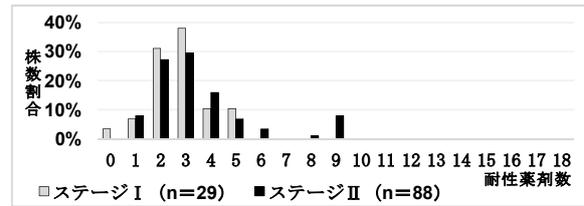


図 18 耐性薬剤数分布 : Sh

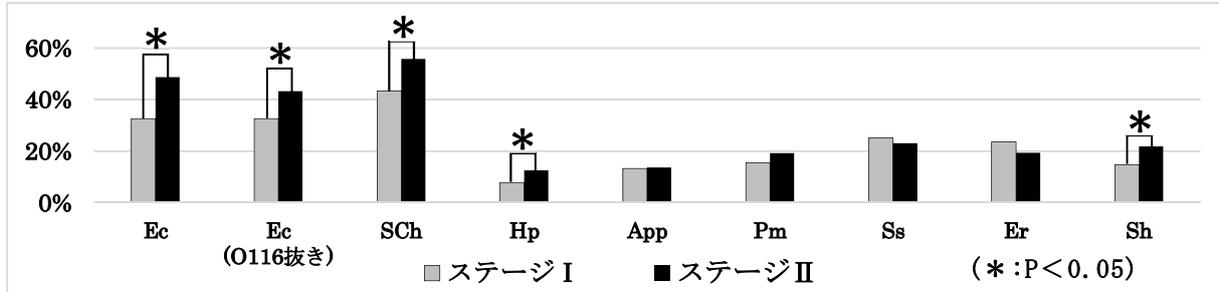


図 19 各菌種における全薬剤の耐性率

表 3 耐性率と耐性薬剤数の増減

菌種	菌株	薬剤耐性率																	耐性薬剤数				
		ペニシリン系		セフェム系		アミノグリコシド系				リンコマイシン系	マクロライド系	テトラサイクリン系		キノロン系	FQ系		その他系統				全薬剤	平均値	最大値
		P C	A B P C	A M P C	C E Z	C T F	K M	S M	F R M	G M	L I	E M	O T C	D O X Y	N A	E R F X	O B F X	C L	S T	C P			
腸内細菌	Ec	NT	↑	↑	↑	↑		↑	NT	NT	↓	↑	↑	↑	↑		↑	↑	NT	↑	↑	11	14
	Ec (O116除外)	NT			↑	↑			↑	NT	NT	↓	↑		↑	↑			NT	↑	↑	11	14
	Sch	NT	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	NT	NT						↑	↓	NT	↑	↑	11	10
肺炎菌	Hp	↑	↑				↑	↑		NT		↑		↑	↑			↑	NT	↑	↑	3	6
	App								NT				↑						↑			6	7
	Pm	↑	↑						NT	↑	↑								NT		↑	5	9
敗血症菌	Ss	↑										↓	NT	↑	↑	NT			NT			9	9
	Er										↓		NT			NT			NT			5	4
皮膚炎菌	Sh	↑	↑			↑							↑	↑	↑	NT	↑		NT	↑	↑	4	8

↑有意な増加 (P<0.05) ↓有意な減少 (P<0.05) ↑ステージIIで新規耐性株出現

表 4 適応薬剤のステージII耐性率と効果判定

菌種	菌株	ペニシリン系		セフェム系		アミノグリコシド系				リンコマイシン系	マクロライド系	テトラサイクリン系		キノロン系	FQ系		その他系統				第1次選択薬候補	第2次選択薬候補
		P C	A B P C	A M P C	C E Z	C T F	K M	S M	F R M	G M	L I	E M	O T C	D O X Y	N A	E R F X	O B F X	C L	S T	C P		
腸内細菌	Ec	×	×	○	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	GM	CTF
	Sch	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	なし	CL
肺炎菌	Hp	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	PC, AMPC	FQ系薬剤
	App	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	AMPC, DOXY, FF	CTF, FQ系薬剤
	Pm	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	PC, ABPC, KM, AMPC, OTC	CTF, FQ系薬剤
敗血症菌	Ss	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	PC, ABPC, AMPC, ST	なし
	Er	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	PC, EM, OTC	なし
皮膚炎菌	Sh	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	KM, DOXY	なし

