

わが国の豚由来 *Actinobacillus*
pleuropneumoniae に関する
疫学的研究

2 0 1 6

平田 綾子

わが国の豚由来 *Actinobacillus*
pleuropneumoniae に関する疫学的研究

酪農学園大学大学院
獣医学研究科

平田 綾子

獣医細菌学ユニット
指導教員 教授 菊池 直哉

2016年

目次

緒言	1
第Ⅰ章 豚由来 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> の血清型の推移	5
1. 小緒	5
2. 材料と方法	5
3. 結果	6
4. 考察	8
5. 小括	9
第Ⅱ章 豚由来 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> の薬剤感受性の推移	10
1. 小緒	10
2. 材料と方法	10
3. 結果	12
(1) 1986 年から 1987 年分離株、1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の薬剤感受性	12
(2) 薬剤耐性パターンと血清型との関係	14
4. 考察	17
5. 小括	21
第Ⅲ章 豚由来 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> のテトラサイクリン耐 性遺伝子とパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子解析	22
1. 小緒	22
2. 材料と方法	22
3. 結果	24
(1) テトラサイクリン耐性遺伝子(<i>tet</i> 遺伝子)の検出	24
(2) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の解析	24
(3) オキシテトラサイクリン (OTC) 耐性とパルスフィールド電気泳動 (PFGE) パターンの関係	29

(4) 供試株の分離年または由来とパルスフィールド電気泳動 (PFGE)	
パターンとの関係	29
4. 考察	29
5. 小括	33
 第Ⅳ章 寒天ゲル内沈降反応で血清型別不能であった豚由来 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> の再血清型別と性状解析	34
1. 小緒	34
2. 材料と方法	34
3. 結果	35
(1) スライド凝集反応とマルチプレックス PCR による再血清型別	35
(2) 加熱温度の違いによる抗原抽出の影響	37
(3) パルスフィールド電気泳動 (PFGE) の解析	37
4. 考察	37
5. 小括	42
 総括	44
謝辞	48
引用文献	49

緒言

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下、*A. pleuropneumoniae*) は、球桿状のグラム陰性小桿菌で、豚胸膜肺炎の起因菌である。*A. pleuropneumoniae* に罹患した豚は、甚急性、急性、亜急性あるいは慢性の臨床経過をたどる[37,45]。甚急性型では1～数頭が突然に元気を消失し、食欲が廃絶して横臥する。発病当初の呼吸器症状は顕著ではないが、末期には呼吸困難となり、開口ならびに腹式呼吸となり、鼻腔および口腔より血液を混じた泡沫状の分泌物が認められ、24～36時間以内に斃死する。また、幼若豚では時に敗血症となるが、この場合は明確な臨床症状を示さず斃死する。急性型では一群の多くの豚が発病する。臨床症状は甚急性型とほぼ同様であるが、2～3日の経過で斃死するもの、亜急性から慢性に移行するものなどさまざまな経過をたどる。亜急性および慢性型は、急性型が耐過したあと認められ、湿性の発咳や食欲減退およびその結果として発育不良が認められる。このような慢性型の臨床症状を示す豚群では不顕性感染豚が多数存在し、キャリアーとなる。本病の感染は主として感染豚の鼻汁や分泌物を含んだ飛沫の吸入や、直接病豚の鼻端への接触によるものと考えられている[45]。はじめて本菌が侵入した豚群では肺炎や敗血症の発病率が高く、死亡事故也多発するため、経営上の被害は極めて大きい[7,46]。また、本菌が常在化した豚群においては、発育の遅延や飼料効率の低下が認められ、気候の急変や輸送などのストレス、管理失宜に加えて、*Mycoplasma hyopneumoniae* やウイルスなどの感染が引き金となって発病に至ることもある[7,45]。

A. pleuropneumoniae は、発育の際のニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NAD) 要求性の有無に基づき、NAD 要求性の生物型 1 型と NAD 非要求性の生物型 2 型に型別される [34]。さらに、現在、*A. pleuropneumoniae* は莢膜多糖体の抗原性により、15 種類の血清型に分類されている[2,34]。*A. pleuropneumoniae* は、莢膜の存在および毒素の作用により豚に対して強い病原性を示し [45]、4 種の Apx 毒素 (Apx I、Apx II、Apx III および Apx IV) を産生し菌体外に分泌する。Apx IV はすべての

血清型株が分泌する毒素であるが、Apx I、Apx II および Apx III およびそれらの遺伝子保有は、各血清型で特異的である[11,36,45]。

かつては国によって、分離される血清型が限定される傾向にあった[45]。以前は、日本、スイスやデンマークでは 2 型が圧倒的に多く他の血清型はほとんど分離されず、またカナダ、台湾、米国では 5 型が主に分離されていた。現在では各国の分離菌株の血清型にも変化が認められ、カナダは 5 型に代わって 1 型が多くなり、台湾では 5 型のほかに 1 型の分離頻度が高くなっている[29,45]。オーストラリアでは新しく提唱された血清型の 15 型が多く分離されている[2]。これまで日本では血清型 2 型が多く分離されているが、次いで 1 型、5 型が多く分離されており、近年、分離される血清型は多様化している[1,12,15-17,24,38,40,46]。豚胸膜肺炎の予防薬として、1986 年以降数種の不活化ワクチンが市販されているが、これらの不活化ワクチンは血清型特異的で特定の血清型の発症予防を効能および効果として示している。そのため、ワクチン接種時には、野外で流行している血清型を知ることが重要である。

発病豚又は発病豚群に対する治療としては、抗菌剤の投与が一般的に行われているが、野外で流行している起因菌の各種薬剤に対する感受性の成績は、抗菌剤の一次選択を行う上で極めて重要な情報である。このことから、本菌の有効な発症予防や治療には、本菌の血清型および薬剤感受性の情報が一助となると考えられたため、本研究では、日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型および薬剤感受性の分離年毎の推移を調査した。

現在、世界中で薬剤耐性の *A. pleuropneumoniae* が観察されている。これまで日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性調査においてオキシテトラサイクリン (OTC) およびクロラムフェニコール (CP) への耐性株が、1995～97 年にわたる分離株において増加したことが明らかにされた[39,46]。日本においては、テトラサイクリン系抗生物質は 1960 年代に動物用医薬品として承認されたが、未だに豚疾病の治療においては最もよく使用されている抗生物質である[41]。テトラサイクリン耐性は一般的に細菌がテトラサイクリン耐性遺伝子(*tet* genes)を獲得することに

関係している [27]。海外においては、テトラサイクリン耐性の *A. pleuropneumoniae* から *tet(B)* 遺伝子がしばしば検出されているが、他にも *tet(H)*、*tet(L)* および *tet(O)* 遺伝子が検出されている [3,44]。*tet(B)*、*tet(H)* および *tet(L)* 遺伝子はテトラサイクリンの菌体外排出機能に関与するが、*tet(O)* 遺伝子は、リボゾームの保護に関与することによって菌体がテトラサイクリン耐性を獲得する [27]。したがって、テトラサイクリン耐性株のテトラサイクリン耐性機序は、保持している *tet* 遺伝子を検出することで明らかとなる。しかしながら、日本で分離されたテトラサイクリン耐性 *A. pleuropneumoniae* の *tet* 遺伝子のタイプに関する情報は少ない。そのため、*tet* 遺伝子のタイプが明らかになれば、日本で分離されたテトラサイクリン耐性 *A. pleuropneumoniae* の耐性機構が明らかとなり、さらに疫学情報としても有益と考えられる。

A. pleuropneumoniae の分子疫学調査はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) をはじめ、様々な方法で実施されている [6,13,14,25]。海外分離株では、*A. pleuropneumoniae* の分子疫学調査により、*A. pleuropneumoniae* は分離された国に拘わらず相同性が高く、クローナルに伝播している可能性があることが示唆されている [3]。しかしながら、国内分離 *A. pleuropneumoniae* 株について、PFGE による分子疫学調査の情報は少ない。本研究では OTC 耐性株の増加原因の解明の一助として、日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の OTC 耐性株の *tet* 遺伝子保有状況を調査した。さらに、*A. pleuropneumoniae* において薬剤感受性と PFGE 型の関連を調査した報告は少ないため、PFGE を用いて OTC 感受性株および OTC 耐性株の PFGE 型を調べることにより、OTC 感受性と PFGE 型の関連についての解析を試みた。

日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型を寒天ゲル内沈降反応を用いて調査したところ、血清型別が不能な株 (UT 株) が増加していた。これら UT 株について、他の血清型別法であるスライド凝集反応及び血清型別用マルチプレックス PCR により再血清型別を実施した。また、寒天ゲル内沈降反応で血清型別が不能であった要因を調べるために、寒天ゲル内沈降反応で用いる抗原の加熱抽出条件の影響を検討した。さらに、

寒天ゲル内沈降反応で型別可能株と不能株について PFGE を実施し両者間での遺伝子型の違いを検討した。

以上 *A. pleuropneumoniae* による感染の効果的な制御の観点から、微生物学的ならびに疫学的情報を得るため、日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型、薬剤感受性、*tet* 遺伝子の検出、PFGE 解析および UT 株の再血清型別と性状解析を行った。

第 I 章 豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* の血清型の推移

1. 小緒

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下、*A. pleuropneumoniae*) は豚の胸膜肺炎の起病因菌であり、初めて本菌が侵入した豚群では肺炎や敗血症の発病率が高く、死産事故也多発するため、経営上の被害は極めて大きい[7,45]。また、本菌が常在化した豚群においては、発育の遅延や飼料効率の低下がみられ、気候の急変、輸送などのストレスや管理失宜が引き金となって発病に至ることもある[7,45]。胸膜肺炎の予防薬として血清型 1 型、2 型あるいは 5 型に対する複数の不活化ワクチンが現在市販されているが、これらのワクチンは同一血清型の感染における発症の予防を目的として使用されるものであり、すべての血清型の発症を予防するものではない。そのため、ワクチンを使用する農場で発生に關与する血清型を調査し、原因となる血清型に効果的なワクチンを使用する必要がある。

1980 年代は日本における野外発生株のほとんどが血清型 2 型であったが、その後、様々な血清型の株が増え、特に血清型 1 型と 5 型が増加するなど[16,17,40]、日本で分離される *A. pleuropneumoniae* の血清型は、多様化を示している。したがって、微生物学的性状の把握とともに、本病の防疫やワクチン開発においても、流行している血清型を調査することは重要である。

