

連載 Mhyo 概論

第 10 話 「診断」と「モニタリング」について

(株)エコアニマルヘルスジャパン
石垣 克至

1. はじめに

農場の Mhyo 感染をどうやって「診断」評価するのか、どの指標を用いて農場状況を「モニタリング」して清浄化を推し進めていくのか勉強していきます。

これまで Mhyo の病原性、疫学、免疫応答でお話ししたとおり、以下の点からその診断は簡単ではありません。

- ・ Mhyo に特異的な症状、病変が必ずしもない。
- ・ ワクチン抗体と感染が識別できない。
- ・ 抗体陽転が遅い。
- ・ 菌分離培養が容易ではない。
- ・ 気管 / 肺サンプル採材が難しい。

結論としては、いくつかの組み合わせをすること

や、目的によって手法を選択することが必要になります。「病性鑑定マニュアル」でも豚マイコプラズマ病の最終判定は、「疫学状況、細菌培養試験、PCR、病理組織検査の結果を併せて総合的に判断する。」と記載されています（以下、病勢鑑定マニュアルは太字で記載します）。

なお、豚マイコプラズマ病には、Mhyo 以外のマイコプラズマも含まれません。

2. 診断

1) 疫学調査

- ①密飼、換気不良（特に夏期のアンモニア濃度の上昇）の養豚場で群単位に発生
- ②季節に関係なく発生し、慢性経過をとる。死亡率は低い。

表1 病性鑑定マニュアル「100豚、マイコプラズマ病」より

担当	検査チャート
家畜保健衛生所	
病性鑑定施設	<p>(4) PCR</p> <p>(5) 細菌培養試験</p> <p><分離培養></p> <p>(+) (-)</p> <p>(6) 病理組織検査</p> <p>(7) 免疫組織化学検査</p> <p>(+) (-)</p>
判定・結果	<p>(+)</p> <p>(-)</p> <p>(+)</p> <p>(-)</p>
最終判定	疫学状況、細菌培養試験、PCR、病理組織検査の結果を併せて総合的に判断する。
その他	<p>1. 分離マイコプラズマの血清型別が必要な場合は、動物衛生研究所等の専門機関に依頼する。</p> <p>2. 材料送付方法：分離菌を送付する場合は、以下のいずれかの方法で行う。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・十分に発育した液体培養菌を保冷剤と共に冷凍で送付 ・1.8 mlの液体培地に0.2 ml 接種し、培養しないでそのまま室温で送付 ・寒天培地でコロニーを十分に発育させたものを4℃で送付

③増体率、飼料効率の悪化、発育遅延をみる。

残念ながら、以上の3点はMhyoだけに特異的な症状ではなく、他の感染症または環境因子等でも認められます。

最初の兆候は、さまざまな重症度の断続的で生産性に影響を及ぼす発咳が認められます。またADGをはじめ、生産指数が悪化します。

さらに、感染しても無症状の豚は、診断できません。したがってMhyoとの関連は、臨床症状や剖検、病原体の検出あるいは抗体検出による検査室での確認が必要となります。

2) 臨床検査

①早発性関節炎 (PA) および多発性漿膜炎 (PS) : *M. hyorhinis* によって起こる。PAは生後1週齢前後、PSは1~2カ月齢前後にみられる。死亡率は低い。通常3カ月齢以降ではみられない。

②マイコプラズマ肺炎 : Mhyoによって起こる。臨床所見に乏しいが3カ月齢頃から乾性の発咳をみることもある。大半はと畜検査で発見される。死亡率は低い(1%程度)。離乳直後の若齢豚では *M. hyorhinis* による肺炎もみられる。

③マイコプラズマ関節炎 : *M. hyosynoviae* によって起こる。3カ月齢以上の豚にみられる。

豚マイコプラズマ病 (MPS) は、軽度の発咳を特徴とし、ADGおよびその他の生産的パラメータへの影響は最小限です。これはMhyoの実験的接種の結果で確認されています。陰性豚が高用量 ($10^7 \sim 10^8$ CCU/豚) のMhyoの単独感染させた試験条件下では、感染後1~2週間で軽度の乾性発咳が出現し、咳は数週間続き、感染後4~5週間で最大に達

