

7. 哺乳豚における豚熱ワクチン免疫付与に関する野外追跡調査

家畜衛生試験場

○石井 圭子 友知 久幸 ほか

中央家畜保健衛生所

荒木 美穂

畜産課

高木和香子

【背景】

2020年1月、本県で豚熱が発生し、特定家畜伝染病防疫指針に基づき沖縄本島中部地域の10戸12,381頭が防疫措置対象となった。その後、本島全域において豚熱ワクチン(GPE⁻)の接種が承認され、動物衛生課と協議の上、初回に限り移行抗体を保有しないと推察される哺乳豚も接種対象とした。哺乳豚への豚熱ワクチン接種は予防的ワクチンプログラムにおいて本県での実施が国内初である(図1)。

豚熱ワクチンの哺乳豚への安全性・有効性は豚コレラ防疫史等の既報で示されているが、国内の豚熱ワクチン使用は2006年の全面中止以来であり、長らく豚熱清浄化が維持されていたため、近年、豚熱ワクチン免疫に関する野外調査は行われていない。今回、哺乳時に豚熱ワクチンを接種した豚群の免疫付与に関する野外追跡調査を実施したので、その概要を報告する。

【調査内容】

調査対象は本島北部または南部地域の一貫農場5戸(F1~F5)で飼養され、哺乳期に豚熱ワクチン(GPE⁻)を1ml/頭で接種した豚群とした。ワクチン接種時の日齢別に3つの試験群を設定した(①群:1~7日齢、②群:8~14日齢、③群:15~21日齢、F3のみ①群:1~10日齢、②群:11~20日齢、③群:21~30日齢)。各試験群は9~12頭(2~3腹)で、ワクチン接種後30、60、90、120日の抗体価の推移を経時的に追跡した。なお、F2とF3については接種後7、14、21日も追加して調査を行った。また、参考として各試験群の母豚6~11頭の接種前、接種後30日および120日(F3は150日)の検査も実施した(図2)。

【材料と方法】

対象農場5戸の子豚810頭(のべ)と母豚116頭(のべ)の非働化血清を用い、豚コレラエライザキットII(株式会社ニッポンジーン)によるELISA抗体検査と、GPE⁻株およびCPK-NS細胞による中和試験について定法に従って実施した(図3)。

本県の予防的ワクチンプログラム

初回接種に限り、哺乳豚を含めた全頭接種

以後は新しく生まれた子豚に適切な時期に接種

【哺乳豚に接種する根拠】

- ・長期にわたり清浄な状態で、豚熱発生時に摘発・淘汰を行った本県に移行抗体を保有する哺乳豚は存在しない
- ・哺乳豚が移行抗体を獲得するまでには時間が必要で、その間は野外ウイルス感染の危機に晒される
(愛知県においてワクチン接種開始まもなく未接種豚で発生)
- ・哺乳豚へのワクチン接種は安全性・有効性が証明されている
(豚コレラ防疫史P.101)
(原田熊幸,日獣会誌22,503-510,1969)
(笹原二郎,家畜衛生試験報告,第70号,53-55,1975)

哺乳豚への接種は本県での実施が国内初

ワクチン接種した哺乳豚の免疫付与に関する
近年の詳細なデータはないため追跡調査を実施

図1 本県の予防的ワクチンプログラム

調査内容

【対象農場】 本島北部および南部の一貫農場5戸 (F1~F5)

【ワクチン】 弱毒豚熱ウイルスGPE⁻株
1日齢以上の豚に1ml/頭で接種

【試験群設定】

- ①群: 接種時日齢1~7日 (F3は1~10日) 9~12頭 (2~3腹)
- ②群: 接種時日齢8~14日 (F3は11~20日) "
- ③群: 接種時日齢15~21日 (F3は21~30日) "

【追跡期間/経時的採血】

- F1、F4、F5: ワクチン接種後30、60、90、120日
- F2、F3: ワクチン接種後7、14、21、30、60、90、120日

図2 調査内容

材料と方法

【材料】 対象農場5戸 (F1~F5) の豚非働化血清

・子豚810頭 (延べ)

F1、F2は個体追跡、F3、F4、F5は豚群追跡
品種: F1はL、W、LWD、F2はLA、F3はLWA、F4とF5はLWD
(L:ランドレース W:大ヨークシャー D:デュロック A:アグー)

・母豚116頭 (延べ)

追跡対象子豚の母豚についてワクチン接種前の豚熱抗体陰性の確認と参考検査のため実施

【方法】 ・ELISA抗体検査

豚コレラエライザキットII (株)ニッポンジーン)を用いてキットのプロトコールに従い実施

・中和試験

GPE⁻株およびCPK-NS細胞を用いて定法に従い実施

図3 材料と方法

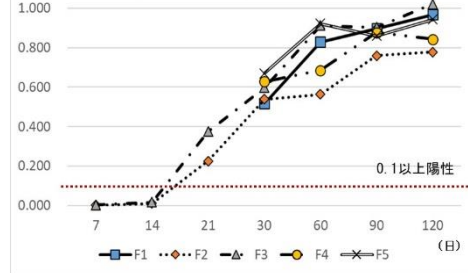
ELISA抗体検査結果

農場	接種後日数	検体数	ELISA検査結果 (陽性率(%))			平均 S/P値
			陽性	弱陽性	陰性	
F1	7	35	0	0	35[100.0]	0.001
	14	34	0	0	34[100.0]	0.011
	21	33	25(75.8)	4(12.1)	4[12.1]	0.225
	30	33	33[100.0]	0	0	0.539
F2	60	22	32[100.0]	0	0	0.564
	90	30	30[100.0]	0	0	0.759
	120	30	30[100.0]	0	0	0.778
	7	29	0	0	29[100.0]	0.003
F3	14	30	0	2(6.7)	26[83.3]	0.017
	21	30	29(96.7)	0	1[3.3]	0.375
	30	30	30[100.0]	0	0	0.598
	60	30	30[100.0]	0	0	0.912
F4	90	30	30[100.0]	0	0	0.903
	120	30	30[100.0]	0	0	1.023
	30	34	34[100.0]	0	0	0.517
	60	34	34[100.0]	0	0	0.829
F5	90	33	33[100.0]	0	0	0.897
	120	32	32[100.0]	0	0	0.968
	30	30	30[100.0]	0	0	0.628
	60	30	30[100.0]	0	0	0.686
F5	90	31	31[100.0]	0	0	0.877
	120	30	30[100.0]	0	0	0.843
	30	30	30[100.0]	0	0	0.670
	60	30	30[100.0]	0	0	0.922
F5	90	30	30[100.0]	0	0	0.880
	120	30	30[100.0]	0	0	0.844

