

肥育豚における *Mycoplasma hyorhinis* の関与が 疑われる疣贅性心内膜炎の 2 症例

秦 温子^{1)†} 箕輪 泰¹⁾ 小林秀樹²⁾ 芝原友幸^{2),3)}

- 1) 長崎県川棚食肉衛生検査所 (〒 859-3605 東彼杵郡川棚町百津郷 39-64)
 2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)
 3) 大阪府立大学生命環境科学研究科 (〒 598-8531 泉佐野市りんくう往来北 1-58)

(2019 年 1 月 23 日受付・2019 年 7 月 2 日受理)

要 約

長崎県内のと畜場で 2018 年 5 月及び 8 月にと畜解体された、異なる農場に由来する肥育豚 2 頭の大動脈弁に疣贅性心内膜炎が認められた。2 症例はそれぞれ、5%羊血液加寒天培地での疣状物からの菌分離は陰性で、疣状物から抽出した DNA を用いた PCR 法では、*Mycoplasma hyorhinis* が検出された。病理組織学的には、疣状物において、細胞崩壊産物を伴う化膿性壊死性炎が認められ、病変の一部には石灰化も認められた。免疫組織化学的には、病変に一致して、抗 *M. hyorhinis* 抗体に対する陽性反応が認められた。以上のことから、これらの 2 症例は *M. hyorhinis* に起因した疣贅性心内膜炎が疑われた。——キーワード：肥育豚、*Mycoplasma hyorhinis*、疣贅性心内膜炎。

-----日獣会誌 72, 767～771 (2019)

豚マイコプラズマ病の主な原因マイコプラズマは 3 菌種知られており、*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) は 3 カ月齢以上の豚に肺炎を、*Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) は 3 カ月齢未満の若齢豚に多発性漿膜炎や関節炎を、そして、*Mycoplasma hyosynoviae* (*M. hyosynoviae*) は 3 カ月齢以上の豚に関節炎を引き起こすことが知られている。このうち、*M. hyorhinis* は、若齢豚の鼻腔に常在するが、疾病に至ることは少なく、上部呼吸器官や肺の上皮細胞が損害を受けることにより、本菌が血流中に侵入し、全身移行後、漿膜炎や関節炎を惹起すると考えられている [1, 2]。また、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルスやその他の細菌との多重感染によって、肺炎の重篤化に関与する [3]。

このように、*M. hyorhinis* 感染は漿膜炎や関節炎、また、まれに肺炎等を引き起こすことが知られてきたが、今回、これまで報告がなかった、*M. hyorhinis* の関与が疑われた肥育豚の疣贅性心内膜炎 2 症例が認められたので、その概要を報告する。

材料及び方法

症例 1：2018 年 5 月に長崎県内のと畜場に搬入された A 農場由来の肥育豚 38 頭中の 1 頭 (雑種、推定 6 カ月齢、去勢) で、生体検査で著変は認められず、内臓検査で大動脈弁に疣状物が認められた。

症例 2：2018 年 8 月に同と畜場に搬入された B 農場由来の肥育豚 21 頭中の 1 頭 (雑種、推定 6 カ月齢、雌) で、生体検査で著変は認められず、内臓検査で大動脈弁に疣状物が認められた。

細菌学的検査：症例 1, 2 ともに、疣状物及び心臓、腎臓、脾臓、肝臓、浅頸リンパ節、内腸骨リンパ節及び頸部筋肉について、5%羊血液加トリプトソイ寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン(株)、東京) (血液寒天培地) で好気培養及び 5%羊血液加変法 GAM 寒天培地 (日水製薬(株)、東京) (血液 GAM 寒天培地) で嫌気培養を、37℃ 48 時間行った。豚マイコプラズマの検査は、症例 1 の疣状物及び心外膜、症例 2 の疣状物について、核酸精製試薬 (InstaGene Matrix, バイオ・ラッド ラボラ

† 連絡責任者(現所属)：秦 温子 (長崎県県南保健所)