そこで、第 I 章では、1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の血清型を明らかにするとともに、1986 年から 1987 年分離株の血清型を参照し分離年別の血清型の推移を調査した。

2. 材料と方法

(1) 供試株

病性鑑定のために発症豚の肺病変部より 1999 年から 2000 年にかけて 24 都道府県の家畜保健衛生所で分離された 125 株および 2002 年から 2005 年にかけて 26 都道府県の家畜保健衛生所で分離された 101 株を血清型別に供試した。分離された都道府県は全国的であり地域について偏りはなか

った。

(2) 血清型別

各血清型参照株のホルマリン不活化全菌体で免疫した抗 1～12 および 15 型家兎免疫血清と、供試株の加熱抽出抗原とを用いた寒天ゲル内沈降反応により供試株の血清型を調べた[40]。抗原抽出は、121℃で 1 時間加熱し、遠心分離を行い、その上清を使用した。1986 年から 1987 年にかけて 11 都道府県農場（主に東北～関東地方）からと畜場に出荷された豚の肺病変部から分離された *A. pleuropneumoniae* 178 株については、Suzuki らの文献より引用した[40]。分離年ごとの株数は χ^2 検定で比較した。

3. 結果

1999 年から 2000 年に分離した 125 株の血清型は、1 型 24 株(分離株に占める割合 (%) : 19.2%、分離都道府県数 : 9)、2 型 76 株(60.8%、19)、3 型 1 株(0.8%、1)、5 型 15 株(12.0%、8)、6 型 2 株(1.6%、1)、7 型 2 株(1.6%、1)であった(表 1)。血清型を特定できなかった血清型別不能株(以下、UT 株)は 5 株であった。

2002 年から 2005 年に分離した 101 株の血清型は 1 型 8 株(分離株に占める割合 (%) : 7.9%、分離都道府県数 : 6)、2 型 66 株 (65.3%、24)、5 型 14 株(13.9%、8)、15 型 2 株(2.0%、2)であった(表 1)。15 型株 2 株の分離年はそれぞれ 2003 年および 2004 年であった。UT 株は 11 株であった。本調査では、血清型 13 型および 14 型の家兎免疫血清がなく調査していないが、血清型 13 型株および 14 型株のほとんどはニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NAD) 非要求型の株である。供試株は NAD 要求型の株であったため、UT 株が血清型 13 型および 14 型である可能性は低い。

調査年を通して、血清型と分離された都道府県には偏りがなく、特定地域に特定の血清型が偏って分離された傾向はなかった。分離年ごとに血清型の分離株数を統計学的に比較すると、1999 年から 2000 年分離株の血清型 1 型の分離株数は他の年度の分離株数と比較して有意に多かった(1986 年から 1987 年 : $p < 0.01$ 、2002 年から 2005 年 : $p < 0.05$)。1986 年から 1987

年分離株の血清型 2 型は他の年度の分離株数と比較して有意に多く、5 型の分離株数は有意に低かった ($p<0.01$)。また、UT 株の 2002 年から 2005 年分離株数 (11 株) は 1986 年から 1987 年分離株数 (1 株) と比較して有意に多かった ($p<0.01$)。

4. 考察

1999 年から 2000 年および 2002 年から 2005 年分離株と、1986 年から 1987 年分離株の血清型と比較すると、血清型 2 型の分離株数は有意に減少したが、血清型 5 型の分離株は有意に増加したことが確認された。一方、血清型 1 型については、1999 年から 2000 年分離株が、1986 年から 1987 年分離株だけでなく 2002 年から 2005 年分離株についても有意に高く分離され、血清型 1 型の分離傾向は分離年ごとに異なっていた。1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の血清型 1 型が分離されたのはそれぞれ 9 県および 6 県であり、1999 年から 2000 年分離株においては 1 県から 9 株が分離された。1999 年から 2000 年分離株において、血清型 1 型が増加したのは、特定の県より多数の株が分離されたことによる影響と考えられた。

今回の調査において、2003 年および 2004 年に血清型 15 型株が分離された。血清型 15 型は 2002 年に新しく提唱された血清型であり、1990 年にオーストラリアで分離された株が最初の分離である。現在、オーストラリアでは血清型 15 型の分離率が高い[2]。日本においても、2003 年に分離された株が血清型 15 型様株であったと 2007 年に報告がある[26]。新しい血清型が分離される原因としては、輸入豚を介して国内に侵入した可能性が高いとされており[12,15]、日本における血清型 15 株の分離についても輸入豚を介して侵入した可能性がある。農林水産省動物医薬品検査所が実施している動物用医薬品の事故防止・被害対応業務における病性鑑定由来細菌の性状調査成績概要[36]において、2013 年度に収集された *A. pleuropneumoniae* の血清型は、2 型が最も多く(分離率 : 55.6%)、次いで 1 型(18.1%)、15 型(15.3%)、5 型 (8.3%)、6 型(1.4%)、12 型(1.4%)であった。血清型 2 型が優勢であることに変化はなかったが、15 型の分離率の

増加が認められている。今後、血清型 15 型が日本での分離率が高く維持されるのか一時的に高値な分離なのかその趨勢を注視する必要がある。

調査年を通して、血清型 2 型が優勢（60.8%～65.3%）であったが、近年における分離株の血清型は多様化しているため、豚胸膜肺炎の予防のためには、農場に浸潤している血清型を明らかにする必要があることが確認された。また、UT 株の分離が増加していることから、今後も *A. pleuropneumoniae* の血清型を調査する必要があると考えられた。

5. 小括

調査年（1999 年から 2000 年及び 2002 年から 2005 年）を通して、血清型 2 型の分離が多く、次いで 1 型、5 型の分離が多く認められた。他に血清型 3 型、6 型、7 型株が散見され、2003 年および 2004 年においては、新しい血清型の 15 型株が分離された。今後、血清型 15 型株の浸潤について注視する必要がある。1986 年から 1987 年分離株と比較して、1999 年から 2000 年および 2002 年から 2005 年分離株の血清型 2 型株数は有意に減少し、血清型 5 型株数は有意に増加した。血清型 1 型株は 1999 年から 2000 年分離株において、他の調査年と比較して有意に多かった。また、2002 年から 2005 年分離株は、1986 年から 1987 年分離株と比較して UT 株が有意に増加していた。

第Ⅱ章 豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* の薬剤感受性の推移

1. 小緒

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下、*A. pleuropneumoniae*) は豚の胸膜肺炎の起病因菌であり、初めて本菌が侵入した豚群では肺炎や敗血症の発病率が高く、死亡事故も多発するため、経営上の被害は極めて大きい[7,45]。発病豚または発病豚群へは抗菌剤による治療が必要となる。そのため、野外で流行している起病因菌の各種薬剤に対する感受性の調査は、抗菌剤の一次選択を行う上で極めて重要な情報となる。世界中で薬剤耐性の *A. pleuropneumoniae* が観察されているが、これまでの日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性調査によりオキシテトラサイクリン (OTC) およびクロラムフェニコール (CP) に対して耐性を示した株が、1995～97 年分離株で増加したことが明らかにされた[39,46]。また、抗菌剤を投与することにより、投与された薬剤に対する耐性が起こることが知られている。

そこで、第Ⅱ章では、1986 年から 1987 年分離株、1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の薬剤感受性を調べ、*A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性の推移を検討した。

2. 材料と方法

(1) 供試株

第 1 章で供試した *A. pleuropneumoniae* 株、すなわち、1986 年から 1987 年にかけて 11 都道府県の農場からと畜場へ出荷された豚の肺病変部から分離された 178 株[40]、病性鑑定のために発症豚より 1999 年および 2000 年において 24 都道府県の家畜保健衛生所で分離した 125 株および 2002 年から 2005 年にかけて 26 都道府県の家畜保健衛生所で分離した 101 株を薬剤感受性試験に供試した。

(2) 薬剤感受性試験

1986 年から 1987 年分離株の薬剤感受性試験には、アモキシシリン (AMPC)、アスポキシシリン (ASPC)、セフトロフル (CTF)、スペクチ

ノマイシン (SPC)、ミロサマイシン (MRM)、チルミコシン (TMS)、ドキシサイクリン (DOXY)、ビコザマイシン (BCM)、チアンフェニコール (TP)、フロルフエニコール (FF)、チアムリン (TML)、トリメトプリム (TMP) エンロフロキサシン (ERFX)、オルビフロキサシン (OBFX)、ダノフロキサシン (DNFX) の 15 薬剤を用い、ベンジルペニシリン (PCG)、ゲンタマイシン (GM)、タイロシン (TS)、オキシテトラサイクリン (OTC)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP) の 6 薬剤に対する薬剤感受性試験結果については、Suzuki らの文献[39]から引用した。1999 年から 2000 年分離株の薬剤感受性試験には、PCG、AMPC、ASPC、CTF、GM、SPC、MRM、TMS、TS、OTC、DOXY、CL、BCM、CP、TP、FF、TML、TMP、ERFX、OBFX、DNFX の 21 薬剤を用いた。2002 年から 2005 年分離株については、アンピシリン (ABPC)、CTF、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、カナマイシン (KM)、エリスロマイシン (EM)、OTC、TP、FF、TMP および ERFX の 10 薬剤を使用した。1986 年から 1987 年分離株および 1999 年から 2000 年分離株の最小発育阻止濃度 (MIC) は、Suzuki ら[39]と同様に日本化学療法学会の方法に従い、寒天平板希釈法 (ミューラーヒントン寒天培地 (Difco) に β -NAD を $25 \mu\text{g/mL}$ 添加) により測定した。耐性限界値は Suzuki ら[39]および Yoshimura ら[46]の報告に準じ、微生物学的耐性限界値として設定した。OTC の耐性限界値は、今回の MIC 分布から、Yoshimura ら[46]のものが適当と判断し、 $6.25 \mu\text{g/mL}$ とした。2002 年から 2005 年分離株の MIC は the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (試験当時は、the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)と称されていた。) のガイドラインに沿って、寒天平板希釈法により測定した [33]。CTF と KM の耐性限界値は CLSI の値に従った。その他の薬剤の耐性限界値は微生物学的耐性限界値として設定した。

(3) 統計処理

1986 年から 1987 年分離株と 1999 年から 2000 年分離株および 1999 年から 2000 年分離株と 2002 年から 2005 年分離株のそれぞれの薬剤に対する耐性株数について、 χ^2 検定により有意差を求めた。