すると報告されています。ただし、他の病原体の関与が非常に頻繁であるため、実際の農場現場ではMhyoによる唯一の感染は、減多に観察されません。

以下の類似疾病が「病勢鑑定マニュアル」に記載されています。

ヘモフィルス・パラシス感染症(グレースー病)、豚胸膜肺、豚パストツレラ症、豚インフルエンザ、豚肺虫症、豚パラインフルエンザ、PRRS、オーエスキー病、豚レンサ球菌症、豚丹毒

野外条件下では、Mhyoによる感染から臨床徴候の出現までの経過時間は、多くの要因によって異なります。これらには、環境条件、Mhyoおよび他の病原体株の毒性、動物の免疫状態および感染圧が含まれます。このような変動性は、フィールドレベルで、Mhyo感染に関してさまざまな臨床農場シナリオが見られることを意味します。臨床徴候からだけで簡単に診断ができないということです。

3) 剖検

①肺の前葉、中葉前縁部にみられる左右対称性の肝変化、肺近傍リンパ節の腫脹、充血 (マイコプラズマ肺炎)

②多発性漿膜炎では腹・胸腔臓器の漿膜の肥厚、漿液と線維素の析出

③関節炎は透明で粘性の強い関節液が関節腔に貯留

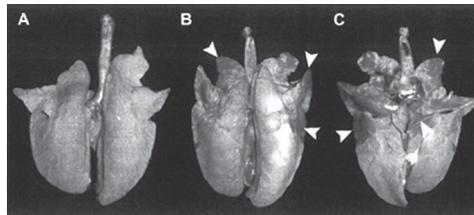


図1 頭腹側肺硬変 (CVPC) 病変写真 (A) 正常な肺、(B) Mhyoによって引き起こされたCVPC病変(白い矢印)を示す肺の背側および(C) 腹側(出典: CReSA-IRTA)

Mhyoと関連性のある病変は、呼

吸器に限定され、頭腹側肺硬変 (CVPC: Cranio-ventral Pulmonary Consolidation) で構成されます (図1)。『肝変化』という表現で Mhyo 肺炎の特徴的な病変です。炎症細胞浸潤をおこした部位が正常含気肺に比べて、触診上 “consolidation” (= 硬化: 肺炎で気腔が滲出物で満たされ、硬度を増すことを意味する) と表現されています。この無気肺状の病変が前葉及び中葉に形成されることが多く、初期の病変は、右中葉及び前葉によく認められ、多くの例で左右対称に病変が形成されます。通常、細菌の最初の侵入口である右頂端葉で発生し、換気率が後葉に比べて低く、吸入された病原体が沈着しやすいためのようです。感染初期では、肺は赤からピンクの硬化領域 (肝変化) の膨潤した一貫性を示します。健康肺との境界は明瞭であり、色調は暗赤色から灰白色などさまざまです。断面は肉様、弾力性を示し、気管支内にはカタル性滲出液の貯留が認められます。しかし肺病変は時間経過で変化するため、肉眼的病変の形跡がなくなり、



図2 肺の浮力低下
(出典: J. Carr)

4~5週間以内に治癒するはずですが。ただし、慢性期では、硬化した領域は紫色から灰色に見え、さらに癒痕化と組織収縮に

進展します。Mhyo 単独感染の場合には、病変は肺に局限し、他の臓器に認められません。正常な通気エリアは水に浮き、癒痕化および組織収縮した肺領域は、水に沈みます (図2)。ただし、完全には影響を与えていない初期の場合、肺は依然として水に浮かんでいる可能性があります。

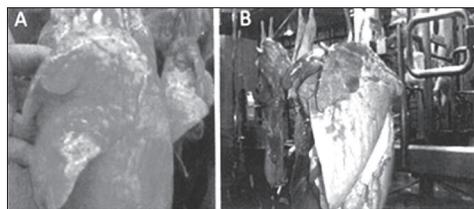


図3 肉処理場における肺検査写真
(出典: J. Carr)