〒 855-0043 島原市新田町 347-9

☎ 0957-62-3288 FAX 0957-64-6520

E-mail : hata-atsuko@pref.nagasaki.lg.jp

トリーズ(株, 東京) を用いて DNA を抽出した. *M. hyorhinis* 及び *M. hyopneumoniae* の検出は, それぞれ Kobayashi ら [3] 及び Mattsson ら [4] の方法による PCR をプレミックス試薬 (EmeraldAmp® PCR Master Mix PCR, タカラバイオ(株, 滋賀) を用いて行った. プライマー及び反応条件は, *M. hyorhinis* が 5'-TAT CGCATGATGAGTAATAG-3' 及び 5'-GCTGCGTTA GTGAAATTAT-3' で 94°C 30 秒, 60°C 30 秒, 72°C 1 分の 30 サイクル, *M. hyopneumoniae* が 5'-GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3' 及び 5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3' で 95°C 45 秒, 60°C 1 分, 72°C 2 分の 35 サイクルとして DNA を増幅した. 判定は, PCR 産物の 2% アガロースゲル電気泳動法で *M. hyorhinis* (676bp) 及び *M. hyopneumoniae* (649bp) の特異遺伝子が認められた場合にそれぞれ陽性とした.

病理組織学的検査: 症例 1, 2 ともに, 疣状物及び主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し, 定法に基づきパラフィン包埋後, 薄切し, パラフィン切片を作製しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った.

免疫組織化学的検査: 症例 1, 2 ともに, 疣状物及び主要臓器のパラフィン切片を用い, 免疫組織化学的検査 (IHC) を実施した. 一次抗体は抗 *M. hyorhinis* 家兎血清 [5] (農研機構動物衛生研究部門作製) 並びに各一次抗体希釈液は市販抗体希釈液 (S3022, Dako, U.S.A.) を用い, 市販キット (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(R), (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) の手順に従って実施した. 組織切片は 0.1% アクチナーゼ E 処理 (37°C, 20 分) により抗原の賦活化を実施後, 3% H₂O₂ 含有メタノール (室温, 30 分) により内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った. 一次抗体処理には 8,192 倍に希釈した前述の抗体を用いた (室温, 30 分). 一次抗体処理後の組織切片について, 二次抗体 (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(R), (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) (室温, 30 分) 及び発色処理 (シンプルステイン AEC 溶液, (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) を各種キットの使用法に従って実施した. 切片はヘマトキシリンで対比染色後, 鏡検を実施した.

成 績

肉眼的所見: 症例 1 では, 大動脈弁に直径 1.5cm のカリフラワー状疣状物が形成され, 石灰化も認められた (図 1). また, 心外膜には多量の線維素が付着し, 心外膜炎が認められたほか, 胸膜炎, 横隔膜炎, 腹膜炎が認められた. 症例 2 では, 大動脈弁に直径 1.0cm の器質化した疣状物が認められた. その他の臓器では, 肺に限局性の膿瘍, 肝臓のうっ血が認められた.

細菌学的検査: 疣状物を直接スタンプしたグラム染色では, 症例 1, 2 ともに菌体は確認できなかった. また,

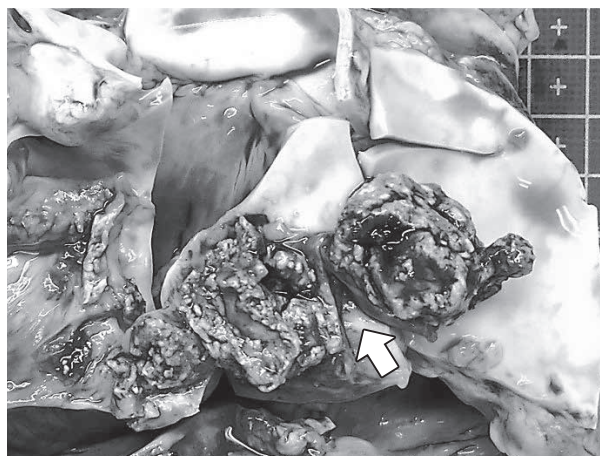


図 1 症例 1
大動脈弁に形成された疣状物 (矢印).
直径 1.5cm のカリフラワー状疣状物.