1 2. 管内牛ウイルス性下痢・粘膜病サーベイランスにおける持続感染牛摘発事例

県西家畜保健衛生所

○柏井 美穂 古谷 道栄
高橋 覚志 栗山 伸人

牛ウイルス性下痢・粘膜病（以下，BVD - MD）は牛ウイルス性下痢ウイルス（以下，BVDV）の感染を原因とし，流産や体外にウイルスを排出し続ける持続感染牛（以下，PI 牛）の産出，農場間でのまん延が課題となっている。また，PI 牛は特徴的な臨床症状が認めにくく，摘発には積極的なサーベイランスが必要である。

農林水産省が平成 28 年 4 月に策定した「牛ウイルス性下痢・粘膜病に関するガイドライン」では，まん延防止対策として PI 牛摘発のために定期検査余剰血清等またはバルク乳を用いた RT-PCR 等によるスクリーニング検査を少なくとも年 1 回実施することを推奨している。一方，赤上ら¹⁾はバルク乳を材料とし，BVDV 特異遺伝子及び ELISA 抗体検出によるサーベイランス体制を考案し，PI 牛摘発の信頼性を実証した。

今回，赤上らの手法を用いて，管内の酪農家において BVDV サーベイランスを実施し，PI 牛を摘発したので報告する。

バルク乳を用いた BVDV 遺伝子及び ELISA 抗体によるサーベイランス

1 材料

平成 29 年 5 月及び 7 月に X 市のクーラーステーション（以下，CS）（63 農場分），Y 市の CS（3 農場分）において，管内の合計 66 農場のバルク乳を採材した。

2 方法

採材した全検体について BVDV に特異的な遺伝子を検出するための遺伝子検査（以下，RT-PCR 法）と BVDV 抗体検査（以下，抗体検査）を実施した。抗体検査は，市販のキットを用いた競合エライザ法で実施し，エライザ値が 0.7 以下を抗体陽性と判定した。

3 結果

検査した 66 農場のうち，RT-PCR 法と抗体検査の両方が陽性であったのは 1 農場（A 農場），RT-PCR 法のみ陽性が 1 農場（B 農場），抗体検査のみ陽性が 4 農場（C～F 農場），60 農場は両方とも陰性であった（表 1）。

バルク乳中 BVDV 遺伝子及び ELISA 抗体検出状況による評価

各 CS において、RT-PCR 法及び抗体検査の両方または一方でも陽性となった農場では、PI 牛を確定するために、バルク乳中 BVDV 遺伝子及び ELISA 抗体検出状況による評価¹⁾と農場の疫学情報をもとに、各農場でバルク乳での再検査または子牛を含む全頭の抗原エライザ検査（以下、抗原検査）を実施した（表 2）。

さらに、PI 牛が確定した農場については、PI 牛が農場内に飼養されていた期間中、胎齢が 80～120 日であった場合、新生子牛が PI 牛になる可能性があるため、該当する新生子牛は抗原エライザ検査（以下、追跡調査）を実施した（表 3）。

1 A 農場

（1）PI 牛摘発の経緯

PT-PCR 法と抗体検査のどちらも陽性であったため、PI 牛が存在する可能性が高いと想定して、搾乳牛 34 頭及び子牛 4 頭の抗原検査を実施した。その結果、搾乳牛と子牛の計 2 頭の PI 牛（PI 牛①，②）を摘発した（表 2）。

追跡調査では子牛 16 頭を検査した結果、PI 牛の存在はなかった（表 3）。

（2）疫学情報

PI 牛①は、平成 27 年に廃業した農場から導入した成牛であった。そのため PI 牛②は母牛が妊娠中に BVDV の暴露を受けて、PI 牛になったと考えられる（図 1）。

2 B 農場

（1）PI 牛摘発の経緯

PT-PCR 法のみが陽性であったため、搾乳牛群に PI 牛が存在する可能性が高いと想定し、搾乳牛 31 頭及び育成牛 6 頭の抗原検査を実施した。その結果、搾乳牛 1 頭（PI 牛③）を摘発した（表 2）。

追跡調査では子牛 21 頭検査を行ったが、PI 牛の存在はなかった（表 3）。

（2）疫学情報

本農場では、後継牛は全て自家育成であり PI 牛③の移動歴や放牧歴はないことから、過去に農場内での BVDV の暴露があったと示唆される。（図 2）。

PI 牛③の出生は 3 年前であることから、農場内でも PI 牛の出生が疑われるが、死産や出荷されたものと推察される。また PI 牛③は 2 産目だが、初産時は人工授精を 4 度行うなど不受胎を繰り返した。乳量は、他の搾乳牛より多少劣るが乳質は問題ないということであった。

