

9 県内で発生した豚熱 6 例における病理学的考察

県央家畜保健衛生所

手塚優奈、平野佳世

はじめに

豚熱 (CSF) は、フラビウイルス科ペスチウイルス属の豚熱ウイルス (CSFV) による、豚とイノシシの感染症で、2018 年に国内で 26 年振りの発生が確認された。その後、2024 年 11 月までに全国で 22 都県 94 例の発生があり、当県では 2020 年 2 月から CSF ワクチン接種を開始したが、2021 年 4 月から 2024 年 5 月にかけて、6 例の発生が確認されている¹⁾。

現在国内で流行している CSFV は、過去国内で流行していた株より病原性が低いとされているが²⁾、野外症例における病原性評価及び病理組織学的探索はまだ少ない。

今回、当県で発生した 6 例について病理学的に病変の重症度を比較検討するとともに、病原体の検出方法について、従来法である免疫組織学的検査 (IHC) と併せて、切片上の遺伝子を検出する *In situ hybridization* (ISH) を実施し、結果を比較したので、概要を報告する。

材料及び方法

当県で病性鑑定により CSF と診断された 6 農場 (A～F) 計 23 頭の解剖豚 (表 1) を用いて、定法に従い病理組織学的検査を実施した (表 2)。その結果、病変を認めた臓器である、脾臓、腎臓、リンパ節、肺、腸及び脳について次の 3 点の検討を行った。

1 当県発生事例の CSF スコアによる比較検討

脾臓、腎臓、リンパ節、肺、腸及び脳の病理組織学的所見の重症度を、過去の他県における

表 1 解剖豚詳細

農場名	日齢	ワクチン	臨床症状	抗体検査	判定
A農場	65	接種	—	未実施	
	86	接種	—	未実施	
	65	接種	—	未実施	
	62	未接種	—	0.001	陰性
	62	未接種	—	未実施	
	62	未接種	—	0.134	陽性
B農場	57	未接種	衰弱	0.015	陰性
	57	未接種	衰弱	0.006	陰性
	57	未接種	死亡	0.005	陰性
	57	接種	死亡	0.041	陰性
C農場	63	接種	元気消失・食欲低下	0.001	陰性
	63	未接種	元気消失・食欲低下	0.085	疑陽性
	49	未接種	元気消失・食欲低下	1.045	陽性
D農場	28	未接種	眼瞼浮腫、一部チアノーゼ	0.01	陰性
	28	未接種	眼瞼浮腫、一部チアノーゼ	0.072	疑陽性
	77	接種	死亡	0.07	疑陽性
	77	接種	死亡	0.015	陰性
E農場	40	接種	衰弱	0.047	陰性
	40	不明	死亡	0.037	陰性
	40	未接種	死亡	0.095	疑陽性
F農場	120	接種	—	1.034	陽性
	120	接種	—	0.204	陽性
	120	接種	—	0.031	陰性

業績発表会事例^{3), 4)}を参照に、0 から 3 の 4 段階に病変スコアとして設定した (表 3)。そのうち、CSFV の主たる標的臓器である脾臓、腎臓及びリンパ節の各病変スコアの合計値を CSF スコア、CSF に限らず病変が形成される臓器である肺、腸及び脳の各病変スコアの合計値を N-CSF スコアと定義し、CSF スコアと以下の 4 項目の比較を行った。なお、肺、腸及び脳の病理組織学的所見は CSF による特徴所見ではないものも含まれている。

表 2 病理組織学的所

農場名	検体番号	脾臓		腎臓		リンパ節		肺		腸		脳
		リンパ濾胞壊死	梗塞	間質性腎炎	壊死	血液吸収像	濾胞壊死	化膿性気管支肺炎	胸膜肺炎	中等度腸炎	壊死性腸炎	
A農場	1	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
	2	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	3	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
	4	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
	5	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	6	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
B農場	7	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
	8	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	9	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	10	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+
C農場	11	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	12	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
D農場	14	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
	15	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
	16	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
	17	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
E農場	18	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
	19	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	20	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
F農場	21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	22	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	23	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+