- ・ ELISA抗体はワクチン接種後21日で陽性が確認 (付与率: F2で75.8%、F3で96.7%)
- ・ 接種後30日にはすべての農場で抗体陽性 (付与率: 100%)

図4 ELISA抗体検査結果(1)

子豚群の平均S/P値の推移



- ・ 平均S/P値は接種後90日または120日まで経時的に上昇

図5 ELISA抗体検査結果(2)

中和試験結果

F2、F3: 接種後7, 14, 21, 30, 60, 90, 120日の抗体価 (GM値)

F2	7日	14日	21日	30日	60日	90日	120日
①群(1~7日齢接種)	陰性	1.3	13.2	28.2	128.0	168.9	207.9
②群(8~14日齢接種)	陰性	3.1	8.0	21.9	68.2	168.9	256.0
③群(15~21日齢接種)	陰性	3.4	5.1	17.0	73.5	137.2	128.0
子豚群全体	陰性	2.4	8.2	21.9	86.7	157.6	189.6
母猪群(接種前抗体価<2)	NT	NT	NT	17.1	NT	NT	186.8

- ・ 全試験群で中和抗体は14日で確認、GM値は2.4→120日で189.6
- ・ 母猪群は30日で17.1→120日で186.8

F3	7日	14日	21日	30日	60日	90日	120日	150日
①群(1~10日齢接種)	陰性	3.7	42.2	90.5	238.9	362.0	891.4	NT
②群(11~20日齢接種)	陰性	3.5	24.3	59.7	294.1	362.0	776.0	NT
③群(21~30日齢接種)	陰性	7.5	29.9	90.5	388.0	588.1	675.6	NT
子豚群全体	陰性	4.6	31.3	78.8	300.9	425.6	776.0	NT
母猪群(接種前抗体価<2)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	348.4

- ・ 全試験群で中和抗体は14日で確認、GM値は4.6→120日で776.0
- ・ 母猪群は150日で348.4

図6 中和試験結果(F2、F3)

F1、F4、F5: 接種後30, 60, 90, 120日の抗体価 (GM値)

F1	30日	60日	90日	120日
①群(1~7日齢接種)	33.6	344.6	540.0	724.1
②群(8~14日齢接種)	80.6	322.5	438.9	645.1
③群(15~21日齢接種)	36.3	240.4	256.0	329.4
子豚群全体	43.4	301.3	397.9	534.7
母猪群(接種前抗体価<2)	32.0	NT	NT	128.0

- ・ 子豚群は30日で43.4 →120日で534.7
- ・ 母猪群は30日で32.0 →120日で128.0

F4	30日	60日	90日	120日
①群(1~7日齢接種)	55.7	111.4	445.7	362.0
②群(8~14日齢接種)	90.5	194.0	415.9	337.8
③群(15~21日齢接種)	68.6	274.4	274.4	222.9
子豚群全体	70.2	181.0	370.5	300.9
母猪群(接種前抗体価<2)	19.0	NT	NT	117.4

- ・ 子豚群は30日で70.2 →120日で300.9
- ・ 母猪群は30日で19.0 →120日で117.4

F5	30日	60日	90日	120日
①群(1~7日齢接種)	90.5	294.1	294.1	445.7
②群(8~14日齢接種)	84.4	337.8	548.7	388.0
③群(15~21日齢接種)	39.4	238.9	294.1	388.0
子豚群全体	67.0	287.4	362.0	406.4
母猪群(接種前抗体価<2)	32.0	NT	NT	166.0

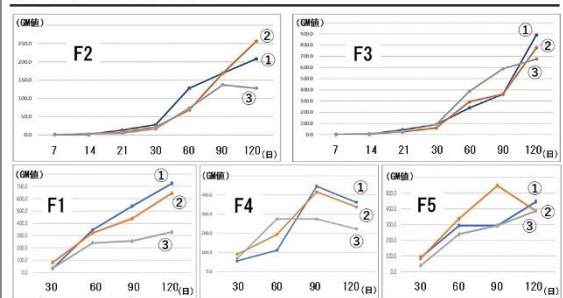
- ・ 子豚群は30日で67.0 →120日で406.4
- ・ 母猪群は30日で32.0 →120日で166.0

図7 中和試験結果(F1、F4、F5)

【結果】

ELISA抗体は、F2およびF3において接種後21日に全試験群で確認され、付与率はF2で75.8%、F3で96.7%であった。接種後30日にはすべての農場で付与率100%となり、ELISA抗体は調査終了時まで維持された。子豚群全体の接種後日数別の平均S/P値は図に示す通りで、接種後90日または120日まで経時的に上昇した(図4、図5)。中和抗体は、F2およびF3において接種後14日に全試験群で確認され、子豚群全体のGM値はF2で2.4、F3で4.6となり、接種後30日にはすべての農場で付与率100%となった。子豚群全体のGM値の接種後30日から120日までの推移は、F1で43.4→534.7、F2で21.9→189.6、F3で78.8→776.0、F4で70.2→300.9、F5で67.0→406.4となった。また母猪群も接種後30日にはすべての農場で付与率100%となり、接種後30日、120日のGM値はF1で32.0、128.0、F2で17.1、186.8、F4で19.0、117.4、F5で32.0、166.0、F3は150日で348.4となった(図6、図7)。

各試験群の抗体価の推移 (GM値)



- ・ 接種後30日以降で抗体価の上昇率が高い傾向(F2、F3)
- ・ 抗体価は接種後90日または120日まで経時的に上昇

図8 中和試験結果:各試験群の抗体価の推移

次に、各試験群の中和抗体価の推移を図8に示す。中和抗体はF2およびF3において接種後14日で確認され、抗体価は30日まで緩やかに上昇し、その後の上昇率が高い傾向が確認された。また、全試験群で抗体価は接種後90日または120日まで経時的に上昇した。