3 C 農場

（1）PI 牛摘発の経緯

抗体のみ陽性であったため、搾乳牛群以外に PI 牛が存在する可能性が高いと想定し、CS 検査時に乾乳及び未經産であった牛を含む農場バルク乳と今回も乾乳中の 4 頭の抗原検査を実施した。その結果、抗体のみ陽性となり成牛群に PI 牛は存在しないことが判明した。次に子牛に PI 牛が存在する可能性を考慮し育成牛及び

子牛 23 頭の抗原検査を実施した結果、PI 牛 2 頭 (PI 牛④, ⑤) を摘発した (表 2)。

追跡調査では子牛 18 頭検査し、PI 牛 (PI 牛⑥) 1 頭を摘発した (表 3)。

(2) 疫学情報

C 農場は乳肉複合農場であり、搾乳牛 57 頭飼養し、後継牛を年間 20 頭程度県外に預託放牧している。PI 牛④, ⑤の母牛を預託放牧する際、入牧条件が設定されていないため、入牧前に BVDV ワクチンを接種していた。

PI 牛④, ⑤は母牛が放牧時に BVDV に感染後に農場に戻り産出され、PI 牛⑥は、農場内で母牛が BVDV に暴露されたと考えられる (図 3)。

BVDV のワクチンを接種していたにも関わらず PI 牛が産出された要因は、預託牛に接種したワクチン株 (1a, 2a 型) と預託放牧先で感染した株 (シーケンス解析を依頼した結果、1b 型) が異なったためと考えられる。

追跡調査で PI 牛が摘発されたため、本農場では血清、バルク乳に加え個別別乳汁の抗体検査を実施した。血清は前年度の定期検査の余剰血清と PI 牛摘発直後に採材したものをを用い、乳汁とバルク乳は、PI 牛摘発直後及び摘発後 2 か月経過した時点のものをを用いた。

農場の抗体保有率は、血清の抗体検査から PI 牛摘発前は 57 頭中 34 頭が陽性 (陽性率 59.6%) であったのに対し、摘発直後は 48 頭中 45 頭が陽性 (陽性率 93.8%) となった。また、エライザ値については、中央値が PI 牛摘発前 0.15 であったのに対し、PI 牛摘発直後は 0.05 であった (表 4)。

一方、個別別に乳汁中の抗体保有率を検査した結果、PI 牛摘発直後では 48 頭中 18 頭が陽性 (陽性率 37.5%) であったのに対し、摘発してから 2 か月後では 52 頭中 29 頭が陽性 (陽性率 56.9%) であった。また、エライザ値については中央値が PI 牛摘発直後で 0.35、摘発して 2 か月後では 0.41 であった。

バルク乳の抗体検査結果では、エライザ値は、PI 牛摘発直後で 0.27、PI 牛摘発の 2 か月後で 0.47 となった (図 5)。

血清中の抗体保有率が PI 牛摘発前後で上昇した傾向がみられたのは、PI 牛の産出により牛群内で水平感染がおこったためと考えられた。PI 牛摘発前の血清エライザ値は牛群内で差が大きかったが、PI 牛摘発後の血清エライザ値のバラつきは小さく、中央値も上昇していた (図 4)。そのため、PI 牛摘発直後の飼養牛のほとんどが BVDV 抗体を保有し、乳汁中でも BVDV 抗体が検出されたものと考えられた (表 4)。また、乳汁中の抗体保有率が PI 牛を淘汰後でも上昇傾向を示したのは、血中から乳汁中に抗体が出現するタイムラグがあるためと考えられた。農場の乳汁におけるエライザ値の推移から、PI 牛が淘汰されたことで農場内のウイルス量が低下し、新たな感染がなかったと推察された (図 5)。

C 農場では搾乳牛舎と子牛舎は別棟であるが、作業者の作業動線の明確化や消

毒の徹底をしなかったため、PI 牛から搾乳牛群での水平感染を誘発し、PI 牛が生まれる要因となったと考えられた。本農場ではバルク乳の抗体検査において抗体のみ陽性となり、赤上らの評価のとおり搾乳牛以外（子牛や育成牛）での PI 牛が摘発されたことから、本評価法の有用性を改めて確認できた。

