

CSF 野外感染症例における病理組織学的考察

中央家畜保健衛生所 すぎえけんのすけ 杉江建之介 こまつてつや 小松徹也

【はじめに】

平成 30 年から国内で CSF が継続発生しており、愛知県では令和 2 年までに 18 例の発生を経験した。流行している CSF ウイルス (CSFV) は高病原性の ALD 株と比べて低病原性であり、臨床症状に乏しい報告がされている [1]、そのため発見の遅延につながり、農場に CSFV の侵入後 1 ヶ月以上経過してから摘発される事例も少なくない [2]。

しかしながら野外症例において病理組織学的に十分な検索はされておらず、野外の病態については不明な点が多い。そこで、県内 CSF 発生農場の検体を病理組織学的に評価及び比較したので、概要を報告する。

【材料及び方法】

(1) 材料

県内の CSF 発生農場のうち、PCR 及び RFLP 検査により臓器乳剤から CSFV 遺伝子が検出された 10 農場 20 頭の豚の扁桃・脾臓・腎臓を供した。

(2) 方法

材料をホルマリン固定後、定法により HE 染色及び抗 CSFV 抗体 (APHA SCIENTIFIC、UK、×100 で使用) を用いた免疫組織化学 (IHC) 染色を実施して標本を作製した。標本を鏡検後、観察された組織病変をスコアにより評価した。スコアは CSF の病理発生機序、既報文献や感染実験でみられた病変 [1, 3, 4, 5] を参考とし、HE 染色及び IHC 染色について、それぞれ 0~3 の 4 段階で評価した。HE では病変の程度により、IHC では抗原の分布により評価し、どちらも数値が上がるにつれて重度になるように設定した (表 1、図 1~6)。

表 1 病変スコア

HE				
	0	1	2	3
扁桃	著変なし	リンパ球の枯渇	出血・リンパ濾胞壊死	陰窩の壊死
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	著変なし	限局性の出血・間質性腎炎	出血・間質性腎炎	壊死
IHC				
	0	1	2	3
扁桃	陰性	限局性の扁桃上皮・マクロファージ陽性	多発性の扁桃上皮陽性・マクロファージ陽性	2+血管内皮細胞陽性
脾臓	陰性	限局性の白脾髄マクロファージ陽性	多発性の白脾髄マクロファージ陽性	2+血管内皮細胞陽性
腎臓	陰性	限局性の尿細管上皮陽性	多発性の尿細管上皮陽性	2+血管内皮細胞陽性

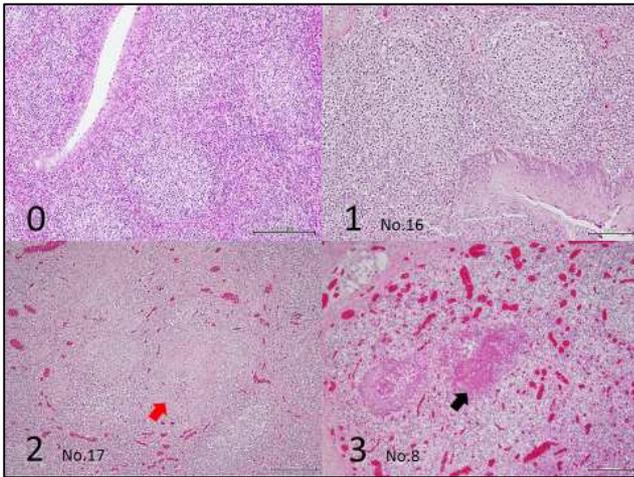


図 1 扁桃 (HE 染色)

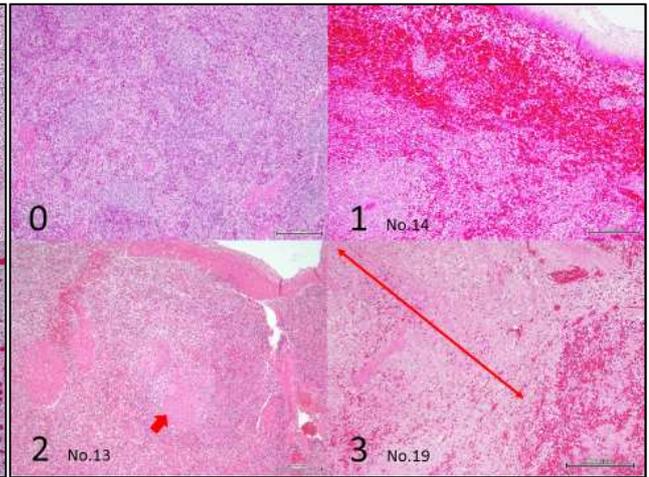


図 2 脾臓 (HE 染色)