疣状物及び主要臓器の血液寒天培地での好気培養及び血液 GAM 寒天培地での嫌気培養では, 症例 1, 2 ともに菌の発育は認められなかった. 豚マイコプラズマの PCR 検査では, 症例 1 の疣状物及び心外膜, 症例 2 の疣状物とも, *M. hyorhinis* に特異的な遺伝子が検出された (図 2). また, いずれの検体からも *M. hyopneumoniae* の遺伝子は検出されなかった.

病理組織学的検査: HE 染色では, 症例 1, 2 ともに, 疣状物とその付着する弁膜は, 細胞崩壊産物を伴う壊死巣の周囲に, 多数の好中球及びリンパ球, マクロファージ及びフィブリンが集簇した化膿性壊死性病変が認められ, 病変の一部では, 石灰化も認められた (図 3). また, 壊死巣周囲には結合組織の増生及び小血管の新生が認められた. 症例 1 では, 壊死巣及び周囲の炎症細胞, 結合組織中に, 豊富な細胞質で核中央にクロマチンが細長く集合した大型のマクロファージがしばしば認められた (図 4) が, 症例 2 では, 結合組織中に少数認められた. また, 症例 1 では, 軽度の化膿性心筋炎, 脾臓のリンパ濾胞の活性化, 間質性腎炎, 肝臓小葉間結合組織の軽度細胞浸潤が認められた. 一方, 症例 2 では, 脾臓のリンパ濾胞の活性化が認められたが, その他の臓器では, 著変は認められなかった.

免疫組織化学的検査: IHC では, 症例 1, 2 ともに, 疣状物及び大動脈弁の病変部に一致して抗 *M. hyorhinis* 家兎血清に対する陽性反応が認められた (図 5). また, 症例 1 の心臓, 脾臓, 腎臓及び肝臓では, 血管及び病変部のマクロファージの細胞質において, 陽性反応が少数認められたが, 症例 2 では, これらの臓器で陽性反応は認められなかった.

考 察

豚の疣贅性心内膜炎は, *Streptococcus suis* や豚丹毒

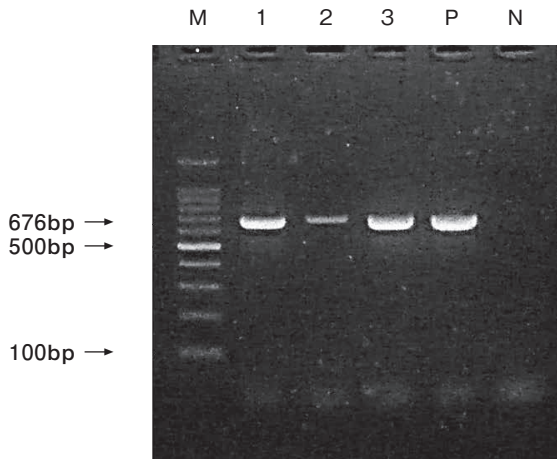


図2 *M. hyorhinis* のPCR電気泳動像
 M: 100bp DNA Ladder (タカラバイオ(株), 滋賀)
 1: 症例1 疣状物 2: 症例1 心外膜
 3: 症例2 疣状物 P: *M. hyorhinis* (BTS-7株)
 N: 陰性コントロール

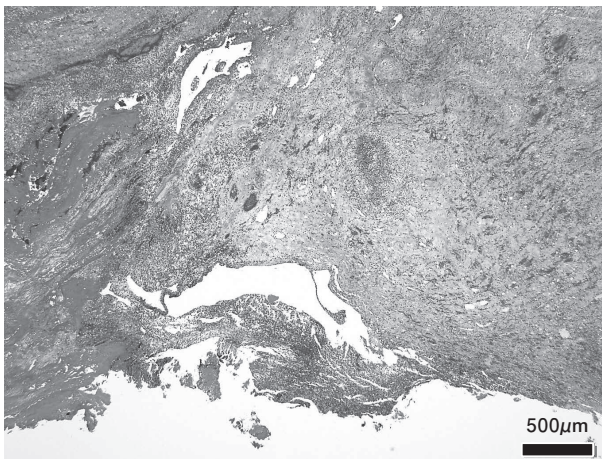


図3 症例1の疣状物
 細胞崩壊産物を伴う化膿性壊死性病変が認められる
 (HE染色 Bar=500µm).