図3のとおり、屠殺豚または剖検を受けた豚 (肺硬変のない肺 (A) およびある肺 (B)) を、獣医師が視覚的に検査し、Mhyo の肉眼的病変の存在を評価することが大切です。

臨床診断のサポートとして、さまざまな肺病変スコアシステムが開発されています。肉眼的病変の面積および重症度をスコア化して、肺病変を評価します。ほとんどすべての方法は、肉眼所見と触診に基づいて、CVPC の影響を受ける肺組織の面積を推定します。

注意すべきことは、線維性胸膜炎などが付随する病変は、CVPC の観察とスコアリングを不明瞭にする可能性がある点です。

食肉処理場の流れ作業では、わずか1頭20秒ほどで、記録を取るのが難しいのが現実です。したがって、音声起動の録音デバイスを使用して、両手で肺操作をしながら、所見の録音ができるようにしている現場もあるそうです。写真画像処理は理想的かもしれませんが、後処理に時間がかかり、また食肉処理場にカメラを持ち込むことを拒否する場合があります。また、肺が枝肉と分離され、観察者が検査している肺を豚个体番号との紐付けを特定することが重要です。

と場からの MPS (マイコプラズマ性肺炎) の数字は貴重な結果です。10%を一つの指標として、問題意識を持ちましょう。

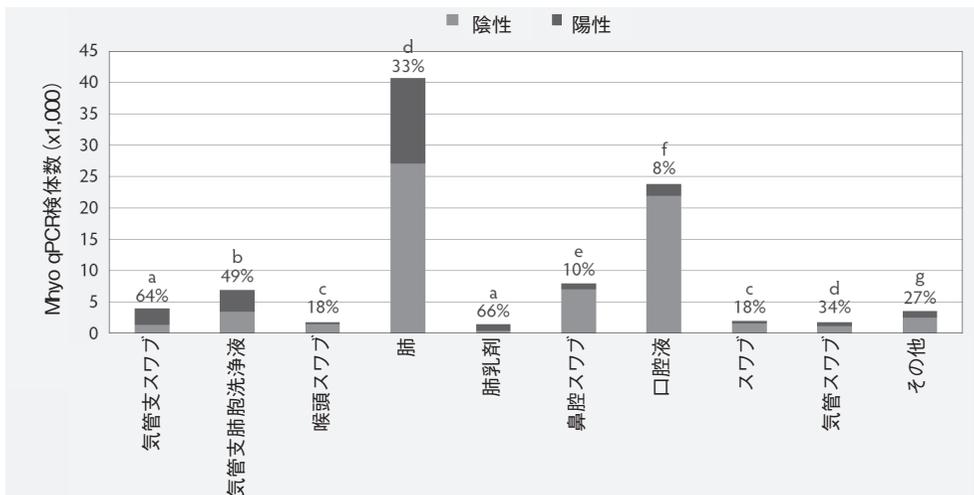


図4 検体材料別の qPCR 検出結果 (Rawal ら、2018)
https://lib.dr.iastate.edu/vdpam_pubs/156/

4) PCR

豚マイコプラズマ病を起こす3種のマイコプラズマ (*M. hyopneumoniae*)、*M. hyorhinis* および *M. hyosynoviae*) をそれぞれ特異的に検出する PCR が開発されている。

・サンプルの選択

Mhyo は、気管、気管支および細気管支の線毛上皮細胞に付着し増殖します。結果として、その DNA の検出は、気道に沿って収集されたさまざまな検体サンプルで実施できます。Mhyo 感染を評価するためにより頻繁に使用されるサンプルは、気道スワブ (鼻、扁桃、喉頭、気管あるいは気管支)、口腔咽頭ブラッシング、気管気管支粘液 (TBM)、洗浄液 (気管気管支または気管支肺胞)、肺 (ホモジネート) および口腔液 (ロープ法) などです。

図4は、2004年から2016年までアイオワ州立大学に寄せられた診断依頼サンプルの集計です。何らかの問題がある病豚のサンプルなので、必ずしも Mhyo だけを疑ったものではないのですが、呼吸器症状がある豚からの検体です。縦軸