4 D～F 農場

D, E 農場は、X 市の CS でのバルク乳採取時には農場内に子牛と育成牛は飼養されていなかった。CS 検査時に乾乳であった牛を含むバルク乳の再検査を 1 か月後に実施したところ、再度抗体検査のみ陽性となったことから、過去に PI 牛が存在したことが推察された。

F 農場は、前年度に PI 牛 2 頭を淘汰しており、その後 PI 牛は摘発なくバルク乳の抗体のみ陽性になった。その後の追跡調査では PI 牛の摘発はなく、バルク乳を経時的に検査したところ、エライザ値の変動は確認されなかったことから、農場が清浄化に向かっていることの裏付けとなった。

まとめ

バルク乳を用いたサーベイランスを 66 農場で実施した結果、3 農場 5 頭の PI 牛を摘発、淘汰することができた。さらに追跡調査により、子牛の PI 牛 1 頭を摘発した。バルク乳を用いたサーベイランスの有用性が改めて確認できた。

今回摘発した PI 牛 6 頭のうち、4 頭が農場内で産出された子牛であった。感染源が特定できた農場は一部に過ぎないが、PI 牛を導入してしまった農場が 2 農場あった。PI 牛の導入が契機となり、結果的には農場内での感染を繰り返していたと考えられる。管内農場において、導入や放牧について聞き取りをしたところ、50%以上の農場が牛の放牧や導入を実施していた。PI 牛の導入や出生のリスクが高いことは明白であり、今回実施したバルク乳を用いた積極的なサーベイランスは BVD-MD の清浄化に必要不可欠である。

家畜保健衛生所は、PI 牛の性質上、早期摘発をいかに効率よくかつ効果的に実施できるかが重要である。本調査に取り組む中で、RT-PCR 法と抗体検査を併用することで、搾乳牛以外の育成牛や子牛の PI 牛の存在を推測し、早期摘発が可能となった。さらに追跡調査も実施することで、新生子牛 PI 牛の早期摘発にも効果的であることが確認できた。今後も年 1 回のバルク乳を用いた BVDV サーベイランスを継続的に実施し、PI 牛の早期摘発することで、農場の衛生指導の一助となるように尽力していきたい。

参考文献

1) 赤上ら、バルク乳中の牛ウイルス性下痢ウイルス特異遺伝子及び ELISA 抗体検出によるサーベイランス体制の検討 第 58 回茨城県家畜保健衛生業績発表会

表 1 バルク乳のサーベイランス結果

検査結果	農場数	PI 牛摘発農場数
遺伝子 (+) 抗体 (+)	1	1
遺伝子 (+) 抗体 (-)	1	1
遺伝子 (-) 抗体 (+)	4	1
遺伝子 (-) 抗体 (-)	60	0
計	66	3

表 2 バルク乳中 BVDV 遺伝子及び ELISA 抗体検出状況による評価

摘発 農場	採血頭数 (上段: 搾乳牛, 下段: 育成牛・子牛)	バルク乳再検査	PI 牛摘発頭数	摘発時月齢
A	34	—	2	33
	4			8
B	31	—	1	36
	6			
C	4	○	2	7
	23			7
D	—	○	0	—
E	—	○	0	—
F	—	—	0	—
計	102	3	5	

表 3 PI 牛確定後の追跡調査

農場	検査頭数	摘発頭数	摘発時月齢
A	16	0	—
B	21	0	—
C	18	1	2
計	55	1	

表4 血清と個体別乳汁の抗体保有率の推移

材料	PI牛摘発前	PI牛摘発直後	PI牛摘発2か月後
血清	34/57(59.6%)	45/48(93.8%)	—
乳汁	—	18/48(37.5%)	29/51(56.9%)