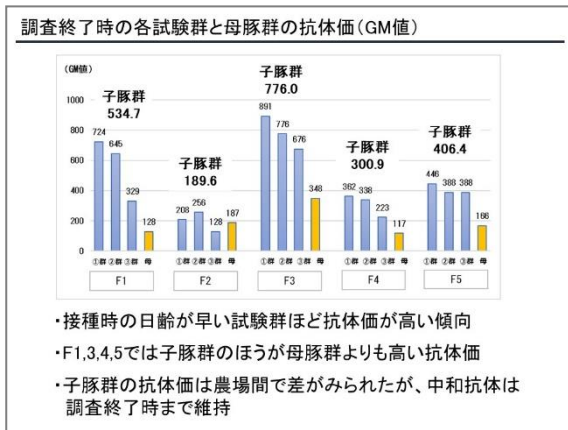


図 9 中和試験結果:調査終了時の各試験群と母豚群の抗体価

続いて、調査終了時(ワクチン接種後 120 日)の各試験群と母豚群の抗体価を図 9 に示す。5 農場中 4 農場(F1、F3、F4、F5)で接種時の日齢が低い試験群ほど中和抗体価が高く、子豚群のほうが母豚群よりも抗体価が高い結果となった。また、子豚群の中和抗体価は農場によって差がみられたが、調査終了時(ワクチン接種後 120 日)まで中和抗体は維持された。なお、本調査中に哺乳期のワクチン接種によると思われる事故はなかった。

【まとめ】

本島北部または南部地域の一貫農場 5 戸(F1~F5)で飼養され、豚熱ワクチンを 1ml/頭で接種した 1 日齢以上の哺乳豚群を対象として免疫付与に関する野外追跡調査を実施した。その結果、哺乳期にワクチン接種した豚群に接種事故はなく、十分な免疫付与が確認された。ワクチン接種時の日齢ごとに試験群を設定し追跡したところ、全試験群で ELISA 抗体は接種後 21 日、中和抗体は接種後 14 日で確認され、いずれも接種後 30 日で付与率 100%となった。また、中和抗体価は接種後 30 日以降で上昇率が高くなる傾向がみられ、90 日または 120 日まで経時的に上昇した。5 農場中 4 農場でワクチン接種時の日齢が早い試験群ほど抗体価が高い傾向がみられ、子豚群のほうが母豚群よりも高い抗体価を示した。農場によって子豚群の抗体価に差はみられたが、抗体は調査終了時まで維持された(図 10)。

【考察】

豚熱に対して全く免疫を持たない母豚へワクチンを接種した後、母豚のワクチン抗体が上昇し、初乳を介して子豚が移行抗体を保有するようになるまでには、母豚の状態や子豚の初乳摂取状況等のさまざまな影響を受け、一定の時間を必要とする。したがって、清浄な段階

まとめ

- ◆哺乳豚群にワクチン接種事故はなく、豚熱の発生なし
- ◆ワクチン接種時の週齢ごとに試験群を設定し追跡した結果、ELISA抗体は接種後21日、中和抗体は14日で確認、免疫付与率は100%となった
- ◆抗体価は接種後30日以降で上昇率が高い傾向がみられ、90日または120日まで経時的に上昇した
- ◆ワクチン接種時の日齢が早い試験群ほど抗体価が高い傾向がみられ、5農場中4農場で子豚群の方が母豚群より高い抗体価を示した
- ◆農場間で子豚群の抗体価に差がみられたが、中和抗体は調査終了時まで維持された

図 10 まとめ

考察

- ◆清浄状態から豚熱が発生した際の予防的ワクチンの使用において、豚群の免疫的空白を最小とするために、移行抗体のない哺乳豚へのワクチン接種は有効
- ◆接種時日齢が早い試験群で抗体価が高い傾向については、若齢ほど免疫系の発達が未熟で、ウイルスの排除が遅く、抗原刺激時間が長くなることが一要因と推察
- ◆子豚群の抗体価に農場間で差がみられる原因は不明だが、品種、栄養状態、他の感染症の有無、衛生管理状況などとの関連性についても検討が必要(調査を予定)
- ◆若齢豚の免疫応答に関連する詳細な報告は数少ないため、今後、評価方法の検討やさらなる解析が必要

図 11 考察

から豚熱が発生した際の緊急的・予防的ワクチンの使用においては、豚群の免疫的空白を最小にし、野外ウイルスを初動で防圧することを目的として、移行抗体を保有しない哺乳豚へのワクチン接種は有効と考えられた。接種時の日齢が早い試験群で抗体価が高い傾向については、若齢ほど免疫系の発達が未熟で、ウイルスの排除が遅く、抗原刺激時間が長くなることが一要因と推察された。子豚群の抗体価に農場間で差がみられる原因は不明だが、品種、栄養状態、他の感染症の有無、衛生管理状況などとの関連性についても検討が必要と思われた。若齢豚の免疫応答に関連する詳細な報告は数少ないため、今後、評価方法の検討やさらなる解析が必要と考える(図 11)。

【謝辞】

哺乳豚への豚熱ワクチン接種および今回の発表に際し、ご指導・ご助言を賜りました北海道大学 迫田義博先生、調査・採材にご協力を頂きました現場の生産者の方々ならびに関係諸氏に深謝致します。

【引用文献】

- [1] 迫田義博：豚熱(Classical Swine Fever：CSF)のすべて,北獣会誌 64, 285-293(2020)
- [2] 笹原二郎：豚コレラ生ワクチン,家畜衛試研究報告 70, 53-55(1975)
- [3] 笹原二郎：豚コレラ生ウイルス予防液の野外応用試験,家畜衛試研究報告 65, 88-106(1970)
- [4] 沢田実：動物用ワクチンの概要と正しい使い方(Ⅱ),2.豚コレラワクチン,日獣会誌 32,698-705(1979)
- [5] 清水実嗣：豚コレラの診断と防疫,Proc Jpn Pig Vet Soc 29, 2-13(1996)
- [6] 清水悠紀臣：日本における豚コレラの撲滅,動衛研研究報告 119, 1-9(2013)
- [7] 動物用ワクチン:その理論と実際,動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会編
- [8] 豚コレラ防疫史,社団法人全国家畜畜産物衛生指導協会, 社団法人畜産技術協会
- [9] 原田熊幸：豚コレラ生ウイルス予防液,日獣会誌 22, 503-510(1969)
- [10] 本川賢司：ワクチン免疫の基礎と臨床-ワクチン効果を上げるものと下げるもの-,J jpn Soci,Clin infect Dis in farm Anim 4(2),39-47 (2009)