は検体数で、棒グラフの上の数値は陽性の割合%、異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.05$) ありを示します。

解剖した病豚からの肺材料が多く、またその陽性率も比較的高いと思われます。肺乳剤で陽性率が高いのは、病変部を明確に採材できていることに由来しているからかもしれません。口腔液はロープ法で取得しやすく、検体数が多いものの、陽性率は低く、各種気道スワブではその陽性率に大きな差が認められます。表2のとおり、同じ動物から収集されたものでも、サンプルの採材場所によって Mhyo 検出の能力は異なります。最も陽性の高いサンプルは、気管気管支スワブ (TBS) の PCR で、深部気管カテーテルを操作する技術が必要です。

図5のとおり TBS のサンプリングに

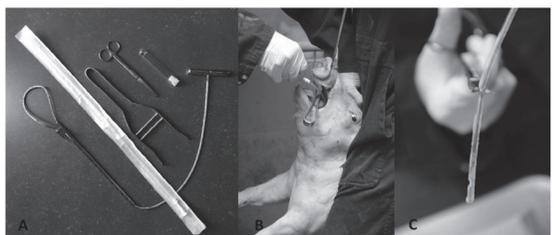


図5 TBS (A: 資材、B: 固定、C: カテーテル採材)
<https://biblio.ugent.be/publication/85726> (Vangroenweghe、2020)

表2 実場面におけるサンプル検体の Mhyo 検出能力の比較

サンプル由来	肥育仕上げ期	早期感染時	急性感染時	感染後日数 と陽性率	サンプル中 推定 DNA 量
鼻腔スワブ PCR	—	±	±	5 日 (14%)	+
気管支肺胞洗浄液 PCR	+	++	++	5 日 (19%)	++
気管気管支スワブ PCR	++	+++	+++	5 日 (80%)	+++
口腔液 PCR	+	—	—	9-26 日 (67%)	+
血清 ELISA	++	—	—	21 日 (12%)	NA
肺病変スコア	++	—	—	NA	NA

NA：該当データなし (Pieters ら、2017)

<https://biblio.ugent.be/publication/8572696>

は、種々の資材（鼻ローブ、サンプルカテーテル、マウスオープナー、ハサミ、10mL 輸液チューブ / 1mL 滅菌生理食塩水）が必要です。また子豚の固定とサンプリングの手技を体得して、豚に負担をかけないようにする必要があります。粘液が入ったサンプルカテーテルをカットして、そのまま輸送チューブへ入れ、検査に回します。

一方の鼻腔スワブは簡便で当初、Mhyo 感染を監視するための適切なサンプルとして提案されてきました。非侵襲的な利点を提供しますが、検出感度と一貫性は、それぞれ低く、制限されています。あくまでも傾向を探る目的でローブ法を活用したり、ELISA 抗体値と組み合わせたりする工夫が必要です。

さらに、屠場処理液でも検出されています。Mhyo 感染の診断またはモニタリングのためのこれらのタイプのサンプルの有用性はまだ研究中であり、検証が必要です。

最初の Mhyo PCR アッセイは、90 年代初頭に設定され、数年後、2 回の増幅に基づくネステッド PCR (nPCR) の開発で、感度と特異度が大幅に向上しました。さらに改善されたリアルタイム / 定量 PCR (rt-PCR / qPCR) 法が開発されました。特異度は非常に高いと考えられており、ほとんどの報告された方法では約 100% です。しかし、感度はサンプルの採材場所によって異なり、目の前に

あるはずの Mhyo が必ずしも採材によって拾えないことを十分認識して結果を考察しなければなりません。

5) 細菌培養試験 (分離培養)

① *M. hyopneumoniae* : 肺病変部乳剤を BHL 液体培地を用いて分離培養する。37°C で 14 日間まで培養し、色調変化を生じた場合、さらに BHL 液体培地に数代継代培養を行い BHL 寒天培地に接種する。色調変化がない場合も 2 ~ 3 代は盲継代すること。