3. 結果

(1) *A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性の推移

A. pleuropneumoniae の薬剤感受性の結果を表 2 に示した。MIC₅₀ 値は、1986 年から 1987 年分離株と 1999 年から 2000 年分離株ではほぼ同じ値であった。しかし、1999 年から 2000 年分離株の MIC₉₀ 値を 1986 年から 1987 年分離株と比較すると、DOXY、TMP、ERFX および DNFX において 4 倍、AMPC、ASPC および OBFX が 8 倍、PCG、OTC、CP および TP が 16 倍それぞれ高くなっていた。次に 2002 年から 2005 年分離株について 1999 年から 2000 年分離株と比較すると、TMP の MIC₅₀ 値および MIC₉₀ 値は 5 倍高く、TP の MIC₉₀ 値は約 3 倍低かった。他の薬剤についてはほぼ同じであった。

1986 年から 1987 年分離株と 1999 年から 2000 年分離株のそれぞれの薬剤に対する耐性株数を比較すると、1999 年から 2000 年分離株の PCG、AMPC、ASPC、OTC、CP および TP に対する耐性株が有意に増加していた ($p<0.01$)。1999 年から 2000 年分離株の内、PCG に耐性であった 17 株中 15 株が AMPC および ASPC においても耐性であった。同様に、TP に耐性であった 38 株中 34 株が CP に対して耐性を示した。テトラサイクリン系薬剤についてみると、OTC に耐性であった 1999 年から 2000 年分離株 56 株中 6 株のみが DOXY に対して耐性であった。新たな薬剤耐性として 1999 年から 2000 年分離株の内、2 株がフルオロキノロン系薬剤 (ERFX、OBFX、DNFX) に、1 株がマクロライド系薬剤 (TMS、MRS) に耐性であった。CTF、GM、SPC、TS、FF および TML に対して耐性を示す株はなく、特に 1999 年から 2000 年分離株の CTF および FF に対する MIC 値はそれぞれ 0.2 および 0.78 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、高い感受性を示した。また、1999 年から 2000 年分離株において AMPC、ASPC、ERFX、OBFX および DNFX に対する耐性株は存在したものの、それらの薬剤に対する感受性株の MIC 値はそれぞれ 0.78、0.2、0.39、0.78 および 0.39 $\mu\text{g/ml}$ 以下であり、高い感受性を示した。特に ASPC、ERFX、OBFX および DNFX に対する MIC 値が $\leq 0.05 \mu\text{g/ml}$ を示す株は、それぞれ 102

株（81.6%）、101 株（80.8%）、104 株（83.2%）および 102 株（81.6%）であった。

2002 年から 2005 年分離株の薬剤耐性株は OTC(27.7%)、DSM(10.9%)、TP(10.9%)、KM(5.9%)、TMP(4.0%)および ABPC(2.0%)で認められた。CTF、EM、FF および ERFX に対してはすべての株が感受性を示した。調査した薬剤の中で OTC 耐性株の割合が最も高かった。2002 年から 2005 年分離株の薬剤感受性は、 β -ラクタム系のペニシリン系（以下、PC 系）、OTC および TP の耐性率が 1999 年から 2000 年分離株と比較して有意に低かった($p<0.01$)。1999 年から 2000 年分離株では認められなかった TMP 耐性株が 2002 年から 2005 年分離株において 4 株認められた。

（2）薬剤耐性パターンと血清型との関係

1999 年から 2000 年分離株の薬剤耐性と血清型との関係を表 3 に示した。血清型 1 型株及び 5 型株は耐性を示した株が感受性を示した株よりも多く、血清型 2 型株は感受性を示した株が耐性を示した株よりも多かった。血清型 5 型の 15 株中 14 株は OTC 単剤耐性であったのに対し、1 型および 2 型で耐性を示した株においては、多剤耐性を示す株が多かった。1999 年から 2000 年分離株ではフルオロキノロン系薬剤およびマクロライド系薬剤（TMS、MRS）に対する耐性株がそれぞれ 1 型の 2 株および 2 型の 1 株で認められた。PC 系薬剤耐性を含む多剤耐性株は 1 型（5 株）、2 型（5 株）、3 型（1 株）および 7 型（2 株）で認められた。

2002 年から 2005 年分離株の薬剤耐性パターンと血清型との関係を表 4 に示した。1999 年から 2000 年分離株と同様に血清型 1 型株及び 5 型株は耐性を示した株が感受性を示した株よりも多く、血清型 2 型株は感受性を示した株が耐性を示した株よりも多かった。血清型 1 型、2 型および 5 型の薬剤耐性の割合は 1999 年から 2000 年分離株と類似していた。5 型株は 1999 年から 2000 年分離株と同様に OTC に対する耐性の割合が高く、薬剤耐性を示した 12 株すべてが OTC 耐性株であり、そのうち 10 株が OTC 単剤耐性であった。

4. 考察

1986年から1987年分離株と1999年から2000年分離株の薬剤感受性を比較すると、PCG、AMPC、ASPC、OTCおよびTPに対する耐性株が有意に増加していた($p<0.01$)。2002年から2005年分離株と1999年から2000年分離株の薬剤感受性を比較すると、PC系薬剤、OTCおよびTPの耐性率が有意に低下していた($p<0.01$)。第I章の調査において、2002年から2005年分離株は、1999年から2000年分離株と比較すると血清型1型株の分離が有意に減少したことが明らかとなった。2002年から2005年分離株のPC系薬剤、OTCおよびTPの耐性率は、1999年から2000年分離株同様、血清型2型株と比較して血清型1型株が高いことから、2002年から2005年分離株のPC系薬剤、OTCおよびTPの薬剤に対する耐性率が低下したのは、薬剤耐性率の高い1型株の分離率の減少が影響したものと考えられた。

薬剤感受性を血清型ごとに比較すると、1999年から2000年分離株および2002年から2005年分離株の血清型1型株および5型株は、薬剤感受性株よりも耐性株の割合の方が高く、さらに、血清型1型株は、多剤耐性を示し、血清型5型株はOTCに対する単剤耐性率が高かった。血清型2型株は、薬剤耐性株よりも感受性株の方が多かった。*Mannheimia haemolytica* は血清型により薬剤感受性が異なると報告があるが[21]、近年に日本で分離される *A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性においても、血清型により特徴があることが明らかとなった。興味深いことに、血清型2型株のTPの耐性率が1999年から2000年株では21.1% (16/76) であったが、2002年から2005年分離株では4.5% (3/66) に有意に減少した。1999年から2000年分離株の血清型2型でOTCに耐性を示した13株のうち8株(61.5%)がCP系に対しても耐性を示したが、2002年から2005年分離株においてはそのような株は見られなかった。また、既報により、1985年から1989年分離株[16]および1986年ならびに1987年分離株[39]の血清型1型株はすべて薬剤感受性株であった。しかしながら1987年および1988年分離株[12]や1990年代の分離株[1,15,46]の血清型1型株は多剤耐性であり、1987年以降から血清型1型株の多剤耐性株が認められた。

このような血清型 1 型株および 2 型株の耐性の変化の解明のためには、それらの株の遺伝子分析を実施する必要があると考えられた。

PC 系薬剤に対する耐性機構は多種存在し、耐性を獲得した場合、複数の PC 系薬剤に対して耐性を示すことがある[10,28,46]。1999 年から 2000 年分離株の内、PCG に耐性を示した 17 株中 15 株は、AMPC および ASPC にも耐性を示したので、これら 3 種類のペニシリン系薬剤に対する耐性は、交差耐性の可能性があった。1999 年から 2000 年分離株の内、PC 系薬剤に対して耐性を示した株の割合（以下、「耐性率」）は 12.0～13.6%であったが、既報の 1986 年から 1987 年分離株[39]、1988 年から 1989 年分離株[12]、1992 年から 1994 年分離株[1]、1995 年から 1997 年分離株[46]及び本調査の 2002 年から 2005 年分離株では、それぞれ 1.1%、3.9%、7.5%、4.4%及び 2.0%であった。1997 年以前の実験調査では、PC 系薬剤に対する耐性率は低い値であったが、1999 年から 2000 年分離株においては、耐性株が増加し、2002 年から 2005 年分離株では耐性株が再び減少した。2002 年から 2005 年分離株では、前述したように薬剤耐性率の高い血清型 1 型の分離率が 1999 年から 2000 年分離株と比較し減少したため、PC 系薬剤に対する耐性率が低下したと考えられた。また、1999 年から 2000 年分離株の PC 系薬剤に対する耐性株が、血清型 2 型、3 型、7 型および血清型別不能株（以下、UT 株という。）で認められたが、2002 年から 2005 年分離株では血清型 3 型および 7 型は分離されず、また、血清型 2 型および UT 株において PC 系薬剤に耐性を示す株は分離されなかった。これら血清型 1 型、3 型および 7 型の分離率の違いおよび血清型 2 型および UT 株における PC 系薬剤に対する耐性株の消失が PC 系薬剤に対する耐性率の減少に影響を与えたと考えられた。

Kawahara ら[22]の調査では、1983 年以前の実験株はテトラサイクリンに対してすべて感受性であったが、1985 年以降の実験株では耐性を示す株が多かった。一方、他の 1980 年代後半に分離した株の調査[12,16,19]では、テトラサイクリンに対する耐性割合が少ないとする報告もある。しかしながら、1992～94 年分離株での調査成績[1]は OTC の耐性限界値を今回の我々の成績と同様に設定すると、耐性率は 55.2%であった。さらに、1995

～97 年分離株[46]の成績でも、OTC 耐性限界値を同様に設定すると、30%以上が耐性株であった。本調査において、1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株を調べた結果、それぞれ 44.8%および 27.7%と高い耐性率を示した。これらの経時的状況を考えると、OTC 耐性株は 1980 年代後半から出現し、1990 年代の初めには耐性株が全国的に広がったと推察された。OTC 耐性株の伝播の解明のために、遺伝子解析が必要と考えられた。一方、同じテトラサイクリン系薬剤であっても、OTC と DOXY に対する感受性は大きく異なっていた（1986 年から 1987 年分離株の DOXY 耐性株数/OTC 耐性株数:1/10、1999 年から 2000 年分離株の DOXY 耐性株数/OTC 耐性株数：6/56）。Bousquest ら[5]の報告では、OTC 耐性を示した *A. pleuropneumoniae* 分離株は、すべて DOXY に対して感受性であった。その理由として、DOXY は OTC と比較し高い脂溶性のため、抗菌活性が高いのではないかと考察している。1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株における血清型 5 型については、それぞれ 15 株中 14 株および 14 株中 12 株が OTC 耐性を示し、血清型 5 型における OTC 耐性率は、以前に報告[39,46]されたものと同様に高値であった。これらの 1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の OTC 耐性血清型 5 型株は、それぞれ 8 県から分離されており、同じクローンによる発生ではないと推察された。1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の調査では、血清型 5 型の耐性パターンは、OTC 単剤耐性であったが、韓国分離株の血清型 5 型は多剤耐性を示す株があり[24]、血清型 5 型がすべて OTC 単剤耐性とは言えない。この耐性化傾向の差異については、両国間での抗菌剤の使用状況の違い等を反映したのかもしれないが、詳細な原因については明らかにすることは出来なかった。