菌が主因であることが多く、まれに、大腸菌や *Pasteurella multocida* 等のグラム陰性菌が関与することが知られている [6]。これらの細菌は、一般的な培養法及び直接鏡検で容易に検出されるため、今回の症例では、これらの細菌の関与はないと考えられた。

一方、*M. hyorhinis* の分離には、マイコプラズマ専用の特殊な培地が使用されるが、公衆衛生上の必要性から、通常のと畜検査で使用されることはほとんどない。今回の症例1, 2においても、疣状物からのマイコプラズマの分離培養を実施できなかったため、検体から直接DNAを抽出し、PCR検査で *M. hyorhinis* の遺伝子の検出を試みた。

その結果、疣状物から *M. hyorhinis* の遺伝子が検出され、さらに、IHCで病変部に一致して *M. hyorhinis*

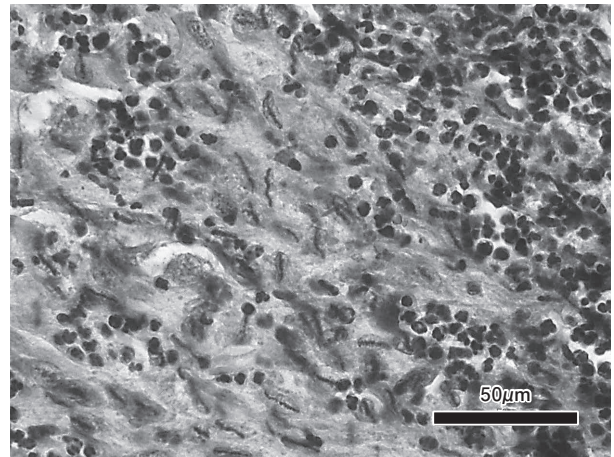


図4 症例1の病変部の炎症細胞中に、クロマチンが中央に細長く集合したマクロファージが認められる (HE染色 Bar=50µm)。

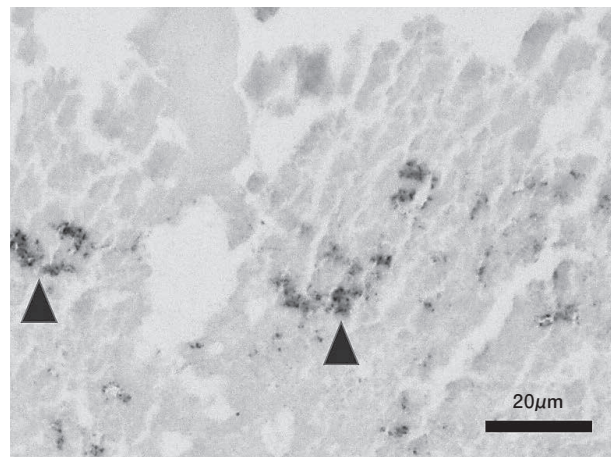


図5 症例2の疣状物における抗 *M. hyorhinis* 家兎血清を用いたIHC。病変に一致して陽性反応(矢頭)が認められる (IHC Bar=20µm)。

の陽性反応が確認されたことから、これらの症例は、*M. hyorhinis* の感染による疣贅性心内膜炎が疑われた。

豚の疣贅性心内膜炎からのマイコプラズマの分離あるいは検出報告例は、*M. hyorhinis* のほか、*M. hyopneumoniae* 及び *M. hyosynoviae* も含め、著者らが検索し得た範囲内では見当たらない。豚以外では、牛で *Mycoplasma bovis* が、人で *Mycoplasma pneumoniae* 及び *Mycoplasma hominis* が関与したと考えられる症例が、少数ではあるが報告されている [7-10]。