② *M. hyorhinitis* および *M. hyosynoviae* : 肺乳剤、腹水、関節液材料について 5% ムチン添加 PPLO 寒天培地に接種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 5 日間まで培養する。

・分離と培養

細菌分離は、肺組織における Mhyo の存在を実証できる「ゴールドスタンダード」技術と伝統的に考えられていました。しかし、この分離培養には、特別の栄養条件と必要な最適培養条件が必要なので難しく、また時間がかかります。サンプルに Mhyo が存在したとしても、必ずしも分離培養できないということです。よって、菌分離【陰性結果】が必ずしも決定的ではないことを意味します。

さらに、*M. hyorhinitis* は、その菌分離は Mhyo ほど難しいものではなく、増殖スピードが速く、豚気道の一般常在菌

であるため、*M. hyorhinitis* の混入は頻繁に発生します。したがって、Mhyo との鑑別が必要で、コロニーだけで「確定診断」として実行されることはありません。Mhyo の分離に最適なサンプルは、疾患の急性期にある動物の肺組織または気管支スワブや気管支肺胞洗浄液です。慢性病変に存在する Mhyo の細菌量は少ないと考えられています。分離は、できれば、健康な正常組織と感染を受けた病変組織の中間、移行領域からサンプリングを試みる必要があります。

表 3 Mhyo の ELISA 3 キットの感度と特異性

ELISA	感度	特異度	AUC
BioCheck	47.33	99.24	0.805 ^a
	(40.0, 54.7)	(95.8, 99.8)	(0.77, 0.84)
IDEXX	55.69	98.82	0.829 ^a
	(48.9, 62.2)	(95.7, 99.7)	(0.79, 0.86)
Hipra	61.65	98.83	0.845 ^a
	(53.8, 68.4)	(95.7, 99.7)	(0.81, 0.87)

AUC (Area Under Curve) : 時間曲線下面積 (Silva ら、2020)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32967897/>

・抗体の検出

表 3 のとおり、現在の ELISA キットは *M. hyorhinitis* による疑陽性はなく、特異度は極めて高いものです。しかし、感度はさほど高いものではありません。目の前のサンプル中に Mhyo 抗体が存在しているはずなのに、陽性判定にならない点には気を付けなければいけません。つまり、ELISA【陰性結果】だからといって、Mhyo 感染を否定できないと言う事です。

ELISA テストによる抗体検出法は、豚群を監視モニタリングするための最も一般的で手頃な方法ですが、自然曝露とワクチン接種抗体反応を区別することはできません。PCR 検査法では、抗体陽転や臨床症状の出現前でも、感染した動物から生菌または死菌の DNA を検出で

きます。したがって、呼吸器症状の発生における Mhyo の影響は、鑑別診断可能な複数のテストアプローチを活用することが大切です。

Mhyo は通常、世界中の豚生産システムに遍在する細菌と見なされており、その結果、診断と疾病発生データの解釈は、多数の要因によって混乱する可能性があります。抗体反応に関しては、豚群ワクチン接種の影響を受け、野外感染との判別が不可能な点があります。それにもかかわらず、抗体検査は簡便なので、病原体の蔓延と有病率の調査に、他の DNA 診断 PCR ツールと組み合わせて利用する価値があります。

野外条件下では、豚群集団の中で各個体が異なる“タイミング”に感染する可能性があるため、Mhyo に対する抗体陽転は同時ではなく、変動します。さらに、感染性動物への物理的接触は、曝露時間、受動免疫、そしておそらく伝染性または菌株の毒性の影響を受け、これは、血清陽性となる割合および抗体陽転までの時間の変動を増大させる可能性があります。実験条件下では、Mhyo は曝露後 240 日 (8 カ月) までの豚で検出されています。

通常、市販の ELISA キットは、感染後 21 日で最初に検出される抗 Mhyo 免疫グロブリン分子である最も一般的なアイソタイプ (IgG) を検出します。実験条件下感染後 9 日で検出されます。急速な低下を示す IgM や 粘膜免疫活性化を示すがサンプルでばらつきの大きい IgA よりも、血清で測定される IgG の方が汎用性も高く、一般的です。