CP および TP に対する耐性率は、1986 年から 1987 年分離株ではそれぞれ 1.1%および 1.7%だったが[39]、1999 年から 2000 年分離株では 27.2%および 30.4%と増加した。これらの耐性率は既報[12,15-17,19,24,46]からも確認されている。したがって、CP 又は TP の耐性株は 1990 年代に増加したものと考えられた。

食用動物においては、CP 製剤は 1998 年以降使用されていないが、1999 年から 2000 年分離株における CP 耐性率（27.2%）は、1995～1997 年の成績[46]と同様（24.0%）であり、耐性率の低下は認められなかった。CP の耐性率が依然高い理由としては、使用中止から時間が経過していないということもあるが、CP は本菌感染症を適応症とする製剤成分の一つである TP と同じフェニコール類であり、交差耐性により耐性を示している可能性が考えられる。2002 年から 2005 年分離株の TP 耐性率は 10.9%となり 1999 年から 2000 年分離株と比較して有意に減少した。2002 年から 2005 年分離株の TP 耐性率の減少は、薬剤耐性率の高い血清型 1 型株の分離率の減少と、TP 耐性を示す血清型 2 型株の減少が影響したものと考えられる。FF もフェニコール類ではあるが、FF は TP に対して耐性を示す *A. pleuropneumoniae* にも有効とされている[43]。1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株の成績では、Yoshimura ら[46]の報告と同様に、FF 耐性株は認められなかった。しかし、FF は豚の胸膜肺炎治療薬としては、1992 年以降に認可された比較的新しい製剤であることから、今後も *A. pleuropneumoniae* の FF に対する感受性を継続的に調査する必要がある。

1999 年から 2000 年分離株の調査では、フルオロキノロン系薬剤である ERFX、OBFX および DNFX に対する耐性が 1 型（2 株）で、マクロライド系薬剤である MRS と TMS に対する耐性が 2 型（1 株）で認められ、それらの株はいずれも多剤耐性株であった。豚疾病を適応症とするフルオロキノロン系薬剤が認可されたのは 1992 年以降である。フルオロキノロン剤の獣医療への導入の歴史は比較的新しく、かつ人の医療への影響が懸念されている成分でもあり、今後もフルオロキノロン系薬剤に対する感受性を継続的に監視していく必要がある。農林水産省動物医薬品検査所が実施している動物用医薬品の事故防止・被害対応業務における病性鑑定由来細菌の性状調査成績概要[35]において、2013 年度に収集された *A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性試験の結果は、ABPC(耐性率;1.4%)、DSM (20.8%)、KM (7.5%)、OTC (54.2%)、DOXY (27.85)、TMP (5.6%) 及び TP (20.8%) に対する耐性株が認められた。一方で FF、EM、CTF

及び ERFX にたいしてはすべて薬剤感受性であった。これらの薬剤感受性の傾向は、2002 年分離株～2005 年分離株と概ね同様であることが示唆された。農林水産省動物医薬品検査所において、以前から家畜由来細菌のフルオロキノロン系薬剤感受性を調査しており、サルモネラ[8]、大腸菌[23]、カンピロバクター[18]あるいはブドウ球菌[31]で耐性株が出現していることを報告している。フルオロキノロン剤は、人の医療上だけでなく、動物の治療薬としても極めて重要な薬剤であることから、使用上の注意を遵守し、その使用に当たっては、耐性菌の発現等を防ぐため、原則として感受性を確認し、適応症の治療上必要な最小限の投与に止めるように努めなければならない。抗菌剤の使用に当たっては、国際的な共通認識である慎重使用を心掛けなければならない。臨床現場においても啓蒙活動が実施されている。今後、慎重使用により薬剤感受性に変化が現れるか、調査を続けることが重要であると考えられた。

5. 小括

1999 年から 2000 年分離株は 1986 年から 1987 年分離株と比較して、PC 系薬剤、OTC、CP および TP に対する耐性率が有意に増加していた。2002 年から 2005 年分離株は 1999 年から 2000 年分離株と比較して PC 系薬剤、OTC および TP に対する耐性率が有意に減少したが、その他の薬剤に対する感受性には変化はなかった。2002 年から 2005 年分離株における薬剤感受性の傾向は、PC 系薬剤、OTC および TP に対して耐性傾向のある 1 型株の分離頻度の減少が影響しているものと考えられた。供試した薬剤では OTC に対する耐性率が一番高い値を示し、OTC の耐性株の伝播の解明のために、遺伝子解析が必要と考えられた。近年の日本における分離株は、血清型ごとに薬剤感受性に特徴があり、血清型 1 型は多剤耐性、5 型は OTC 単剤耐性を示す株が多く、2 型株は薬剤に感受性を示す株が多かった。

第Ⅲ章 豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* のテトラサイクリン耐性遺伝子とパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子解析

1. 小緒

第Ⅱ章において、日本で分離された *Actinobacillus pleuropneumoniae* (以下、*A. pleuropneumoniae*) の薬剤感受性試験において、OTC 耐性率が他の薬剤に比べて高いことが示された。OTC に対する耐性は、テトラサイクリン耐性 (*tet*) 遺伝子の獲得と関係している[27]。海外分離株の *A. pleuropneumoniae* においては、しばしば *tet*(B)遺伝子が検出されているが、その他 *tet*(H)、*tet*(L)および *tet*(O)遺伝子が検出されており、その多くはプラスミド上に存在する[3,44]。また、*A. pleuropneumoniae* の分子疫学調査は様々な手法で行われており、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) もその一つである[6,13]。*A. pleuropneumoniae* の分子疫学調査により、*A. pleuropneumoniae* は分離された国に拘わらず相同性が高く、クロールに拡散している可能性が示唆されている[13]。しかし、日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の *tet* 遺伝子の検出や PFGE 解析に関する報告は少ない。

そこで第Ⅲ章では日本で分離された *A. pleuropneumoniae* の OTC 耐性遺伝子に関する分子疫学情報を得るために、*tet* 遺伝子の検出を行うとともに、日本で最も分離されている血清型 2 型と OTC 単独耐性という特徴を持った血清型 5 型とを用いて PFGE 解析を行い、OTC 耐性と遺伝子型との関係を検討した。

2. 材料と方法

(1) *tet* 遺伝子検出の供試株

第Ⅱ章で供試した 1986 年から 2005 年において日本で分離された株の内、OTC に耐性を示した 80 株を *tet* 遺伝子の検出に供試した。80 株のうち 10 株は 1986 年から 1987 年にと畜場の肺病変から分離された株[39]、42 株は 1999 年から 2000 年に胸膜肺炎を発症した豚から分離された株、28 株は 2002 年から 2005 年に胸膜肺炎を発症した豚から分離された株であった。

(2) *tet* 遺伝子検出の Polymerase chain reaction (PCR)

A. pleuropneumoniae で検出された *tet* 遺伝子を中心に、*tet*(A)、*tet*(B)、*tet*(H)、*tet*(L)、*tet*(M)、*tet*(O) および *tet*(S) 遺伝子について、Blannco らの方法に準じた PCR により各遺伝子検出を行った[3]。

(3) PFGE の供試株

1986 年から 2005 年の間に分離された株の内、国内で最も分離される血清型の 2 型 64 株および 5 型 19 株の野外分離株の合計 83 株を PFGE の解析に供試した。参照株として *A. pleuropneumoniae* 1536 株(血清型 2 型)、K17 株(血清型 5a 型) および L20 株(血清型 5b 型) を供試した。血清型 2 型の供試株は、OTC 感受性と OTC 耐性株を分け、同時期に同じ都道府県から分離され薬剤感受性パターンが同じ株については地域的に関連があると考え除外した。OTC 耐性株については、*tet* 遺伝子検出 PCR で多く検出された *tet*(B) 遺伝子陽性株、*tet*(H) 遺伝子陽性株と *tet* 遺伝子不明であった株を供試した。血清型 5 型についても血清型 2 型同様に株を選別した。その結果、血清型 2 型は 21 都道府県、血清型 5 型は 12 都道府県より分離された株となり、地域は北海道から九州までとなった。野外分離株中の血清型 2 型の 14 株と血清型 5 型の 1 株は、1986 年から 1987 年にと畜場出荷豚の肺病変部から分離された株であった。その他の血清型 2 型株と血清型 5 型株は 1999 年から 2000 年および 2002 年から 2005 年に胸膜肺炎を発症した豚から分離された株であった。

(4) PFGE

PFGE は Chatellier ら方法により実施した[6]。アガロースブロックに包埋されたゲノム DNA を 40U の *Apa*I (TakaRa, Shiga, Japan) で一晩反応させて切断し、電気泳動は CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用い、スイッチ時間は 5~20 秒、ボルト数は 200v、温度は 14℃、泳動時間は 20 時間であった。PFGE プロファイルは Molecular Analyst Software Fingerprinting Plus (Bio-Rad) あるいは FPQuest Software

Version 4.5 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)を用いて解析した。相同性は Dice coefficient で行い、クラスター解析は Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)を用いて行った。

3. 結果

(1) *tet* 遺伝子の検出

A. pleuropneumoniae の OTC 耐性株の 80 株中 73 株から *tet* 遺伝子が検出された。このうち *tet*(B)遺伝子が最も多く 61 株から検出され、次いで *tet*(H)遺伝子が 6 株、*tet*(O)遺伝子が 5 株および *tet*(A)遺伝子が 1 株から検出された(表 5)。7 株は OTC に耐性を示したが、*tet* 遺伝子検出 PCR において陰性であった。*tet*(B)遺伝子は血清型別では血清型 1 型、2 型、5 型、6 型、15 型および血清型別不能株（以下、UT 株）で認められ、血清型 1 型、5 型、6 型及び 15 型の株は分離年に拘わらず *tet*(B)遺伝子のみ検出された。分離年代別では、*tet*(B)遺伝子は、OTC 耐性株の 1986-1987 年分離株 10 株中 1 株（10%）のみであったが、1999 年から 2000 年分離株 42 株中 39 株（92.9%） および 2002 年から 2005 年分離株 28 株中 21 株（75.0%）に認められた。