(1) 日齢

日齢と CSF スコアとの相関について回帰分析を用いて、決定係数 (R^2) による評価を行った。

(2) ワクチン接種状況

検体をワクチン接種群及び未接種群の 2 群に分類し、ワクチン接種の有無による CSF スコアの 2 群間の差について、t 検定を用いて p 値による評価を行った。

(3) N-CSF スコア

CSF スコアと慢性疾病との関連性を検討するため、CSF スコアと N-CSF スコアについて、回帰分析を用いて決定係数 (R^2) による評価を行った。

(4) 感染実験事例の CSF スコア

当県発生事例における CSFV の病原性評価のため、既報の感染実験事例の CSF スコアを算出し、当県の CSF スコアとの比較を行った。なお、比較対照は高病原性 ALD 株実験群、中等度病原性 Wingene' 93 株実験群、低病原性 JPN/1/2018 株実験群の 3 株の感染実験例とした^{3), 6), 7)}。

表 3 病変スコアの設定

	0	1:軽度	2:中等度	3:重度
脾臓	著変なし	限局性の出血・リンパ球の枯渇	出血・リンパ濾胞壊死	梗塞
腎臓		限局性の出血・間質性腎炎	出血・間質性腎炎	壊死
リンパ節		リンパ球減少・軽度出血	濾胞不明瞭・血液吸収像	濾胞壊死・出血性リンパ節炎
肺		気管支炎	気管支肺炎または胸膜炎	気管支肺炎かつ胸膜炎
腸		軽度腸炎	中等度腸炎	壊死性腸炎
脳		軽度の充血	囲管性細胞浸潤・リンパ球浸潤	非化膿性脳炎

2 感染時期の推定

過去の感染実験事例では、CSFV は扁桃の陰窩上皮細胞に感染し、頸部リンパ節へ移動後、脾臓や各リンパ節へ拡散、その後全身臓器で増殖するとされており、その感染日数ごとの所見が提示されている^{5), 6)}。また、PCR 及び ELISA の結果から感染日数を推定する方法が報告されている⁸⁾。そこで前述した報告を組み合わせて、感染からの経過日数を推定する指標を設定した (表 4)。これを基に、当県発生事例において、病性鑑定時の日齢から感染経過日数の差を求め、感染時の日齢を推定した。さらに、感染時の日齢とワクチン接種日

齢との比較を行い、ワクチン接種前に感染していたかの検討を行った。

表 4 感染日数の推定指標

感染経過日数	2	10	17	25
CSFスコア	0～1	2～3	4	5以上
病理所見	扁桃のみ	扁桃・リンパ節	扁桃・リンパ節 脾臓・腎臓	扁桃・リンパ節 脾臓・腎臓
PCR/ELISA	-/-	+/-	+/+	-/+

3 IHC と ISH の比較

(1) IHC 及び ISH の感度比較

A～F 農場の各 1 検体の脾臓について、マウス抗 CSFV モノクローナル抗体(CVL)を用いて IHC 並びに CSFV のエンベロープに対するプローブを用いた ISH を実施した。なお、ISH は RNAscope 2.5HD ReageNt Kit (ACD) の手順に従い実施した。

陽性反応あるいは陽性シグナルの定量のため、スライド上の同病変部位を撮影し、得られた顕微鏡の画像を PC 上に取り込み、画像編集ソフト GIMP(<https://www.gimp.org/>)で色調整および編集を行った。その後、画像解析ソフト imageJ(<https://imagej.net/ij/>)で陽性抗原あるいはシグナルの面積を測定した。

(2) CSFV の諸臓器への影響

病変がみられた D 農場の肺 (図 1)、腸 (図 2) 及び F 農場の脳 (図 3) の各 1 検体について、IHC 及び ISH を実施し、その陽性抗原あるいはシグナルを、「-」～「+++」の 4 段階に類し、ウイルス量の比較を行った。