今回の2症例では、症例1の心臓、脾臓、腎臓及び肝臓の病変部において、少数ながら、IHCで *M. hyorhinis* の陽性反応が認められ、*M. hyorhinis* が諸臓器実質の病変形成に関与する可能性が示唆された。また、胸部及び腹部の漿膜炎が認められ、心外膜からも *M. hyorhinis* の遺伝子が検出されたことから、疣状物形成との関連が示唆された。一方、症例2においては、*M.*

hyorhinis は、疣状物とその付着する弁膜のみで検出され、漿膜炎等の *M. hyorhinis* の関与を疑う他の所見も認められなかった。

このように、2つの症例において異なる所見が認められたことから、*M. hyorhinis* による疣状物形成の機序及び諸臓器への波及に至る可能性について明らかにするためには、*M. hyorhinis* の感染及び全身移行の時期、*M. hyorhinis* の病原性の差異、また、PRRS ウイルス等他の病原体の関与等について、さらなる調査研究が必要と考えられた。

症例1では、大動脈弁の病変部に核中央にクロマチンが細長く集合したマクロファージがしばしば認められ、これらは人のリウマチ熱（A群β溶血性連鎖球菌の感染に続発する自己免疫疾患）の心内膜炎でみられる活性化マクロファージ Anitschkow 細胞と類似していた [11]。Anitschkow 細胞は、豚の僧帽弁の病変部（粘液変性及び線維増生）[12]、牛の冠状動脈硬化病変[13]、血小板由来成長因子-Cの過剰発現トランスジェニックマウスの心臓病変[14]及びラットの心臓弁膜症の病変[15]などにおいても認められるが、動物における報告は少ないのが現状である。本症例においても、この細胞がどのような役割を担っているのか今後詳細な研究が必要である。

今回、約3カ月という短期間に異なる農場で *M. hyorhinis* による疣贅性心内膜炎が認められ、疣状物形成への *M. hyorhinis* の関与が示唆された。特に、疣状物の直接スタンプのグラム染色で菌体が認められず、血液寒天培地でも培養陰性の場合、マイコプラズマが関与している可能性も考慮して検査をする必要があると考えられた。また、疣贅性心内膜炎が、*M. hyorhinis* 以外の豚のマイコプラズマでも起こり得るのかや全身性感染を引き起こすのか等、今後、症例を積み重ねていくことで実態を明らかにする必要がある。

稿を終えるに当たり、御指導、御助言をいただいた、(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 小林 勝 技師、嶋田恵美 技師及び愛知県中央家畜保健衛生所 杉江建之介 獣医師、京都府中丹家畜保健衛生所 吉崎康二郎 獣医師に深謝する。