(2) PFGE の解析

PFGE 解析の結果、*A. pleuropneumoniae* 血清型 2 型株は 6 パターンの型（2A～2F）に分類された(図 1)。野外分離株 64 株のうち、すべてのと畜場出荷豚由来株 14 株と豚胸膜肺炎を発症した豚由来株 38 株の合計 52 株(81.3%)と血清型 2 型参照株の 1536 株は 2A 型に分類された（表 6）。野外分離株の 7 株は 2B 型、2 株は 2C 型に分類された。残りの 3 株はそれぞれ 2D～2F 型に分類された。2B 型は他の型に認められない約 145.5kb のバンドが認められた。各 PFGE 型の相同性は 80.0%以上であり、それぞれの型は 2A 型と相似していた。

血清型 5 型株は 6 パターンの型（5A～5F）に分類された(図 2)。野外分離株 19 株のうちと畜場出荷豚由来の株 1 株を含む 15 株（78.9%）は 5B 型に分類された。野外分離株の 1 株と血清型 5a 参照株の K17 株は 5A 型

に分類された。野外分離株の残りの 3 株はそれぞれ 5C～5E 型に分類され、血清型 5b 参照株の L20 株は 5F 型に分類された。5B、5C 及び 5D 型には 5A、5E 及び 5F 型にはない 48.5kb より小さいバンドが認められた。5 型株の各 PFGE 型の相同性は 80.0%以上であり、それぞれの型は 5B 型と相似していた。

(3) OTC 耐性と PFGE 型の関係

血清型 2 型株においては、OTC 感受性株は 2A および 2C～2F 型に分類され、OTC 耐性株は 2A および 2B 型に分類された（表 6）。血清型 5 型株においては、OTC 感受性株は 5A および 5E 型に分類され、OTC 耐性株は 5B～5D 型に分類された。

tet 遺伝子に着目すると、血清型 2 型の *tet*(B) 遺伝子陽性株は 2B に分類されたが、*tet*(H) 遺伝子陽性株は 2A 型に分類された。OTC 耐性株であるが、*tet* 遺伝子不明株は 2A 型に分類された。血清型 5 型の *tet*(B) 遺伝子陽性株は 5B～5D 型に分類された。

(4) 供試株の分離年または由来と PFGE 型の関係

血清型 2 型株は、1986 年から 1987 年分離株は、2A 型のみであったが、1999 年から 2000 年分離株では 2A、2B および 2C 型の 3 型に、2002 年から 2005 年分離株は、2A、2C、2D、2E および 2F 型の 5 型に増加した（表 6）。血清型 5 型株は、1986 年から 1987 年分離株は 5B 型で、1999 年から 2000 年分離株は 5A および 5B 型の 2 型に、2002 年から 2005 年分離株は 5B、5C、5D および 5E 型の 4 型に増加した。

供試株の由来に着目すると、血清型 2 型の胸膜肺炎発症豚由来株（1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株）は 2A～2F 型に分類された。またすべてのと畜場出荷豚由来株（1986 年から 1987 年分離株）は 2A 型に分類された。血清型 5 型の胸膜肺炎発症豚由来株は 5A～5E 型に分類され、と畜場出荷豚由来株は 5B 型であった。

4. 考察

本研究において、*tet* 遺伝子の検出の結果から、*tet(B)* 遺伝子が 1999 年以降の主要な *tet* 遺伝子であることが明らかとなった。日本においてもスペイン[3]やノルウェー[44]と同様に *tet(B)* 遺伝子が最も検出される *tet* 遺伝子であった。第 II 章より、1990 年代以降、日本で分離される *A. pleuropneumoniae* 株においてテトラサイクリン耐性が最も多く認められることが示されたが、日本におけるテトラサイクリン耐性の増加は *tet(B)* 遺伝子陽性株の増加が影響していることが示唆された。*tet(A)*、*tet(B)*、*tet(H)* 遺伝子はテトラサイクリンの菌体外排出機能に関与し、*tet(O)* 遺伝子は、リボゾームの保護に関与することによって菌体がテトラサイクリン耐性を獲得する[27]。日本で分離された OTC 耐性 *A. pleuropneumoniae* 株の多くの OTC 耐性機構は、保持した *tet* 遺伝子の種類より OTC の菌体外排出機能による耐性機構であることが示唆された。

表 5 より *tet* 遺伝子と株の由来の関係においては、血清型 2 型および 5 型のと畜場出荷豚由来 OTC 耐性株（1986 年から 1987 年分離株）は、胸膜肺炎発症豚由来 OTC 耐性株（1999 年から 2000 年分離株および 2002 年から 2005 年分離株）と同様にそれぞれ *tet(H)* 遺伝子と *tet(B)* 遺伝子が陽性であった。調査期間を通して、血清型 2 型株の OTC 耐性株においては、*tet(A)*、*tet(B)*、*tet(H)* および *tet(O)* 遺伝子が検出された。血清型 1 型、5 型、6 型および 15 型のすべての OTC 耐性株からは *tet(B)* 遺伝子が検出され、血清型 7 型の OTC 耐性株からは、*tet(O)* 遺伝子のみが検出された。スペインで分離された OTC 耐性血清型 1 型株は *tet(L)* 遺伝子、2 型株は *tet(B)* 遺伝子、6 型株は *tet(O)* 遺伝子、7 型株は *tet(B)* および *tet(O)* 遺伝子が陽性であり[3]、日本とは異なっていた。したがって、血清型と耐性遺伝子の関係は分離された国により異なるものと推定された。

第 II 章において、1999 年から 2000 年分離株の OTC 耐性血清型 2 型株の 13 株中 8 株は CP 系に耐性を示したが（表 3）、2002 年から 2005 年分離株の OTC 耐性血清型 2 型株はそのような株はなかった（表 4）。本研究より、1999 年から 2000 年分離株の血清型 2 型株の OTC 耐性分離株 12 株中 11 株は、*tet(B)* 遺伝子が陽性であったが、2002 年から 2005 年分離株においては 7 株中 5 株が *tet(A)* あるいは *tet(H)* 遺伝子が陽性であり、1999

年から 2000 年分離株と 2002 年から 2005 年分離株の胸膜肺炎発症豚から検出された株の *tet* 遺伝子は異なっていた。さらに、PFGE 型から (表 6)、1999 年から 2000 年分離株の OTC 耐性血清型 2 型株は 2B 型、2002 年から 2005 年分離株の OTC 耐性血清型 2 型株は 2A 型であり PFGE 型が異なっていた。このことにより血清型 2 型の分離年による薬剤感受性の違いは、遺伝子型が異なる株の拡散に起因すると推察された。

血清型 2 型および 5 型株の PFGE 型を年代別にみると、2A および 5B 型株は 1986 年から認められ、2B～2F、5A および 5C～5E 型株は 1999 年以降に出現している (表 6)。血清型 2 型および 5 型株の主な PFGE 型 (2A および 5B 型) については、1986 年以降分離年代に関わりなく、常に主要な PFGE 型として分離されていることから、20 年近く主要な遺伝子型に変化がないことが判明した。第 II 章の結果では、日本の *A. pleuropneumoniae* 株は血清型毎に薬剤耐性パターンに特徴が認められた。その血清型毎の特徴ある薬剤感受性はこのように長年にわたって同じ遺伝子型の株が分布していることによるものと示唆された。血清型 2 型株の 2B～2F 型および 5 型株の 5A・5C～5E 型はそれぞれ、2A 型および 5B 型と相似していたことから、2B～2F 型および 5A・5C～5E 型株は 2A 型および 5B 型株からの派生が示唆された。このように、近年では、2A 型および 5B 型以外の株が分離されてきているので、今後も *A. pleuropneumoniae* 株の種々の性状を把握するうえでも疫学調査を続ける必要があるが、近年、遺伝子型を調査する方法として multilocus sequence typing (MLST) 法が行われており、この手法を用いた遺伝子型別を検討する必要がある。

血清型 5 型の OTC 耐性株はすべて *tet*(B) 遺伝子が陽性であった。そのため OTC 耐性血清型 5 型株はクローナルな株と考えられたが、PFGE 解析により *tet*(B) 遺伝子陽性株の中でも異なる遺伝子型 (5B～5D 型) があることが示された。血清型 5 型株は PFGE 型により OTC 感受性株 (5A および 5E 型) と OTC 耐性株 (5B～5D 型) に分類できたが、血清型 2 型株においては 2A 型に OTC 感受性株と OTC 耐性株が分類されたため、PFGE 型による OTC 感受性の違いを分類することはできなかった。血清型 2 型の *tet*(B) 遺伝子陽性株 (2B 型) は約 145.5kb のバンドが認められ

(図1)、血清型5型の *tet(B)* 遺伝子陽性株 (5B~5D 型) は 48.5kb より小さいバンドが認められた (図2)。これらのバンドは *tet(B)* 遺伝子陽性株のみで認められた。このように、血清型2型および5型の *tet(B)* 遺伝子陽性株の PFGE 型は、*tet(B)* 遺伝子陰性株には認められなかったバンドを認め PFGE 型が異なっていた。*tet(B)* 遺伝子はプラスミド上に存在することが知られているが[3]、血清型2型および5型の *tet(B)* 遺伝子陽性株は PFGE では 2B および 5B~5D 型と特定のクラスターに分類された。そのため、*tet(B)* 遺伝子の広がりには *tet(B)* 遺伝子陽性プラスミドの伝達による広がりではなく、*tet(B)* 遺伝子を保有した株の広がりとし唆され、*tet(B)* 遺伝子を獲得した株は、その遺伝子を維持して日本中に広がった可能性が示された。今後、日本の株における *tet(B)* 遺伝子の菌体内における局在場所と伝達方法また MLST 法による遺伝子型別について検討していく必要がある。

tet(H) 遺伝子陽性株と *tet(H)* 遺伝子陰性株は同じ PFGE 型を示した (2A 型)。*tet(H)* 遺伝子も *tet(B)* 遺伝子同様にプラスミドに存在することが知られているので[3]、2A 型株が *tet(H)* 保有プラスミドを獲得した可能性がある。血清型2型株は増幅断片長多型 (amplified fragment length polymorphism ; AFLP) と PFGE の組み合わせで、より遺伝子型を分類することが可能なので[14]、血清型2型株のさらなる疫学調査には異なる遺伝子解析法の実施が必要と考えられた。