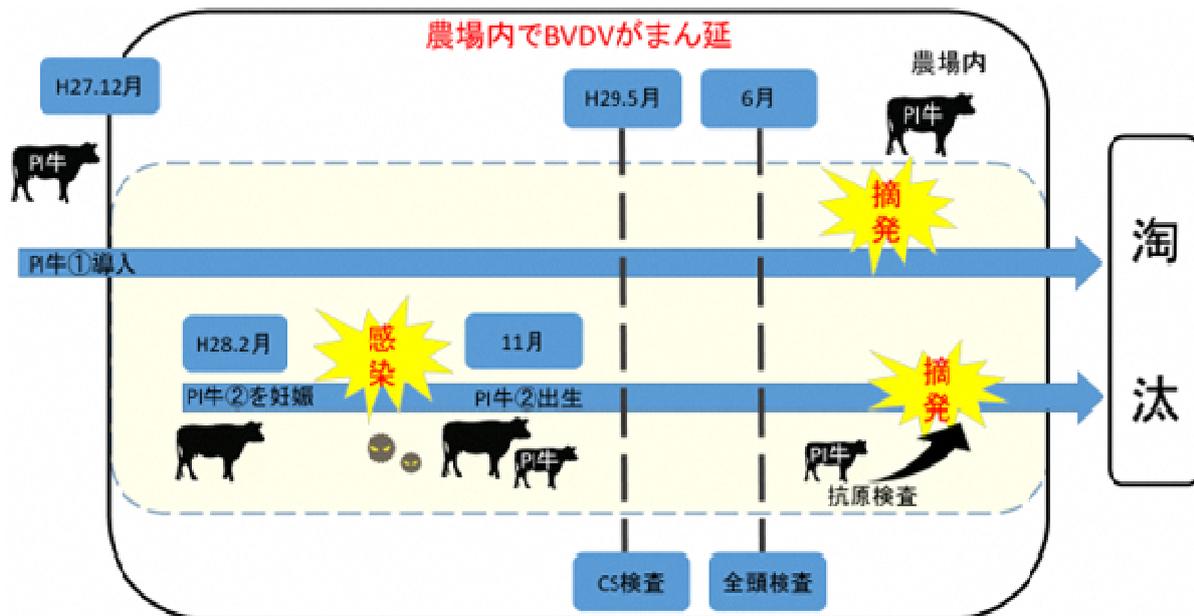


図1 A農場におけるPI牛摘発までの経過

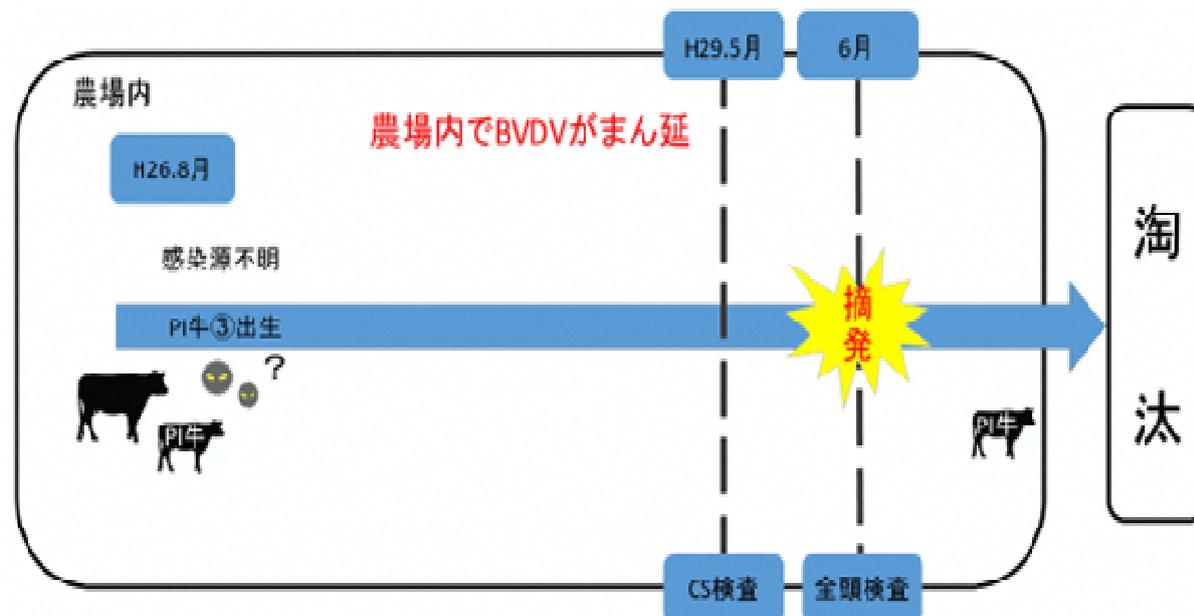


図2 B農場におけるPI牛摘発までの経過

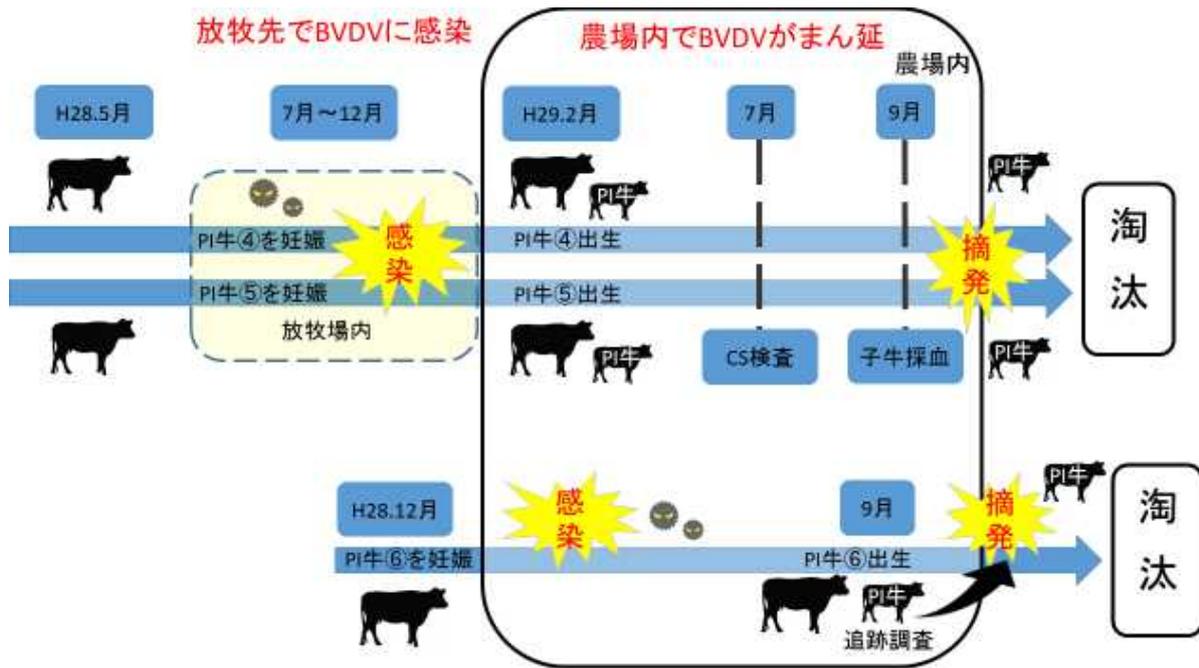