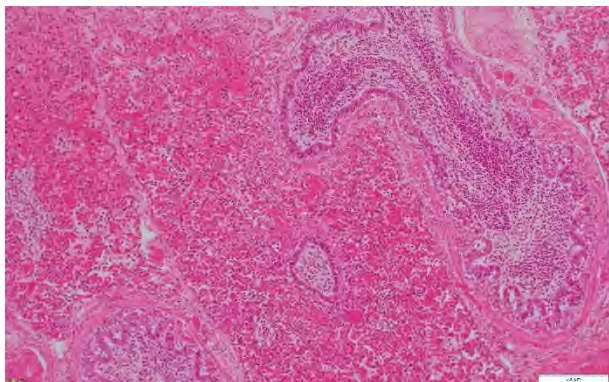


図 1 中等度化膿性気管支肺炎 (HE 染色)

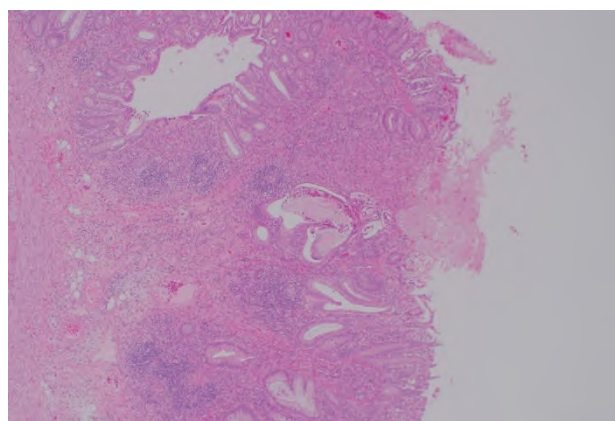


図 2 壊死性腸炎 (HE 染色)

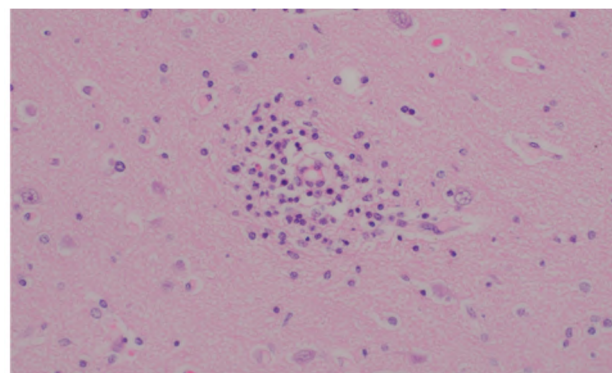


図 3 中等度非化膿性脳炎 (HE 染色)