6) 病理組織検査

①気管支粘膜上皮、ときに肺胞上皮細胞の過形成、気道腔内の漿液と炎症細胞の

貯留

- ②気管支周囲および血管周囲組織のリンパ球浸潤とリンパ濾胞の過形成
- ③慢性例では気管支周囲リンパ球浸潤は顕著となりリンパ結節を含む。
- ④混合感染により気道内の化膿性炎症は顕著となる。
- ⑤ *M. hyorhinis* によっても肺炎は起こるが軽度

7) 免疫組織化学検査

M. hyopneumoniae および *M. hyorhinis* について、免疫組織化学検査が利用でき、病変部にマイコプラズマ抗原を検出する。

組織中の *Mhyo* の一般的検出方法は、免疫蛍光アッセイ (IFA)、免疫組織化学 (IHC) および *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) です。しかし、研究機関でしか実施できない高度な検査です。

注目すべきことに、気道のコロニー形成は肺のすべての部位にわたって均一ではないため、これらの検出方法では、確実に感染した部位の肺組織のサンプリングが必須です。したがって、高感度の検出方法を使用しても、適切なサンプリングでなければ、陰性である可能性があります。

また、組織内の *Mhyo* を検出できる完璧な方法はないことに注意すべきです。

3 モニタリング

農場の状況を判断するモニタリングもその目的により、どのパラメータを活用するか見極めることが大切です。

表 4 は *Mhyo* の感染状況を四つのパラメータで農場分類したものです。豚群レベルでの *Mhyo* の診断は混乱を招く可能性があるため、*Mhyo* の臨床病理学的パラメータ、PCR 結果および抗体陽転状態に応じた農場分類が提案されています。したがって、農場は陰性、暫定陰性、陽性に分類できます。さらに陽性農場は無症候性感染 I、無症候性感染 II、および有症感染に細分することができます。表 4 の分類は、農場の対策を決定する材料になります。

Mhyo 感染重症度について判断するためには、剖検による肺病変の臨床病理学的考察の価値は高いものです。ただし、原因の病原体を確定するには、細菌 (病原体) 検出、あるいは抗体陽転の証拠と組み合わせる必要があります。

豚群の *Mhyo* 陰性のステータス確認は簡単ではありません。定期的な検査が必要です。四つのパラメータによる感染結果が感染圧力、曝露までの時間、重複感染、そしておそらく感染する *Mhyo* 株の数と毒性などの多くの要因を考察するデータになります。

多くの影響因子の結果として、*Mhyo* の感染経過は、無症状から風土病的な流行まで、すなわち軽度の呼吸器症状から、感受性のある陰性豚群での流行での重度呼吸器症状まで様々です。診断のアプローチは、求める目的 (呼吸器症状または病変での *Mhyo* の関与、清浄化プログ

表 4 *Mhyo* の診断結果による農場分類

分類	臨床症状	肺病変	ELISA 結果	PCR 結果
陰性	—	—	陰性	陰性
暫定陰性	—	—	陽性	陰性
陽性	無症状感染 I	—	陽性 / 陰性	陽性
	無症状感染 II	—	陽性 / 陰性	陽性
	有症感染	+	+	陽性 / 陰性

(Garza-Moreno ら、2018)

ラムにおける潜在している感染豚の検出、あるいは更新豚群の陰性証明)に応じて決定する必要があります。

・適切なサンプルサイズ

個々の豚はさまざまな感染段階ですので、それぞれの豚の感染タイミングと免疫(抗体)状態は、個体別で異なるので、豚群診断はその異なる個体の結果の集合体です。数頭での検査は、せいぜい全体像のスナップショットを提供するだけになります。

目標が清浄化または監視プログラムである場合、サンプルサイズの計算は、選択した検査技術(感度と特異性)、母集団における予想される感染率、および望ましい信頼水準に基づいて行う必要があります。必要な信頼度で適切なサンプルサイズを計算するには、統計表を参照する必要があります。

表5のように想定される母集団の感染率をみてわかるとおり、感染初期のまだ感染率が低い場合には、多くのサンプルがないと拾えない数値ということがわかります。20%を超える感染であれば、母集団に拘わらず13検体であれば、陽性を引っ掛けられます。