Chatellier ら[6]は、カナダにおける血清型5型の *A. pleuropneumoniae* キャリアー豚由来株と臨床発症豚由来株が同じ PFGE 型を示すことを報告している。日本で分離されたと畜場出荷豚の肺病変部と胸膜肺炎を発症した豚から分離された株が同じ PFGE 型を示したことから、Chatellier ら[6]の報告と同様に、*A. pleuropneumoniae* の病原性は PFGE 型に反映しないことが確認された。

Moller ら[31]はデンマーク、スイス、ベルギー、カナダ、オーストラリアおよびアルゼンチンから分離された *A. pleuropneumoniae* 250 株を供試し、多遺伝子座酵素電気泳動 (multilocus enzyme electrophoresis ; MEE) による解析を行い、37 タイプに分類したが、供試株の 66% が 3 タイプに

分類されたため *A. pleuropneumoniae* はクローナルな構造を有するものと考察した。さらに、Fussing ら[13]は、ヨーロッパ分離株および北アメリカ分離株の血清型 2 型株を供試し、リボタイピング、リボゾーム遺伝子間領域（ribosomal intergenic region）の塩基配列および PFGE 型の結果から、両分離株間の相同性が高く、血清型 2 型株はクローナルである可能性を考察している。今回の調査でも、これらの考察と同様に、日本の血清型 2 型株の 81.3%および 5 型株の 78.9%が同じ型（2A および 5B 型）を示し、それら以外の型においても 2A および 5B 型と相同性が高かったので、*A. pleuropneumoniae* の伝播は、遺伝子的に近縁な株による伝播であることが示唆された。

5. 小括

日本の OTC 耐性 *A. pleuropneumoniae* 分離株の遺伝子学的検索の結果、*tet(B)* 遺伝子が最も多く検出されたことから、日本における *A. pleuropneumoniae* のテトラサイクリン耐性増加は *tet(B)* 遺伝子陽性株の増加が関与している可能性が示唆された。

血清型 2 型および 5 型の日本分離株は PFGE より、それぞれ 6 および 5 パターンの型に分類された。PFGE 型の相同性は、それぞれの血清型間において 80.0%以上と非常に高かった。血清型 2 型の 81.3%および 5 型の 78.9%が同じ PFGE 型に分類され、20 年近く優勢な型には変化はなかった。さらに *tet(B)* 遺伝子陽性株と *tet(B)* 遺伝子陰性株は、PFGE 型が異なっていることから、遺伝子型が異なることが明らかになった。

第Ⅳ章 寒天ゲル内沈降反応で血清型別不能であった豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* の再血清型別と性状解析

1. 小緒

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下、*A. pleuropneumoniae*) には現在、15 種の血清型が存在する。国により分離される血清型には特徴があり[45]、日本においては血清型 2 型が多く分離され、次いで 5 型や 1 型が分離される[1,12,15-17,24,38,40,46]。第Ⅰ章より、近年、血清型別不能株 (以下、UT 株) が多く分離される傾向があることが示された。日本の *A. pleuropneumoniae* ワクチンは特定の血清型に対応するものであり、全血清型を防御するワクチンは現在のところ認可されていない。したがって、適切なワクチンを選択するためには、胸膜肺炎発生農場から *A. pleuropneumoniae* を分離し、その血清型を明らかにすることが重要である。第Ⅰ章では寒天ゲル内沈降反応で血清型別を実施したが、本章では *A. pleuropneumoniae* の血清型別法として、従来実施されているスライド凝集反応と、近年開発されたマルチプレックス PCR により UT 株の再血清型別を行った。また、寒天ゲル内沈降反応で、血清型別ができなかった要因として加熱抽出温度が考えられ、その影響を調べた。さらに UT 株の PFGE を行い、寒天ゲル内沈降反応で血清型別可能株と不能株の PFGE 型を比較し、抗原性の違いと遺伝子型に関連があるかどうか調べた。

2. 材料と方法

(1) 供試株

2003 年から 2013 年に分離され、寒天ゲル内沈降反応による血清型別で型別不能であった 47 株を供試した。

(2) 再血清型別

血清型別は、47 株について血清型 1～15 型の抗血清を用いた Mittal らの方法[30]によるスライド凝集反応を実施した。また、マルチプレックス PCR は、47 株について血清型 1 型、2 型および 5 型について判定できる Ito の方法[20]により実施し、そのうち型別出来なかった 5 株について

血清型 1~3 型、5~8 型、10 型及び 12 型が判定できる Bosse らの方法[4]を実施した。Bosse らの方法で判定できなかった 2 株について Turni らの方法[42]により血清型 15 型について調査した。

(3) 加熱抽出条件による検討

再血清型別により血清型別が可能となった血清型 1 型（以下、UT-1 型とする。以下同様。）を 23 株、血清型 2 型（UT-2 型）を 13 株、血清型 15 型（UT-15 型）を 1 株供試した。第 I 章の寒天ゲル内沈降反応の抗原抽出条件を、60℃、2 時間加熱に変更し、抗血清 1、2 及び 15 型を使用し寒天ゲル内沈降反応を実施した。また、抗原抽出温度が血清型別に及ぼす影響を確認するために、UT-1 型株及び UT-2 型株を Mittal らの方法[30]により作成したスライド凝集反应用抗原、並びに第 I 章の寒天ゲル内沈降反応の抗原抽出法である 60℃2 時間加熱抽出抗原、100℃1 時間加熱抽出抗原、121℃1 時間加熱抽出抗原の 4 種類の抗原を用いてスライド凝集反応を実施した。

(4) PFGE

UT-2 型の 6 株、UT-15 型の 1 株、胸膜肺炎の豚から分離された血清型 2 型の 1 株、血清型 15 型の 2 株及び血清型 15 型のリファレンス株である HS143 株を供試した。PFGE およびプロファイル解析は第 III 章で用いた方法に準拠して実施した。

3. 結果

(1) スライド凝集反応とマルチプレックス PCR による再血清型別

スライド凝集反応とマルチプレックス PCR による再血清型別の結果を表 7 に示した。スライド凝集反応においては、供試した 47 株中 25 株が血清型 1 型に、19 株が血清型 2 型に、1 株が血清型 15 型に分類された。2 株は複数の抗血清に反応したので型別不能であった。Ito のマルチプレックス PCR においては、供試した 47 株中 24 株が血清型 1 型に、18 株が血清型 2 型に分類されたが、5 株は型別不能であった。Ito のマルチプレック

ス PCR で型別不能であった 5 株について実施した Bosse らのマルチプレックス PCR においては、1 株が血清型 1 型に、2 株が血清型 2 型に分類されたが 2 株は型別不能であった。Bosse らのマルチプレックス PCR で型別不能であった 2 株について実施した Turni らのマルチプレックス PCR においては、血清型 15 型に分類された。スライド凝集反応により血清型別が可能であった 45 株の血清型は、マルチプレックス PCR 法の血清型と一致した。

(2) 加熱温度の違いによる抗原抽出の影響

寒天ゲル内沈降反応に使用する抗原を 60℃2 時間で抽出作成し、寒天ゲル内沈降反応に供試した結果、すべての UT-1 型株は抗血清 1 型 (図 3) と UT-15 型株は抗血清 15 型において沈降線が確認された。一方、UT-2 型株は抗血清 2 型との間に沈降線は確認できなかった (図 3)。

抗原抽出温度を変更して寒天ゲル内沈降反応で血清型別が可能であった UT-1 型株と血清型別不能の UT-2 型株について、4 種類の抗原を用いてスライド凝集反応を実施した。UT-2 型株の 4 種類の抗原は、抗原抽出温度に拘らず抗血清 2 型といずれも強い凝集反応を示した (図 4)。一方、UT-1 型株においては、抗原抽出温度が 100℃と 121℃で処理した抗原は、抗血清 1 型とは弱い凝集反応を示した。

(3) パルスフィールド電気泳動 (PFGE) の解析

PFGE の結果を図 5 に示した。UT-2 型株の PFGE 型は 3 パターンに分類された。そのうち 4 株が血清型 2 型の 17-PLA-45 株と同様のパターンを示した。

UT-15 型の 15-PLA-22 は、血清型 15 型のリファレンス株である HS143 株及び日本で分離された血清型 15 型の株とも異なる PFGE 型を示した。

4. 考察

寒天ゲル内沈降反応で型別不能の株を、スライド凝集反応及びマルチプレックス PCR で再血清型別を実施した結果、血清型 1 型、2 型及び 5 型

に分類することが可能となった。近年、第 I 章の調査より、寒天ゲル内沈降反応による血清型別で UT 株が増加していたが、新たな血清型の出現ではなく、従来の寒天ゲル内沈降反応による血清型別では型別不能の株が増加していることが示唆された。また、スライド凝集反応の結果とマルチプレックス PCR の結果と同様であることが確認できた。

121℃1 時間の加熱抽出抗原を使用した寒天ゲル内沈降反応は、60℃2 時間の加熱抽出抗原を使用した場合より、高い特異性を示すことから[40]、抗原抽出温度による影響を検討した。UT-1 型株と UT-15 型株の 60℃2 時間の加熱抽出抗原を用いた寒天ゲル内沈降反応では、それぞれ抗血清 1 型と抗血清 15 型の間で沈降線が確認された。また、UT-1 型と UT-15 型は、抽出温度が 100℃及び 121℃の場合、スライド凝集反応において反応性が低くなった。*Haemophilus parasuis* において、強い加熱処理は易熱性抗原に影響を与えることが知られている[8]。*H. parasuis* と同様に、血清型 1 型と 15 型の血清型別抗原も加熱の影響を受けることが示唆された。UT-2 型株は抗原抽出温度を低くしても寒天ゲル内沈降反応で型別が出来なかった。一方、UT-2 型株のスライド凝集反応においては、抗原抽出温度に拘らず、強い凝集反応が認められた。寒天ゲル内沈降反応の抗原抽出は、加熱処置の後、遠心分離しその上清を使用する。UT-2 型株が寒天ゲル内沈降反応で血清型別が不能であった要因として、加熱抽出したにも拘らず、その上清に可溶性抗原が溶出していなかった可能性がある。したがって、血清型別の方法は、それぞれの血清型の特徴を考慮して型別方法を選択する必要があることが示唆された。