結果

1 本県発生事例の CSF スコアによる比較検討

(1) 日齢と CSF スコア

関連性の指標である決定係数(R^2)は 0.5 以下となり関連性は認められなかった (図 4)。

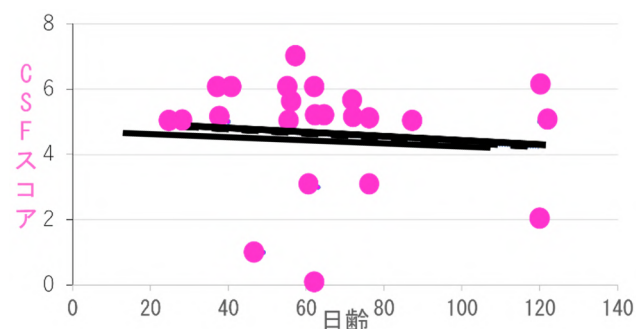


図 4 日齢と CSF スコア

(2) ワクチン接種状況と CSF スコア

p 値は 0.05 以上となり、2 群間に有意な差は認められなかった（表 5）。

表 5 ワクチン接種状況と CSF スコア

	CSF スコア (平均値)
未接種(11頭)	4.0
接種(11頭)	4.6

(3) N-CSF スコアと CSF スコア

決定係数(R^2)は 0.5 以下となり関連性は認められなかった（図 5）。

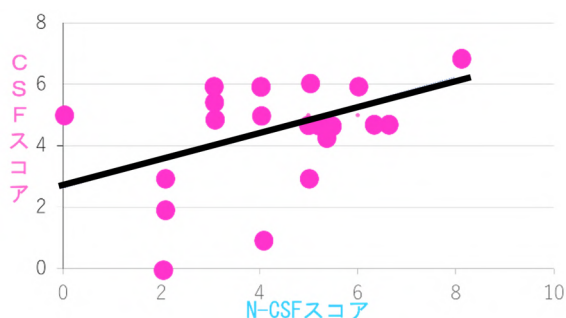


図 5 N-CSF スコアと CSF スコア

(4) 感染実験事例の CSF スコア

当県発生事例の平均 CSF スコアは脾臓で 2、腎臓で 1、リンパ節で 2 となり、その合計は 5 となった。これについて感染実験事例の CSF スコアの合計値と比較したところ、低病原性株と中等度病原性の間を示した（表 6）。

表 6 感染実験事例と当県の CSF スコア比較

検体 ウイルス株	脾臓	腎臓	リンパ 節	スコア 合計
本症例群	2	1	2	5
高病原性 ALD株実験群	3	2	2	7
中等度病原性 Wingene' 93株実験群	3	2	1	6
低病原性 JPN/1/2018株実験群	3	1	0	4

2 感染時期の推定

病性鑑定時、豚 23 頭のうち 11 頭がワクチン接種済みと報告されていた。しかし、病理組織学的所見から、感染からの経過日数を推定したところ、接種済み 11 頭のうち、6 頭がワクチン接種済み、残り 5 頭が未接種状態であったと推定された（表 7）。このことから、感染時、23 頭中 16 頭はワクチン未接種であったと推定された。

表 7 感染時のワクチン接種状況

農場	推定 感染日齢	ワクチン 接種日齢	感染時ワクチン接種状況（頭）			
			接種	推定未接種	未接種	不明
A	44~68	54	1	2	3	0
B	31~47	50	0	1	3	0
C	46~49	50	0	1	2	0
D	10~67	56	2	0	2	0
E	22	30	0	1	1	1
F	100~ 117	21	3	0	0	0
計			6	5	11	1

3 IHC と ISH の比較

(1) IHC 及び ISH の感度比較

ISH は IHC の 3 から 20 倍のウイルスを検出した（図 6）。

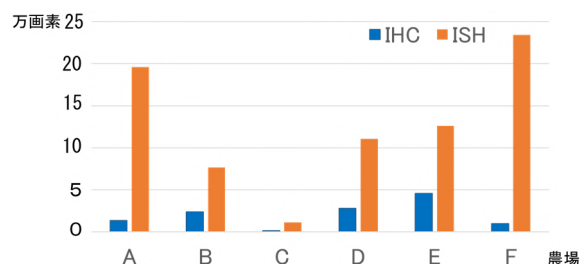


図6 脾臓における IHC と ISH の感度比較

(2) CSFV の諸臓器への影響

肺では細気管支上皮および肺胞壁に IHC で少量の陽性抗原が、ISH で中等量のシグナルがみられた (図7)。腸では、腸陰窩上皮細胞および粘膜固有層に IHC で少量の陽性抗原が、ISH では中等量の陽性シグナルがみられた (図8)。脳では、IHC では陽性抗原がみられなかったのに対し、ISH では病変部であるリンパ球浸潤像に一致して中等量の陽性シグナルが観察された (図9)。結果として、IHC より ISH の方が多くのウイルスを検出することができた (表7)。