8. 沖縄県の豚熱野外症例における病理学的解析

家畜衛生試験場 ○奥村尚子
中央家畜保健衛生所 高木 和香子

【背景と目的】

2018年9月に国内で26年ぶりに発生した豚熱は、野生イノシシや豚で継続的に発生し、本県では2020年1月から3月までに7農場での発生が確認された。県内分離株は2019年1月岐阜イノシシ由来株と最も近縁とされ[1]、2018年以降の国内流行株からの派生株であった。国内流行しているCSFVウイルス(CSFV)株(JPN/1/2018株)は、感染実験の結果、高病原性のALD株と比較して病原性が低いとされる[2]が、野外症例の病理学的検索は不十分である。今回、本県CSFV事例を病理組織学的に解析したので概要を報告する。

【材料と方法】

ウイルス学的検査により豚熱患者と確定した7農場13頭の臓器を用いて、2方法で解析を行った。方法1: 病理解剖で採材したホルマリン固定済み臓器についてヘマトキシリンエオジン染色(HE染色)を実施し、鏡検した。また、扁桃、脾臓、腎臓について抗CSFVモノクローナル抗体(Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, clone WH303)を用いた免疫組織化学的染色(IHC)を実施した。IHCの抗原賦活化処理と一次抗体希釈濃度は、条件検討を行った上、クエン酸バッファー(pH6.0)の加熱処理時間1分、冷却なし、一次抗体は使用する2から4日前に100倍希釈した。方法2: 方法1の結果をもとに、HE標本は病変の程度に応じて、IHC標本は陽性細胞の分布や量に応じて図1の基準を元にスコア化[2,3,4]した。防疫指針[5]に記載のある1~11の特定症状について、解剖豚もしくは同居豚に該当した症状数を評価した。解剖豚の特定症状として1.耳翼、下腹部、四肢等の紫斑 2.斃死。同居豚群も含めた特定症状として、3.40℃以上の発熱、元気消失、食欲減退、パイルアップ 4.下痢、便秘 5.結膜炎、目やに 6.歩行困難、後肢麻痺、けいれん 7.ひね豚(削瘦、被毛粗剛、発育不良) 8.異常産の発生 9.皮下出血、皮膚紅斑、天然孔からの出血、血便 10.突然死 11.白血球数の減少(10,000個/μl未満)を評価した。本県野外症例のスコア結果を、解剖豚の臓器別、日齢別、症状数別、既報の感染実験結果と比較した。スコア比較を行うため、既報の感染実験

例[2,3,6,7]のうちスコア化されていない扁桃、脾臓、腎臓の病変について図1の基準を元にスコアを設定した。

HE	0	1	2	3
扁桃	所見なし	リンパ球の減少	出血・リンパ細胞壊死	陰窩壊死
脾臓	所見なし	限局性の出血・リンパ球の枯渇	出血・リンパ細胞壊死	梗塞構造の消失
腎臓	所見なし	限局性の出血・間質性腎炎	多発性出血・間質性腎炎	梗塞壊死

HE: リンパ球の壊死、組織の出血、病変の局在

IHC	0	1	2	3
扁桃	陰性	限局性の扁桃上皮・マクロファージ・リンパ球	多発性の扁桃上皮・マクロファージ・リンパ球	2・血管内皮
脾臓	陰性	限局性の白脾腫マクロファージ・リンパ球	多発性の白脾腫マクロファージ・リンパ球	2・血管内皮
腎臓	陰性	限局性の尿細管上皮	多発性の尿細管上皮	2・血管内皮

IHC: 陽性細胞数、種類、局在

図1 スコア基準

【結果】

農場概要と認められた特定症状について図2に記す。検体1から5は育成期の個体で、検体6から13は肥育期の個体であった。方法1: 最も頻繁にみられた所見は、扁桃のリンパ球減少(92.3%)、脾臓の出血や白脾髄領域の減少(84.6%)、腎臓間質へのリンパ球やマクロファージの浸潤(69.2%)であった。また検索症例数は少ないが、リンパ節の血液吸収やリンパ球減少(7/7、100%)、回腸パイエル板のリンパ球減少(4/5、80%)、脳血管周囲(4/5、80%)や肝臓グリソン鞘周囲へのリンパ球浸潤(7/7、100%)、化膿性気管支肺炎(7/8、87.5%)や肺のリンパ管拡張(6/8、75%)なども確認された。方法2: スコア化結果とそれぞれの組織写真を図3-9に記す。臓器別では、HE標本における中等度以上の病変の出現率は脾臓、腎臓、扁桃の順に高く、IHCでは扁桃、脾臓、腎臓の順に陽性細胞が多くみられた(図10)。日齢別では、育成豚(30から60日齢)の方が、肥育豚に比べてスコアが高かった。複数の特定症状が確認された個体ほど病変がより重度かつIHCにおける陽性細胞数も多く広範囲にみられ、スコアが高かった(図11)。既報のCSFV4株を用いた感染実験の結果との比較(図12)では、本県症例の14というスコア合計は、中等度病原性株(Wingene'93株)・高病原性株(ALD株とISS/60株)と低病原性株(JPN/1/2018

株)の中間のスコアであった。県内分離株は国内流行株の派生ということを受け、本県症例と2018年の国内分離株の感染実験の結果を比較すると、野外症例である本県症例の方がスコアは高かった。

国内発生	検体No.	経営形態	日齢	状態	摘発経緯	症状番号	症状数
52	1	肥育	60	生	異常豚	3,4,5,10	4
53	2	一貫	約30	死	発生状況検査	1,2,3,8,11	5
	3			生		3,4,11	3
54	4	一貫	50	生	発生状況検査	3,4,11	3
	5			生		3,4,11	3
55	6	肥育	不明	死	異常豚	1,2,6,7,10,11	6
	7			死		1,2,6,7,10,11	6
56	8	肥育	不明	生	異常豚	1,3,4,11	4
	9			生		3,11	2
57	10	肥育	不明	生	異常豚	3,11	2
	11			生		3,11	2
58	12	肥育	不明	生	重点監視農場/ 57例目に隣接	3	1
	13			生		7	1

図2 農場概要と特定症状

国内発生	検体No.	日齢	状態	扁桃		脾臓		腎臓	
				HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC
52	1	60	生	1	2	1	2	2	1
53	2	約30	死	NT	NT	2	3	2	3
	3		生	1	2	1	2	0	1
54	4	50	生	1	3	1	3	1	2
	5		生	1	3	2	2	1	1
55	6	不明	死	NT	NT	2	2	2	3
	7		死	NT	NT	2	2	1	3
56	8	不明	生	0	2	2	1	2	2
	9		生	1	2	2	2	1	0
57	10	不明	生	1	2	3	3	1	1
	11		生	2	2	2	2	1	1
58	12	不明	生	1	1	1	0	0	0
	13		生	1	1	1	0	1	0