サンプルをまとめた「プール法」の活用も経費削減に必要です。COVID-19でも諸外国のPCR検査数が多いのもこの活用で4検体までプールできます。陰性か陽性かをまず確認でき、陽性の場合にはさらなる検査でより丁寧な考察をします。

しかし、20%感染していれば、その症状を見逃すことはないでしょう。PCRで拾えなくとも、ELISA抗体の陽転、また希釈率から定量的に強い陽性から判ると思います。組み合わせた評価が大切になります。

表5 疾病検出に必要なサンプル数

動物数	想定される群中の疾病の割合(%)		
	5%	10%	20%
	サンプル数(信頼度 95%)		
100	44	25	13
200	50	26	13
300	53	27	13
750	57	28	13
3,000	58	29	13

Guidelines for taking diagnostic samples from pigs
Dr. Heiko Nathues, Royal Veterinary College, UK
<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/brochures/swine-sample-collection-tissue-brochure.pdf>

経時的な採材によるモニタリングも清浄化プロジェクトに大切なポイントです。ヒトの健康診断のように定期的な検査が安定した生産成績につながります。

4 補足

韓国のデータですが、興味深いので紹介します。図6はグループ間のMhyoの有病率の比較をしたものです。

a: 豚群の規模では、母豚550頭以下

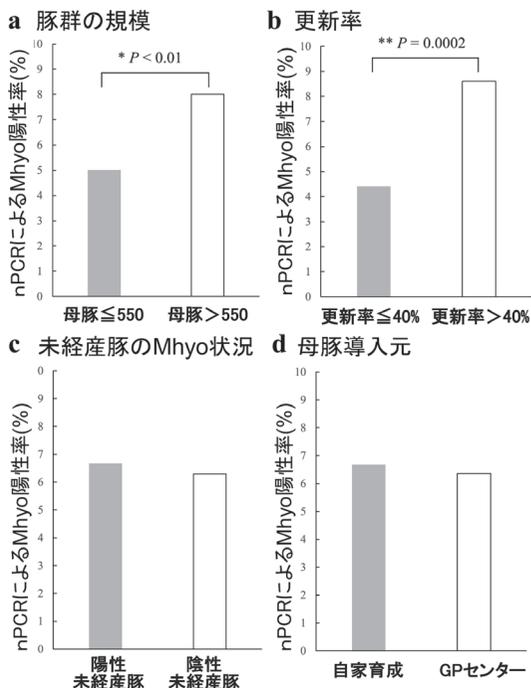


図6 グループ間のMhyoの有病率の比較 (Ohら、2020)

の方が陽性率は低く、大規模農場の方が Mhyo を持ち込む要因が多いと考えられます。b: 未経産豚の更新率が 40% 以下の方が陽性率は低い理由は、更新豚導入に伴う Mhyo 持ち込みのリスクが高いのかもしれませんが。c: 未経産豚の Mhyo 感染状態が陽性でも陰性でも、また d: 母豚の導入元が自家育成繰上げでも、GP センター由来（陰性豚）でも差がないのは意外でした。農場の状況は各論で論じなければいけないと思います。

5 終わりに

Mhyo 感染症は、世界中の国内の豚集団に蔓延しています。結果として、Mhyo 感染、抗体陽転の確認は、必ずしも臨床徴候あるいは肺病変の存在を意味するものではありません。同様に、肺に非生産的な発咳あるいは CVPC 病変を

示す動物の存在は必ずしも、Mhyo 感染と断定できません。

結論として、豚群レベルでの Mhyo 診断は、その固有の特性、病気の結果に影響を与える因子あるいは診断技術の制限のために、適格な診断方法を活用する必要があります。また、モニタリングも複数の診断方法を組み合わせ、定期的なサンプリングが必要です。残念ながら、これが“スタンダード”という完成されたマニュアルがありません。具体的な診断およびモニタリングは、信頼のおける獣医師とご相談の上で取り進めてください。

皆様のご参考になれば幸いです。