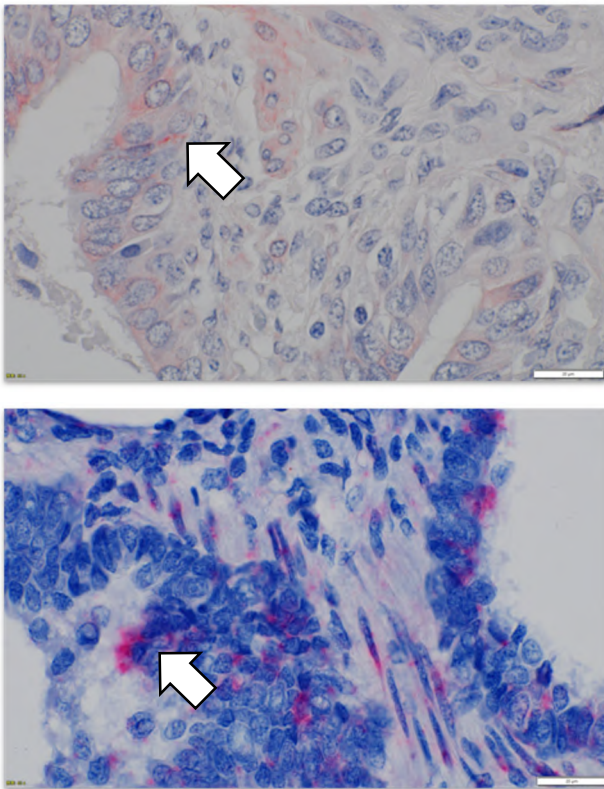


図7 豚 肺 上段：IHC 下段：ISH

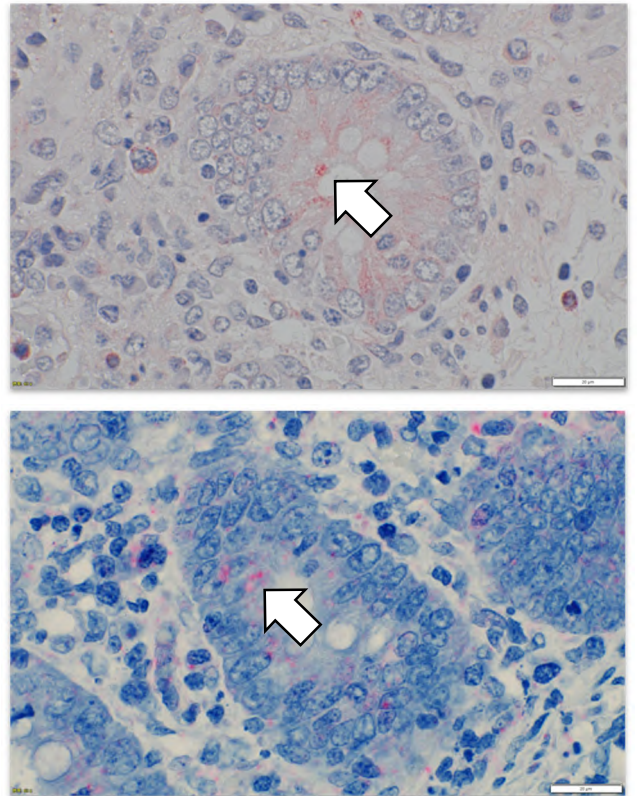


図8 豚 腸 上段：IHC 下段：ISH

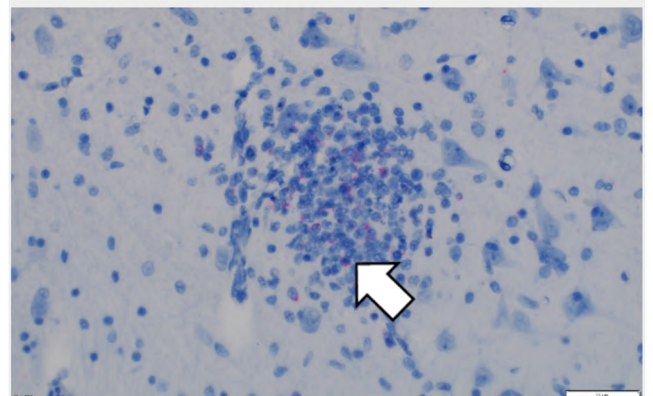


図9 豚 大脳 前頭葉 (ISH)

表7 IHC と ISH 比較

	IHC	ISH
肺炎	++ (気管支上皮及び肺胞壁)	++ (気管支上皮及び肺胞壁)
腸炎	++ (腸陰窩及び粘膜固有層)	++ (腸陰窩及び粘膜固有層)
脳炎	-	++ (炎症細胞集簇像)