NT: 採材なし

図3 扁桃・脾臓・腎臓スコア結果

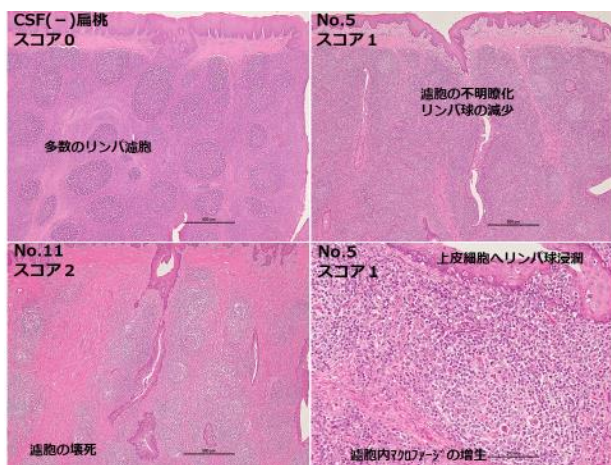


図4 扁桃 HE

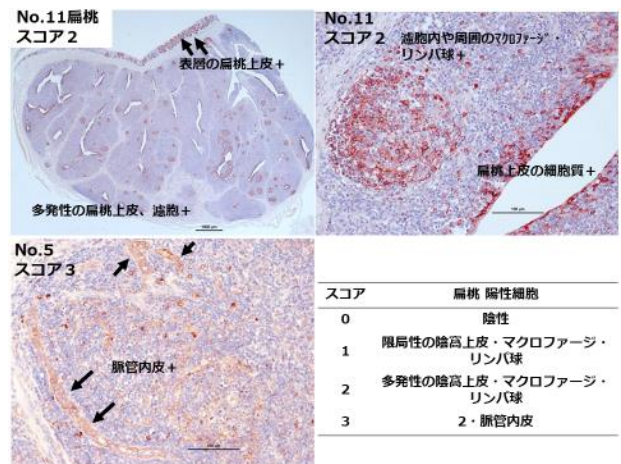


図5 扁桃 IHC

スコア	扁桃 陽性細胞
0	陰性
1	限局性の陰高上皮・マクロファージ・リンパ球
2	多発性の陰高上皮・マクロファージ・リンパ球
3	2・脈管内皮

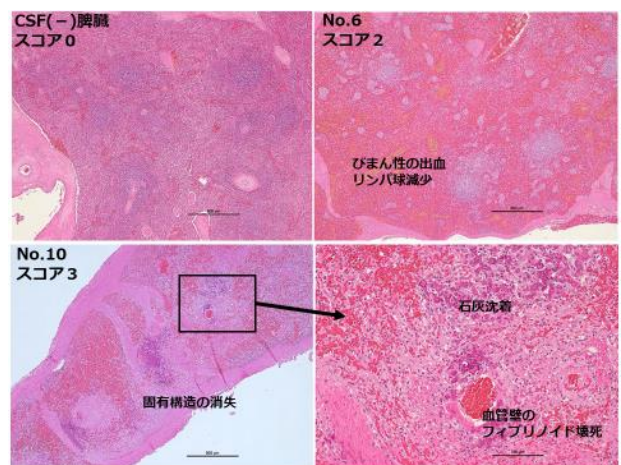


図6 脾臓 HE

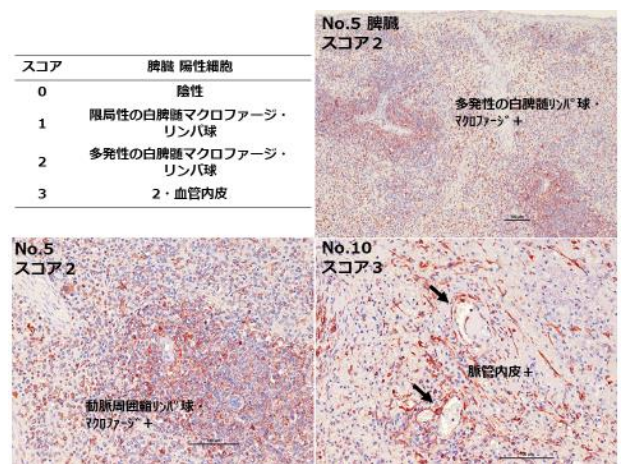


図7 脾臓 IHC

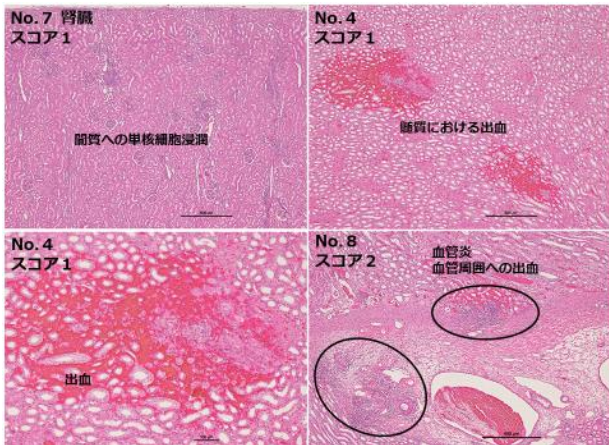


図8 腎臓 HE

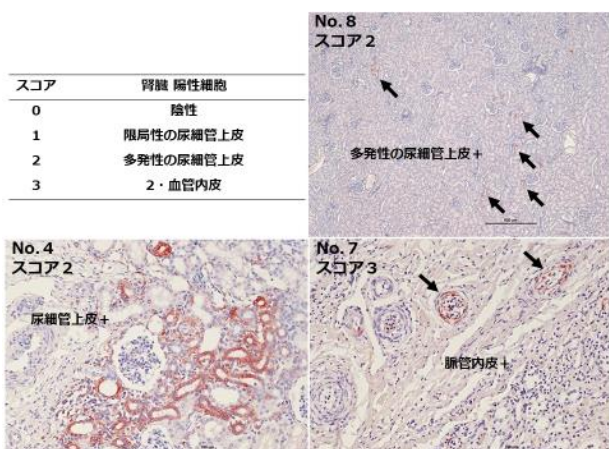


図9 腎臓 IHC

スコア	腎臓 陽性細胞
0	陰性
1	限局性の尿細管上皮
2	多発性の尿細管上皮
3	2・血管内皮

HE	頭数	スコア				数値:頭数	中等度以上の割合(%)
		0	1	2	3		
扁桃	10	1	8	1	0	1	10
脾臓	13	0	5	7	1	8	61.5
腎臓	13	2	7	4	0	4	30.8