寒天ゲル内沈降反応とスライド凝集反応では血清特異抗原の発現や抗原性の違いを確認することが出来た。本研究において、血清型 1 型株と血清型 15 型株の中に 100℃1 時間の加熱処理において、血清特異抗原が変性する株の存在が示唆された。一方、血清型 2 型株の中に 121℃1 時間の加熱処理において、抗原抽出が困難な株があることが示唆された。これらの要因は、寒天ゲル内沈降反応の抗原作成する際に考慮しなければならない。加熱処理による抗原抽出の違いの要因の同定のために、さらなる遺伝子解析が必要と考えられた。

また、血清特異遺伝子に基づくマルチプレックス PCR の結果は、寒天ゲル内沈降反応とスライド凝集反応と一致していた。そのため、マルチプレックス PCR は血清型別を迅速、簡便で、正確に判定できる方法であることが示唆された。抗原性の違いに基づく血清型別法であるスライド凝集反応や寒天ゲル内沈降反応の実施には抗血清が必要であり、遺伝子配列に基づく血清型別法であるマルチプレックス PCR の実施にはプライマーやサーマルサイクラーが必要となる。血清型別にどの方法を使用するかは検査室における準備可能な物、検査目的を考慮して選択する必要があるだろう。

抗原性の違いと遺伝子型との関連性について PFGE を用いての検討により、UT-2 型株の PFGE 型は 3 パターンに分類された。UT-2 型株の 6 株中 4 株が、野外流行株の血清型 2 型の約 80% の PFGE 型と同様のパターンを示す 17-PLA-45 株と同一の PFGE 型であった(表 1, 図 1)。UT-2 型株の優勢な PFGE 型が血清型 2 型の野外流行株の優勢な PFGE 型と同一の PFGE 型を示したので、血清型 2 型と UT-2 型の抗原性の違いは PFGE 型に反映されないことが示唆され、抗原性の違いと遺伝子型の違いを検討するには、他の遺伝子型分析法の実施が必要であることが示された。UT-15 型株は野外流行株の PFGE 型と異なっていた。今研究においては、血清型 15 型株と UT-15 型株の供試株数が少なく、抗原性の違いと PFGE 型との関係については、供試株数を増やして明らかにされるべき課題として残されている。

5. 小括

寒天ゲル内沈降反応で血清型別が不能であった株について、スライド凝集反応とマルチプレックス PCR により再血清型別を実施した。再型別の結果、47 株中 25 株が血清型 1 型に、20 株が血清型 2 型に、2 株が血清型 15 型に分類された。寒天ゲル内沈降反応で型別不能であった要因として、再型別出来た血清型 1 型株と 15 型株は、抗原抽出温度を下降されることで沈降線が確認されたことから、抗原抽出温度の影響が示唆された。一方血清型 2 型株は、同様の処置をしても沈降線は認められなかった。寒天ゲ

ル内沈降反応で型別可能株と不能株の間で抗原性の違いや遺伝子型との関係を検討するために血清型 2 型と血清型 15 型を用いて PFGE を実施した。血清型 2 型の PFGE 型と UT-2 型の優勢な PFGE 型は同じであり、抗原性の違いが PFGE 型に反映しなかった。

総括

*A. pleuropneumoniae*の効果的な制御に必要とされる疫学情報を得るために、日本で分離された本菌の血清型、薬剤感受性、*tet* 遺伝子の検出、PFGE 解析、血清型別不能株（以下、UT 株）の再血清型別及び血清型別及び性状解析を実施した。

本論文では、第 I 章では 1999 年から 2000 年および 2002 年から 2005 年に分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型を調査し、1986 年から 1987 年に分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型を含めて、血清型の推移を調べた。その結果、調査年を通して、血清型 2 型の分離が多く、次いで 1 型、5 型が分離された。他に血清型 3 型、6 型、7 型株が散見され、2003 年および 2004 年においては、新しい血清型の 15 型株が分離された。また、1986 年から 1987 年分離株と比較して、1999 年から 2000 年および 2002 年から 2005 年分離株においては血清型 2 型株数は有意に減少し、血清型 5 型株数は有意に増加した。血清型 1 型株の分離株数は 1999 年から 2000 年分離株において、他の調査年と比較して有意に高かった。また、2002 年から 2005 年分離株は、1986 年から 1987 年分離株と比較して UT 株が有意に増加したことが明らかとなった。

第 II 章では 1999 年から 2000 年に分離された *A. pleuropneumoniae* について、21 薬剤に対する感受性を測定すると共に、1986 年から 1987 年分離株について、当時供試しなかった 15 薬剤を加え評価した。さらに 2002 年から 2005 年に分離された *A. pleuropneumoniae* についても薬剤感受性及びその推移を調べた。その結果、1999 年から 2000 年分離株は、1986 年から 1987 年分離株と比べて、ペニシリン系薬剤、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール系薬剤に対する耐性株の出現頻度が有意に ($p<0.01$ 、 χ^2 検定) 増加していることが認められた。また、1999 年から 2000 年分離株の血清型 1 型でフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株が観察され、また、血清型 2 型でマクロライド系薬剤に耐性を示す株が観察された。分離年に拘わらずセフトオフル、フロルフェニコールおよびフルオロキノロン系薬剤に高い感受性を示した。一方 2002 年から 2005 年分離株は 1999 年から 2000 年分離株のそれと比較してペニシリン系薬剤、OTC

および TP の耐性率が有意に減少していたことが明らかとなった ($p<0.01$)。耐性率の変化において、2002 年から 2005 年分離株はペニシリン系薬剤、OTC および TP に耐性傾向のある血清型 1 型株の分離率の減少が影響していると考えられた。このように、分離される血清型の変化により、*A. pleuropneumoniae* 全体の薬剤感受性が異なることが示唆された。そのため、*A. pleuropneumoniae* の薬剤感受性を調べる際には、血清型別も合わせて実施する必要性が明らかとなった。

第Ⅲ章においては、日本分離株の *A. pleuropneumoniae* において、OTC に対する耐性率が他の薬剤と比較して高かったことから、1986 年から 2005 年に分離された OTC 耐性株について *tet* 遺伝子の検出と PFGE による分子疫学調査を行った。検出された *tet* 遺伝子は、*tet(A)*、*tet(B)*、*tet(H)* および *tet(O)* であったが、*tet(B)* 遺伝子が最も多く、次いで *tet(H)* 遺伝子が多く検出された。分離株の多い血清型 2 型と 5 型について PFGE 解析を行ったところ、主要な PFGE 型は 2 型および 5 型でそれぞれ 20 年間変化は認められなかった。*tet* 遺伝子と PFGE 型との関係について、2 型および 5 型において *tet(B)* 遺伝子陽性株は、2B、5B、5C および 5D 型であり、*tet(B)* 遺伝子陰性株は、2A、2C~2F、5A および 5E 型に分類され、*tet(B)* 遺伝子陽性株と陰性株では、PFGE 型が異なることが判明した。1999 年から 2000 年分離株の OTC 耐性 2 型株は、*tet(B)* 遺伝子陽性株であり、PFGE 型は 2B 型であった。さらに CP 系に耐性を示す株が多く、1999 年から 2000 年は異なる PFGE 型および薬剤感受性の株が分布していたことが明らかになった。また、血清型 5 型株は、どの年代においても、OTC 単剤耐性が多く、保有している *tet* 遺伝子も *tet(B)* 遺伝子のみであったので、クローナルな株ではないかと考えられたが、PFGE により複数の PFGE 型の株が分布していることが判明した。

第Ⅳ章においては、近年増加している UT 株について、スライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により再血清型別を行った。これら UT 株は血清型 1 型、2 型及び 15 型に分類可能であった。寒天ゲル内沈降反応で血清型別不能の要因として、再型別可能であった血清型 1 型株と 15 型株は、抗原抽出過程における加熱処理が、血清型別抗原に影響していること

が示唆された。一方血清型 2 型株は、加熱処理の影響を受けないことが示唆された。寒天ゲル内沈降反応で型別可能株と不能株の抗原性の違いと遺伝子型との関連性について検討するために、血清型 2 型と血清型 15 型を用いて PFGE を実施した。血清型 2 型の PFGE 型と再血清型別により 2 型となった株の優勢な PFGE 型は同一であり、抗原性の違いが PFGE 型に反映されないことが明らかとなった。

以上、四章の成績より、日本で分離される *A. pleuropneumoniae* は依然として 2 型が優勢であることが明らかとなった。また、薬剤感受性については、OTC に対して耐性を示す株が多く、血清型により薬剤感受性に特徴が認められることが明らかとなった。*A. pleuropneumoniae* の *tet* 遺伝子は、分離年により変動はあるものの *tet(B)* 遺伝子が多く分離され、OTC 耐性の増加には *tet(B)* 遺伝子陽性株の増加が関与していることが示唆された。1986 年から 2005 年分離株血清型 2 型および 5 型株の PFGE 型により *tet(B)* 遺伝子陽性株と陰性株は PFGE 型が異なるため、*tet(B)* 遺伝子陽性株と *tet(B)* 遺伝子陰性株は遺伝子型が異なることが明らかとなった。また、血清型 2 型および 5 型株は約 20 年間に於いて優勢な PFGE 型には変化はなかったが、1999 年以降の株については優勢な PFGE 型とは異なる型を示す株の出現が確認された。さらに近年 UT 株の分離が増加しているが、スライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により血清型別が可能であった。血清型 1 型株及び 15 型株において加熱処理の影響を受ける血清型別抗原を持つ株の存在が示唆された。

A. pleuropneumoniae による豚の胸膜肺炎の予防として不活化ワクチンが市販されているが、当該ワクチンは血清型特異的であり、現在、血清型 1 型、2 型、5 型、7 型、9 型及び 10 型による胸膜肺炎の発症の予防のワクチンが市販されている。本研究により日本で伝播している血清型の多くは血清型 1 型、2 型及び 5 型であり、その他の血清型は散発的な分離であった。日本における *A. pleuropneumoniae* による豚の胸膜肺炎の効果的な予防のために、日本で分離される血清型に変化が認められるか継続的な調査が必要であることが示された。薬剤感受性の結果、胸膜肺炎の治療薬として承認されている FF、CTF 及びフルオロキノロン系薬剤に対して *A.*