考察

今回、県内発生6例について病理組織学的

検査を行い、その病原性、感染時期、体内動態の検討を行った。

病原性の検討では、CSF スコアと日齢、ワクチン接種の有無、N-CSF スコア及び感染実験事例との比較を行ったが、統計解析では有意な要因は認められなかった。日齢と病理組織学的所見との関連性については、ワクチン未接種農場の事例では、日齢の低い豚のほうが病変の重症度が高くなると報告されている^{3), 4)}。他県の症例と結果が異なる原因として、検体に用いた解剖豚の感染日齢にばらつきがあったこと、さらに、当県の発生事例はいずれもワクチン接種農場であったことから、子豚が保有する移行抗体量による影響も考えられた。また、現行の豚熱ワクチンは現在の国内流行株に対して有効性が確認されているにもかかわらず、ワクチン接種状況について関連性が認められなかったのは、病性鑑定実施時にワクチン接種済みと報告されていたが、病理組織学的所見を踏まえた推定感染日齢を考慮すると、個体の中にワクチン接種前にすでに CSFV に感染していたと考えられる個体が約半数を占めていたことが要因としてあげられた。慢性疾病の病変が強くなるほど、CSF の病変が強くなると思われたが、N-CSF スコアについても関連性が認められなかった。CSF の病態はリンパ球の減少による免疫低下であり、それによる他の慢性疾病の悪化により死亡率が上昇すると考えられている⁸⁾。今回、CSF に典型的な病変の他、一部細菌の関与を疑う所見がみられたものの、死亡の直接な原因となる重度の慢性疾病はみられなかった。このことから、当県の事例の多くは CSF による急性経過をたどったため、CSF の病変が主な死因となったと考えられた。

当県事例の CSF スコアと感染実験事例との

比較検討の結果、当県の発生事例のスコアは感染実験事例の低病原性株と中等度病原性株の間を示した。他県における病変の重症度^{3), 4)}においても、当県と同様に低病原性株よりも重度であったとされていることから、野外環境下では低病原性株とされる国内流行株においても、その CSF スコアは感染実験事例よりも重度となる傾向がみとめられた。

病理組織学的所見から、感染経過日数を推定し、推定感染日齢におけるワクチン接種状況の推定を行った。その結果、ほとんどの豚はワクチン接種前に CSFV に感染していた可能性が考えられた。また、病理組織学的に CSFV の推定感染日齢が想定できたことから、CSFV の侵入豚舎や時期の推定も可能と思われる、ウイルス侵入経路等、疫学調査にも有用と思われた。

IHC および ISH の比較検証の結果では、ISH は IHC より感度が高いことを証明し、ISH を用いることにより免疫系臓器のみならず肺、腸、脳の病変臓器に高い濃度でウイルスは分布していることを認めた。このことから、CSFV は全身臓器に分布し病変を惹起することが考察された。そのため、野外環境下での CSFV の病原性について、継続的に評価する必要が示唆された。また、ISH により国内で初めて脳炎と CSFV の関連性が証明された。今後は、他の病原体についても、ISH を活用することにより、高度な疾病診断につながると考える。

引用文献

- 1) 農林水産省ホームページ「豚熱国内の発生状況」
- 2) 農研機構 動物衛生研究部門ホームページ プレスリリース「(研究成果)2018 年分離株を用いた豚コレラウイルスの感

染実験」

- 3) 杉江健之介ら, 愛知県畜産技術業績発表
会集録, 60 (2019)
- 4) 奥村尚子ら, 沖縄県家畜衛生試験場年報,
(2022)
- 5) PATHOLOGIC BASIS of VETERINARY
DISEASE, 261-262
- 6) Kameyama, K., nishi, T., Yamada, M.,
MasujiN, K., Morioka, K., Kokuho, T.
aNd Fukai, K. 2019. J. Vet. Med. Sci.
81(9):1277-1284.
- 7) Belák, K., KoeNeN, F., VaNderhalleN,
H., Mittelholzer, C., FeliziaNi, F.,
De, Mia, G., M. aNd Belák, S. 2008.
Acta VeteriNaria Scandinavica.
50(1):34.
- 8) 山田学, 令和 2 年度基本講習会講演資料