◆ 中等度病変の検体数：脾臓>腎臓>扁桃

IHC	頭数	スコア				数値:頭数	中等度以上の割合(%)
		0	1	2	3		
扁桃	10	0	2	6	2	8	80
脾臓	13	2	1	7	3	10	76.9
腎臓	13	3	5	2	3	5	38.5

◆ 陽性細胞が多く広範囲にみられる検体数：扁桃>脾臓>腎臓

図10 臓器によるスコア比較

症状数	頭数	扁桃		脾臓		腎臓		スコア平均
		HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
1-2	5	1.2	1.6	1.8	1.4	0.8	0.4	1.2
3-4	5	0.8	2.4	1.4	2	1.2	1.4	1.5
5-6	3	NT	NT	2	2.3	1.7	3	2.25

◆ 症状が多い方がスコア平均が高い

日齢	頭数	扁桃		脾臓		腎臓		スコア合計
		HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
育成	5	1	2.5	1.4	2.4	1.2	1.6	10.1
肥育	8	1	1.7	1.9	1.5	1.1	1.3	8.4

◆ スコア合計：育成>肥育

図11 臨床症状と日齢によるスコア比較

ウイルス株	頭数	扁桃		脾臓		腎臓		スコア合計
		HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
本県症例 育成(30-60日齢) 52例目分離株	5	1	3	2	3	2	3	14
感染実験 低病原性 JPN/1/2018株	8	1	2	3	2	1	1	10
中等度病原性 Wingene'93株	25	3	3	2	3	2	3	16
高病原性 ALD株	4	3	3	3	3	2	1	15
ISS/60株	25	3	3	2	3	2	3	16

◆ スコア比較

実験 中等度・高病原性CSFV株>本県症例群>実験 低病原性CSFV株

◆ JPN/1/2018株

本県症例(野外科例)は感染実験に比べ組織病変が重度

図12 感染実験結果との比較

【考察】

病変は CSFV の病態機序のとおり、リンパ組織や脾臓に多く形成されていた。高率にみられた所見として、リンパ組織のリンパ球減少・壊死、出血と肝臓、脳、腎臓の脈管周囲のリンパ球主体の細胞浸潤、脾臓や腎臓における小脈管壁の壊死・血管炎などであった。臓器別のスコア比較では、扁桃の HE 病変は他の臓器に比べ軽度だが、IHC での陽性細胞数は脾臓、腎臓に比べ多く、抗原検出に最も適していた。CSFV が体内へ侵入する際、まず扁桃陰窩上皮細胞へ感染し、一次複製が行われ全身へ広がり、リンパ球減少や血管内皮への傷害を引き起こす[8]。扁桃は感染初期から長期間 CSFV が検出できると推察された。脾臓は HE、IHC ともに中等度以上の病変を認める傾向があった。複数の特定症状がある場合や斃死個体では病変が強い傾向がみられた。肥育豚群に比べ、育成豚群(30-60 日齢)の方が、病変は重度であり、愛知県の野外科例における解析結果と類似していた[4]。

既報の様々な病原性の CSFV4 株を用いた感染実験とのスコア比較では、本県症例群は、中等度・高病原性と低病原性の中間のスコアであった。また、本県症例は脳における血管性リンパ球浸潤を認めたが、高病原性の ALD 株感染で見られた神経症状を伴う非化膿性

脳炎[7]は認められなかった。これらのことから、本県で分離された CSFV の病原性は低から中等度と考察した。さらに、国内流行株の感染実験と野外症例とのスコア比較では、野外症例である本県症例スコアが高かった。豚熱では免疫低下から呼吸器や消化管の二次感染のリスクが高まる[8]。病原体の検索は不十分だが、化膿性肺炎が 87.5%に確認されており、本県症例においても、CSFV 感染により免疫力が低下していることに加え、二次感染により病変が重篤化したと考えた。

【引用文献】

- [1] 第 12 回 拡大 CSF 疫学調査チーム検討会資料 (2020)
- [2] Kameyama, K., Nishi, T., *et al.* : Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in Japan for the first time in 26 years. The Journal of Veterinary Medical Science, 81, 1277-1284(2019)
- [3] 山田学: 令和元年度病性鑑定病理部門研修 講義資料(2019)
- [4] 杉江健之助ら: 令和元年度 愛知県畜産技術業績発表会集録(2019)
- [5] 豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針(2020)
- [6] Belák, K., Koenen, F., *et al.* : Comparative studies on the pathogenicity and tissue distribution of three virulence variants of classical swine fever virus, two field isolates and one vaccine strain, with special regard to immunohistochemical investigations. Acta Veterinaria Scandinavica, 50, 34(2008)
- [7] Narita, M., Kawashima, K., *et al.* : Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. Vet Pathol, 37, 402-408(2000)
- [8] Blome, S., Staubach, C., *et al.* : Classical Swine Fever – An updated review. Viruses, 9, 86(2017)

9. Clostridium novyi感染が疑われた肥育豚急死の一例

中央家畜保健衛生所

○岩垣つぐみ、荒木美穂

【 Clostridium novyi について】

Clostridium novyiは偏性嫌気性菌で、芽胞を形成するグラム陽性桿菌である。豚での発生は少ないという報告もあるが、家畜が感染すると突然死を引き起こす。

病性鑑定の際、突然死、と聞いてまず注意しなければならない疾病として、昨年沖縄で発生した豚熱（以下CSF）、及び近隣諸国で発生しているアフリカ豚熱（以下ASF）があり、これらの疾病の発生リスクは依然として高く、鑑別と早期の原因究明が必要である。（図1）

今回、突然豚が大量に死亡したとの通報から病性鑑定を行い、C.novyi感染が疑われた事例が発生したので、その概要について報告する。

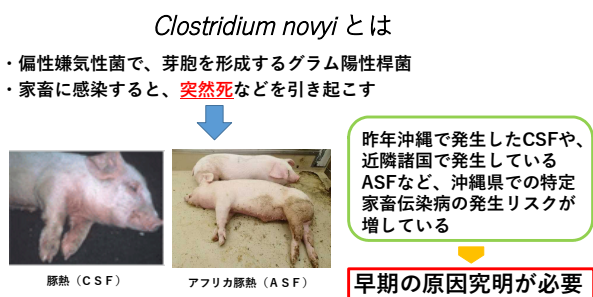


図 1

【農家概要と発生経緯】

当該農家は約700頭を飼養する南部の肥育預託農家である。八重山地域から1～2ヶ月に1回程度の導入があり、今回の対象豚は6月に3ヶ月齢で導入、同ロットが現在順次出荷中であった。