A. pleuropneumoniae は、高い感受性を示した。しかしながら OTC に対しては、高い耐性率を示した。OTC は豚の肺炎や細菌性下痢症等の治療薬として承認されており、豚の感染症治療薬として使用されている。日本における *A. pleuropneumoniae* による豚の胸膜肺炎の効果的な治療のために、薬剤感受性に変化が現れるか調査を継続することが重要であると考えられた。遺伝子型の解析により、血清型 2 型および 5 型株は約 20 年間に於いて優勢な PFGE 型には変化はなかったが、1999 年以降の株については優勢な PFGE 型とは異なる型を示す株が出現していることが確認され、近年、においては、*A. pleuropneumoniae* の多様な遺伝子型の伝播が示唆された。さらに、血清型 2 型の分離年による薬剤感受性の違いは、異なる遺伝子型の伝播に起因するものと推察された。寒天ゲル内沈降反応で UT 株をスライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により再血清型別した結果、血清型 1 型、2 型及び 15 型に型別された。このことにより、従来の寒天ゲル内沈降反応では、型別出来ない株が存在することが判明した。

以上より、本研究により明らかとなった *A. pleuropneumoniae* の血清型、薬剤感受性及び遺伝子型の推移並びに抗原性の異なる株の存在の情報は、我が国の豚において、損耗が大きい呼吸器疾患の主要な位置を占める豚胸膜肺炎のワクチンによる防御や抗菌性物質による治療の一助になると考えられ、本研究は *A. pleuropneumoniae* 感染症の予防と治療に貢献しうるものと考えられる。

謝辞

本論文に供試した *A. pleuropneumoniae* 株を分与いただいた全国の家畜保健衛生所の関係各位に深謝いたします。

また、本論文の御校閲と有益なご助言を賜った酪農学園大学獣医学群菊池直哉教授および本論文の副査をしていただきました田村 豊教授および永幡 肇教授に深謝いたします。

さらに、本研究の遂行およびまとめに当たり多大な御指導およびご助言を頂きました農林水産省動物医薬品検査所の鈴木祥子総括上席研究官、故高橋敏雄博士、現岐阜大学浅井鉄夫教授および関係者に深謝いたします。

引用文献

1. Asawa, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N. and Morozumi, T. 1995. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from piglets with pleuropneumoniae. *Vet. Med. Sci.* 57: 757-759.
2. Blackall, P. J., Klaasen, H. L. B. M., Van Den Bosch, H., Kuhnert, P. and Frey, J. 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet. Microbiol.* 84: 47-52.
3. Blanco, M., Gutiérrez-Martin, C. B., Rodríguez-Ferri, E. F., Roberts, M. C. and Navas J. 2006. Distribution of tetracycline resistance genes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 702-708.
4. Bossé, J. T., Li, Y., Angen, Ø., Weinert, L. A., Chaudhuri, R. R., Holden, M. T., Williamson, S. M., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N., Langford, P. R. and BRaDP1T consortium. 2014. Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 2380–2385.
5. Bousquet, E., Morvan, H., Aitken, I. and Morgan, J. H. 1997. Comparative in vitro activity of doxycycline and oxytetracycline against porcine respiratory pathogens. *Vet. Rec.* 141: 37-40
6. Chatellier, S., Harel, J., Dugourd, D., Chevallier, B., Kobisch, M. and Gottschalk, M. 1999. Genomic relatedness among *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates of serotypes 1 and 5 isolated from

- healthy and diseased pigs. *Can. J. Vet. Res.* 63: 170–176.
7. Christensen, G. and Mousing, J. Respiratory system. In: Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W. L., D'Allaire, S. and Taylor, D. J. (eds): 1994. *Diseases in Swine*, 7th edn (Iowa State University Press, Ames, IA), 138-162.
 8. Del Río, M. L., Gutiérrez, C. B. and Rodríguez Ferri, E. F. 2003. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 880–882.
 9. Esaki, H., Morioka, A., Ishihara, K., Kojima, A., Shiroki, S., Tamura, Y. and Takahashi, T. 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 266-70.
 10. Fluit, A. C., Visser, M. R. and Schmitz, F. J. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 836-871.
 11. Frey, J., Beck, M., van den Bosch, J. F., Segers, R. P. and Nicolet, J. 1995. Development of an efficient PCR method for toxin typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Mol. Cell. Probes.* 9: 277-282.
 12. 福安嗣昭, Sakpuaram T, 斎藤慶子, 芦田浄美. 1991. 豚肺炎由来 *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* の血清型と薬剤感受性. 日獣会誌. 44: 11-16.

13. Fussing, V. 1998. Genomic relationships of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 isolates evaluated by ribotyping, sequence analysis of ribosomal intergenic regions, and pulsed-field gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 211–215.
14. Fussing, V., Barfod, K., Nielsen R., Møller, K., Nielsen, J. P., Wegener, H. C. and Bisgaard, M. 1998. Evaluation and application of ribotyping for epidemiological studies of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Denmark. *Vet. Microbiol.* 62: 145–162.
15. 市川隆、中西俊明、小林弘志、伊木健治.1994. 豚肺炎病巣由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* の血清型と薬剤感受性. 日獣会誌. 47: 353-356.
16. Inamoto, T., Kikuchi, K., Iijima, H., Kawashima, Y., Nakai, Y. and Ogimoto, K. 1995. Antibacterial activity of tilmicosin against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lesions in swine. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 917-921.
17. Inoue A, Yamamoto K, Hirano N, Murakami T. 1984. Drug susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46: 175-180.
18. Ishihara, K., Kira, T., Ogikubo, K., Morioka, A., Kojima, A., Kijima-Tanaka, M., Takahashi, T. and Tamura, Y. 2004. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999-2001): results from the

Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program.
Int. J. Antimicrob. Agents. 24: 261-267.

19. Ishii, H., Nakasone, Y., Shigehara, S., Honma, K., Araki, Y., Iyobe, S. and Hashimoto, H. 1990. Drug-susceptibility and isolation of a plasmid in *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52: 1-9.
20. Ito, H. 2010. Development of a cps-based multiplex PCR for typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 653-655.
21. Katsuda, K., Kohmoto, M. and Mikami, O. 2013. Relationship between serotype and the antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates collected between 1991 and 2010. *Res. Vet. Sci.* 94:205-208.
22. Kawahara, K., Asano, M., Nakai, T., Kume, K. and Danbara, H. 1989. Antibiotic susceptibility of serotype 2 and 5 strains of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from swine from 1974 to 1986. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51: 359-363.
23. Kijima-Tanaka, M., Ishihara, K., Morioka, A., Kojima, A., Ohzono, T., Ogikubo, K., Takahashi, T. and Tamura, Y. 2003. A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 447-451.
24. Kim, B., Min, K. Choi, C., Cho, W. S., Cheon, D. S. Kwon, D., Kim, J. and Chae, C. 2001. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* isolated from pigs in Korea using new standardized procedures. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 341-342.
25. Kokotovic, B. and Angen, Ø. 2007. Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3921–3929.
26. Koyama, T., To, H. and Nagai, S. 2007. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15-like strain from a field case of porcine pleuropneumonia in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 961-964.
27. Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., Rood, J. I. and Taylor, D. E.. 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1523-1524.
28. Livermore, D. M. 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 557-584.
29. Mittal, K. R., Higgins, R., Larivière, S. and Nadeau, M. 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* 32: 135-148
30. Mittal, K. R., Higgins, R. and Lariviere, S. 1982. Evaluation of slide agglutination and ring precipitation tests for capsular serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 15: 1019–1023.
31. Morioka, A., Asai, T., Ishihara, K., Kojima, A., Tamura, Y. and Takahashi, T. 2005. In vitro activity of 24 antimicrobial agents

- against *Staphylococcus* and *Streptococcus* isolated from diseased animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 207-210.
32. Møller, K., Nielsen, R., Andersen, L. V. and Kilian, M. 1992. Clonal analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* population in a geographically restricted area by multilocus enzyme electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30: 623-627.
33. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; *A. pleuropneumoniae* revised Standard –Second Edition (M31-A2).
34. Nielsen, R., Andresen, L. O., Plambeck, T., Nielsen, J. P., Krarup, L. T. and Jorsal, S. E. 1997. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet. Microbiol.* 54: 35-46.
35. 農林水産省動物医薬品検査所. 平成 25 年度動物医薬品の事故防止・被害対応業務における病性鑑定由来細菌の性状調査成績概要. 26 January 2016. Available from: http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/yagai/pdf/h25yagai1_20150817.pdf
36. Schaller, A., Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Forbes, W. A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Gottschalk, M., Nicolet, J. and Frey, J. 2001. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. *Vet. Microbiol.* 79: 47-62.
37. Sebunya, T. N. K. and Saunders, J. R. 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: A review. *J. Am. Vet. Med.*

Assoc. 182: 1331-1337.

38. Shimizu, M., Kuninori, K., Sakano, T. and Terashima, T. 1982. Antibiotic susceptibility of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* isolates from swine. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44: 359-363.
39. Suzuki, S., Ohmae, K., Ohishi, K., Muramatsu, M. and Takahashi, T. 1989. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolated from pigs with pleuropneumonia. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51: 450-452.
40. Suzuki, S., Takahashi, T., Muramatsu, M., Ohishi, K., Nakajima, M. and Yamashita, M. 1988. Serotype of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* isolates from pigs in slaughter-house. *Jpn. J. Vet. Sci.* 50: 1264-1267.
41. 田村豊 2003. 動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策. 日獣会誌. 56: 685-691.
42. Turni, C., Singh, R., Schembri, M. A. and Blackall, P. J. 2014. Evaluation of a multiplex PCR to identify and serotype *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1, 5, 7, 12 and 15. *Lett. Appl. Microbiol.* 59: 362–369.
43. Ueda, Y., Ohtsuki, S. and Narukawa, N. 1995. Efficacy of florfenicol on experimental *Actinobacillus pleuropneumonia* in pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 261-265.
44. Wasteson, Y., Roe, D. E., Falk, K. and Roberts, M. C. 1996.

Characterization of tetracycline and erythromycin resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 48: 41-50.

45. 山本孝史:豚病学,柏崎守他編,第4版,362-367,近代出版,東京(1999)
46. Yoshimura, H., Takagi, M., Ishimura, M. and Endoh, Y. S. 2002.
Comparative in vitro activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res. Commun.* 26: 11-19.