図3 C農場におけるPI牛摘発までの経過

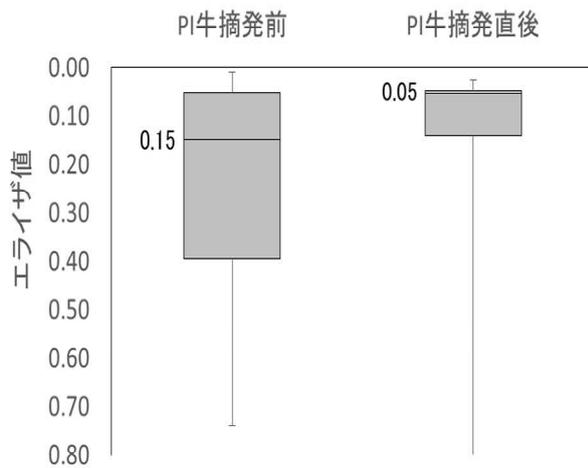


図4 PI牛摘発前後の血清中抗体エライザ値の推移

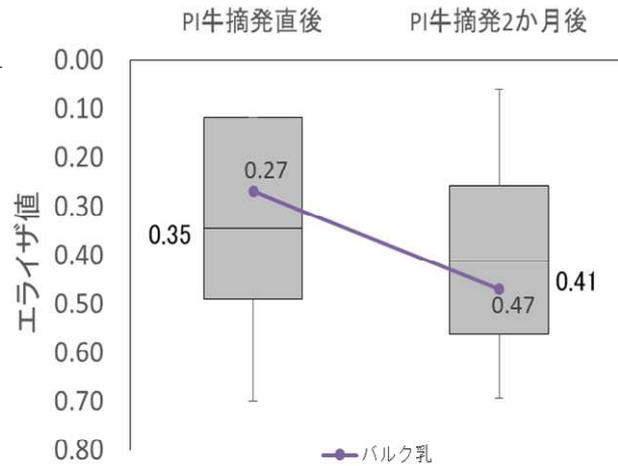


図5 PI牛摘発直後と2か月後の乳汁及びバルク乳抗体エライザ値の推移