令和2年10月、前日の夜まで異常の無かった約7ヶ月齢の肥育豚が、朝26頭死亡していると連絡があった。別豚舎では豚赤痢の発生があったが、同じ豚舎の生存豚に活力低下などの異常はなく、投薬歴もなかった。なお、6月に導入後CSFワクチンは接種済みである（図2）

農家概要と発生経緯

【当該農家】 南部の肥育預託農家（1100頭規模、約700頭飼養）

【導入状況】 八重山地域の繁殖農場から導入（6月、8月、10月、11月）
同ロットが順次出荷中 約3ヶ月齢で導入

【発生状況】 令和2年10月、前日夜まで異常の無かった肥育豚（約7ヶ月齢）が、26頭死亡
別豚舎にて豚赤痢の発生があるが、生存豚に異常なし

【ワクチン・投薬歴】 投薬歴無し
6月末にCSFワクチン接種

図 2

図3は、豚舎の配置と発生時の豚房の状況である。全2棟から構成されており、死亡したのは全て1号豚舎だった。1号豚舎の内部は3列になっており、死亡豚がいた豚房をオレンジで示している。

1豚房あたりの飼養頭数と、死亡頭数は図に示す通りで、また、採血をした豚と解剖した豚のいた豚房を青と赤の矢印で示している。

農場概要

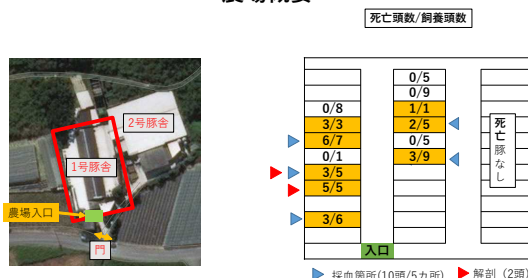


図 3

【CSF、ASF関連検査】

今回は突然死と大量死ということで、優先してCSF、ASF検査を行った。（図4）

材料は同居豚10頭の血清とEDTA加血液、死亡豚2頭（No.11、No.12）である。

まずは同居豚のEDTA加血液で血液検査を行い、特に白血球数について確認を行った。結果は142～361×10²/μlで、白血球数の減少は認められなかった。次に同居豚の血清と、死亡豚の扁桃、脾臓、腎臓を家衛試に搬入、PCR検査を実施した。結果、血清、臓器共に全て陰性だった。

これにより、CSF、ASFの可能性は否定されたため、一般病鑑として残りの検査を継続した。

CSF・ASF関連検査

材料
同居豚10頭の血清、EDTA加血液 (No.1~No.10)
死亡豚2頭 (No.11、No.12)

◎血液検査 (白血球数)
⇒142~361×10²/μlで白血球数減少無し

◎PCR検査
同居豚の血清、死亡豚の扁桃、脾臓、腎臓
? 血清、臓器全て陰性

CSF、ASFの可能性否定

図 4

【病理解剖検査】

解剖は定法に乗っ取り実施した。2頭の外貌所見は口、鼻孔からわずかな出血、泡沫多量と腹部膨満があり、チアノーゼはなかった。解剖所見では、共通して肝臓の融解と肝被膜下に泡沫ガスが認められた。(図5)

病理解剖検査

外貌所見：口、鼻孔からわずかな出血、泡沫多量と腹部膨満、チアノーゼなし
解剖所見：肝臓の融解と肝被膜下に泡沫ガス
No.11：右肺うっ血水腫、結腸粘膜に潰瘍 (赤矢印)
No.12：肺水腫、胃粘膜一部充血

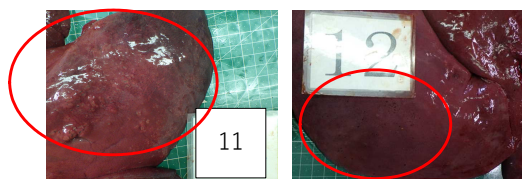


図 5

また、No.11では右肺うっ血水腫、結腸粘膜に潰瘍があり、No.12では肺水腫、胃粘膜に一部充血があった。(図6)

病理解剖検査

外貌所見：口、鼻孔からわずかな出血、泡沫多量と腹部膨満、チアノーゼなし
解剖所見：肝臓の融解と肝被膜下に泡沫ガス
No.11：右肺うっ血水腫、結腸粘膜に潰瘍 (赤矢印)
No.12：肺水腫、胃粘膜一部充血

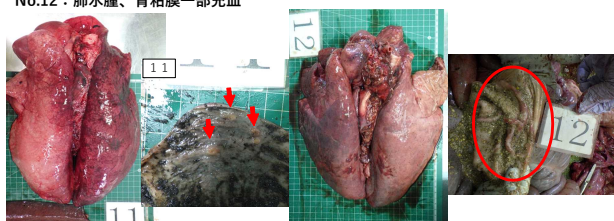


図 6

【細菌検査】

主要臓器は羊血液寒天培地で好気及び嫌気培養、さらに肺はチョコレート寒天培地でCO₂条件下にて培養

した。また、各臓器の10%乳剤からDNAを抽出し、悪性水腫と気腫の原因菌6種類について、PCR検査を実施した。十二指腸内容は卵黄加CW寒天培地で嫌気条件下にて定量培養した。(図7)

方法【細菌検査】

	主要臓器	肺	十二指腸内容
No.11 No.12 (解剖)	羊血液寒天培地/好気、嫌気 10%乳剤からDNAを抽出、悪性水腫、 気腫の原因菌6種のPCR検査	チョコレート 寒天培地/CO ₂	卵黄加CW寒天培地 /嫌気 (定量)

図 7

【細菌検査結果】

No.11の肺から*Esherichia coli*、*Clostridium perfringens*、*Streptococcus dysgalactiae ssp equisimillis*、No.12の肺から*Pauteurella multocida*を分離した。PCR検査では、No.11の肝臓で*C.novy*B型陽性、No.12の心臓で*C.novy*A型陽性だった。No.12の十二指腸内容からは*C.perfringens*が2.1×10⁶/g分離された。(図8)

結果【細菌検査】

	主要臓器		十二指腸内容
	分離培養	PCR	
No.11	肺: <i>Esherichia coli</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>ssp equisimillis</i>	肝: <i>C.novy</i> B型 陽性	非分離
No.12	肺: <i>Pasteurella multocida</i>	心: <i>C.novy</i> A型 陽性	<i>C.Perfringens</i> (2.1×10 ⁶ /g)