引用文献

- [1] 八木橋 武, 山本孝史: マイコプラズマ病, 豚病学, 柏崎 守, 久保正法, 小久江栄一, 清水実嗣, 出口栄三郎, 古谷 修, 山本孝史編, 第四版, 377-386, 近代出版, 東京 (1999)
- [2] 小林秀樹: プタのマイコプラズマ感染症, 最新マイコプラズマ学, 日本マイコプラズマ学会編, 145-150, 近代出版, 東京 (2016)
- [3] Kobayashi H, Morozumi T, Miyamoto C, Shimizu M, Yamada S, Ohashi S, Kubo M, Kimura K, Mitani K, Ito N, Yamamoto K: *Mycoplasma hyorhinis* infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), J Vet Med Sci, 58, 109-113 (1996)
- [4] Mattsson JG, Bergström K, Wallgren P, Johansson KE: Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16s rRNA gene, J Clin Microbiol, 33, 893-897 (1995)
- [5] Kawashima K, Yamada S, Kobayashi H, Narita M: Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress, J Comp Pathol, 114, 315-323 (1996)
- [6] Katsumi M, Kataoka Y, Takahashi T, Kikuchi N, Hiramune T: Bacterial isolation from slaughtered pigs associated with endocarditis, especially the isolation of *Streptococcus suis*, J Vet Med Sci, 59, 75-78 (1997)
- [7] Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED: *Mycoplasma bovis* infections in cattle, J Vet Intern Med, 25, 772-783 (2011)
- [8] Fenollar F, Gauduchon V, Casalta JP, Lepidi H, Vandenesch F, Raoult D: *Mycoplasma endocarditis*: two case reports and review, Clin Infect Dis, 38, e21-e24 (2004), (online), (<https://doi.org/10.1086/380839>), (accessed 2018-08-06)
- [9] Scapini JP, Flynn LP, Sciacaluga S, Morales L, Cadario ME: Confirmed *Mycoplasma pneumoniae* endocarditis, Emerg Infect Dis, 14, 1664-1665 (2008)
- [10] Gagneux-Brunon A, Grattard F, Morel J, Suy F, Fuzellier JF, Verhoeven P, Cazorla C, Guglielminotti C, Fresard A, Lucht F, Botelho-Nevers E: *Mycoplasma hominis*, a rare but true cause of infective endocarditis, J Clin Microbiol, 53, 3068-3071 (2015)
- [11] 池田麻衣子, 小沢広明, 永田佳敬, 馬場礼三, 加藤太一, 長井典子: 病理組織診断でリウマチ熱による伝導路障害が死因であると疑われた1例, 日本小児循環器学会雑誌, 32, 423-428 (2016)
- [12] Gagna C, Meier D, Ru G, Pospischil A, Guarda F: Pathology of mitral valve in regularly slaughtered pigs: an abattoir survey on the occurrence of myxoid degeneration (endocarditis), fibrosis and valvulitis, J Vet Med A, 45, 383-395 (1998)
- [13] Biasato I, Biasibetti E, Biagini D, Bruatto G, Cenacchi G, Guarda F, Capucchio MT: Spontaneously occurring intramural coronary arteriosclerosis in regularly slaughtered veal calves and beef cattle: a screening study about prevalence and histopathological features, J Vet Cardiol, 20, 55-63 (2018)
- [14] Pontén A, Li X, Thorén P, Aase K, Sjöblom T, Ostman A, Eriksson U: Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy, Am J Pathol, 163, 673-682 (2003)
- [15] Quinn A, Kosanke S, Fischetti VA, Factor SM, Cunningham MW: Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal m protein, Infect Immun, 69, 4072-4078 (2001)

Two Cases of Verrucous Endocarditis with Suspected Cause of *Mycoplasma hyorhinis*
Infection in Fattened Pigs

Atsuko HATA^{1)†}, Tai MINOWA¹⁾, Hideki KOBAYASHI²⁾ and Tomoyuki SHIBAHARA^{2),3)}

1) *Nagasaki Prefectural Kawatana Meat Hygiene Inspection Laboratory, 39-64 Momozugo, Kawatana, Higashisonogi, 859-3605, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

3) *Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinkuourai-Kita, Izumisano, 598-8531, Japan*

SUMMARY

We observed verrucous endocarditis in the aortic valves of two fattened pigs from different farms in Nagasaki Prefecture, Japan, which were slaughtered in May or August of 2018. In both cases, no bacteria was isolated from the vegetation using 5% sheep blood agar, but DNA of *Mycoplasma hyorhinis* was detected using PCR. Histopathologically, the vegetation consisted of suppurative necrotizing inflammation with cellular debris, and calcification was also observed in some parts of the lesions. Immunohistochemically, positive reactions for the *M. hyorhinis* antibody was observed in the vegetation. These two cases of verrucous endocarditis were considered to be caused by *M. hyorhinis*. — Key words : Fattened pigs, *Mycoplasma hyorhinis*, verrucous endocarditis.

† Correspondence to (Present address) : Atsuko HATA (Nagasaki Prefectural Kennan Public Health Center)

347-9 Shinden, Shimabara, 855-0043, Japan

TEL 0957-62-3288 FAX 0957-64-6520

E-mail : hata-atsuko@pref.nagasaki.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 767 ~ 771 (2019)