図 8

【病理組織検査】

No.11ではグラム陽性大桿菌を伴う多臓器における空胞形成、および水腫、出血を伴う心筋壊死、肺水腫が認められた。No.12では化膿性間質性肺炎と、グラム陽性大桿菌を伴う肝臓及び脾臓の空胞化があり、2頭ともに複数臓器からグラム陽性大桿菌が認められた。大量に急死している発生状況、解剖所見、細菌検査、病理組織検査の結果より、*C.novy*感染症疑いと診断した。

病理組織検査 (No.11)

組織診断名：グラム陽性大桿菌を伴う多臓器における空胞形成および水腫、出血を伴う心筋壊死、肺水腫

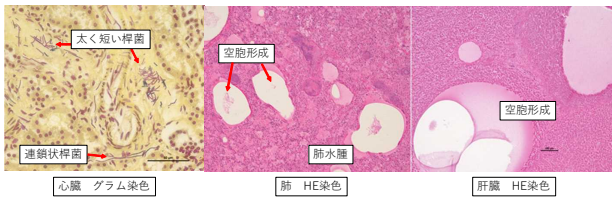
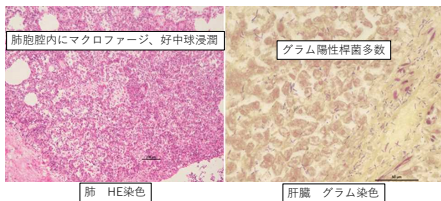


図 9

病理組織検査 (No.12)

組織診断名：化膿性間質性肺炎、グラム陽性大桿菌を伴う肝臓および脾臓の空胞化



【診断】発生状況、解剖所見、細菌検査、病理組織検査より Clostridium novyi 感染症疑い

図 10

【追加病鑑】

その後、以前より豚赤痢の発生があったが、それが原因ではない死亡が続いているとの再度連絡が入り、約1ヶ月後の11月末に再度立ち入りした。農場からの提供資料より、直近1年の死亡頭数の状況は図11に示すとおりで、月平均28.5頭死亡していた。豚赤痢は令和2年2月頃から続いており、治療で回復する個体もいるが発育不良個体も散見されているとのことだった。今回は2号豚舎から、立ち入りした日の死亡豚2頭と発育不良豚1頭の解剖、及び同居豚10頭の採血、死亡豚を含めた5頭分の糞便を採材した。(図11)

病鑑②

その後、豚赤痢が原因ではない死亡が続いている

➡ 令和2年11月、再立ち入り

死亡頭数状況 (月平均28.5頭)

	令和元年		令和2年										
月	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
頭数	19	6	8	25	42	13	30	28	55	35	27	45	38

病鑑②材料
死亡豚2頭 (A,B) (10月、11月導入各1頭) 4ヶ月齢
発育不良豚1頭 (C) (11月導入) 4ヶ月齢
血清同居豚10頭 (10月、11月導入) 4ヶ月齢
糞便5頭分



図 11

【糞便検査】

暗視野顕微鏡では、6頭中3頭でスピロヘータ、1頭でバランチジウムが確認された。また、PCR検査では豚

赤痢が4頭陽性、Lawsonia intracellularisが3頭陽性だった。C.perfringensは全頭陰性だった。これにより、血便の原因は豚赤痢とLawsonia intracellularisの関与が示唆された。

病鑑②結果 (糞便検査)

採材No.	便性状	暗視野鏡検 スピロヘータ/バランチジウム	豚赤痢 PCR	増殖性腸炎 (Lawsonia intracellularis) PCR	C. perfringens
同層1	粘血便	+++/-	+	+	-
同層2	粘血便	+++/-	+	+	-
同層3	粘血便	+/+	+	-	-
解剖A (死亡)	結腸内容 暗赤色水様	NT	+	-	-
解剖C (発育不良)	正常便	-/-	-	+	-

図 12

細菌検査では死亡豚Aの複数臓器からS.dysgalactiae ssp equisimilis、Bでは肺からActinobacillus pleuropneumoniaeが分離された。家衛試で実施した病理組織検査では、A、Bともに複数臓器からグラム陽性大桿菌を伴う空胞形成が認められ、Clostridium属菌感染症と診断された。

前回同様にC.novyiのPCR検査を実施したところ死亡豚A,Bの複数臓器でC.novyiB型が陽性だったが、生体だったCについては陰性だった。よって、死亡についてはC.novyiの関与が疑われる結果となった。

病鑑②結果-2

採材	主な解剖所見 (一部)	細菌検査	病理組織検査	C. novyi B型 PCR
A (死亡)	肝充出血 結腸充出血	脳心肺肝腎: S. dysgalactiae ssp equisimilis 脾: Clostridium beijerinckii/butyricum	Clostridium属菌感染症 細菌性肺炎	脳心肺肝腎 +
B (死亡)	肺胸膜線維素析出	肺: Actinobacillus pleuropneumoniae	Clostridium属菌感染症 豚胸膜肺炎	心肝腎 +
C (発育不良)	肺左前葉モザイク 状肝変化	有意菌非分離	豚胸膜肺炎 肺等で抗App2型抗体陽 性あり	-

図 13

【まとめ】

10月に発生した大量急死は感染経路は不明だが、C.novyi感染症の疑いがあることがわかった。さらに数ヶ月にわたって続いている死亡数の増加についても、C.novyi感染症が原因である可能性が示唆された。年間の死亡数と比較すると解剖頭数が少ないため、不確定ではあるが、豚赤痢などの感染状況によってC.novyi感染症が発症し死亡するのではないかと推察された。この農場では、豚舎の隣にある雨水を貯水するため池

の水を、豚の飲用水と豚舎の清掃に利用してるが、消毒が不十分であることがわかった。よって、発生の一因である可能性があると考えている。(図14)

まとめと考察

- ・大量に急死した原因は、*C.novyi* 感染症の疑い（感染経路不明）
- ・数ヶ月にわたって続いている死亡数の増加についても *C.novyi* 感染症の関与
- ・豚赤痢など、ほかの疾病の感染状況によって *C.novyi* 感染症が発症している可能性
- ・*C.novyi* 感染症発生要因としては、豚舎の横にある雨水を貯水するため池の水を、豚の飲用水と豚舎の清掃に利用しているが、消毒が不十分でありこれが一因の可能性



図 14