スライド内数字 (太字) はスコア値を示す

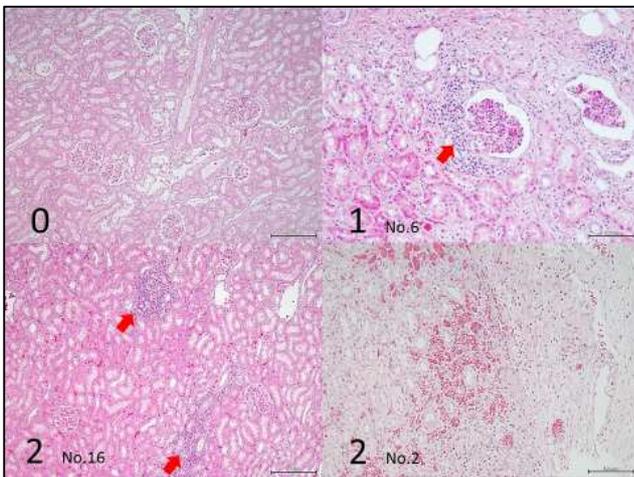


図 3 腎臓 (HE 染色)

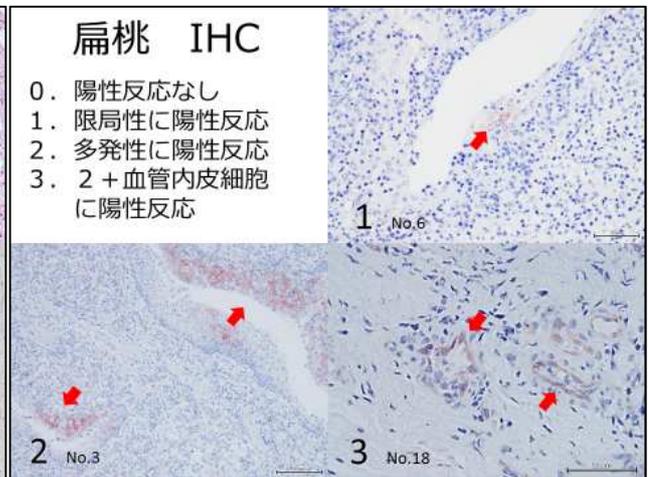


図 4 扁桃 (IHC 染色)

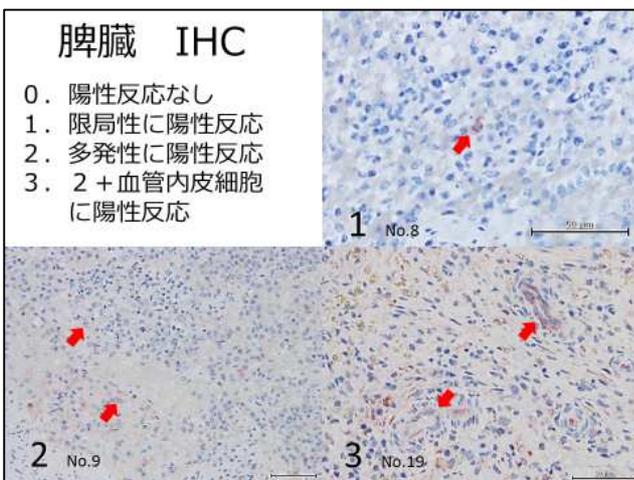


図 5 脾臓 (IHC 染色)

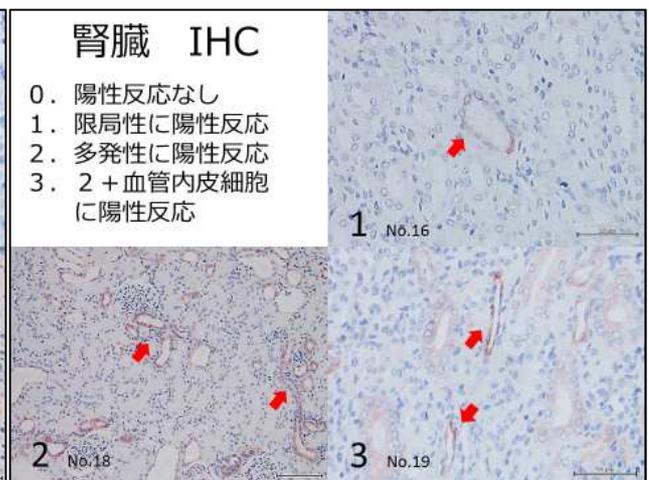


図 6 腎臓 (IHC 染色)

作成されたスコアを用いて、以下のとおり比較した。

①臓器差

HE 染色と IHC 染色それぞれにおいて、扁桃・脾臓・腎臓に病変スコア差がみられるか比較した。

②日齢差

検体をステージにより 6 群（哺乳豚：0-30、育成豚：30-90、肥育前期：90-120、肥育後期：150-210、繁殖豚）に分類し、群間での病変スコア差を比較した。

③臨床症状

検体を症状により 3 群（無症状、死亡以外の特定症状、死亡）に分類し、群間での病変スコア差を比較した。

④他の CSFV 株との比較

中等度～高病原性 CSFV ウイルス株 [1, 3] と本症例群の病変スコア及び臨床症状の差を比較した。なお、本症例群について、既報文献と同日齢の群で比較している。

⑤実験感染データとの比較

本症例群と同程度の病原性をもつと考えられる 1/JPN/2018 株の実験感染データ [5] と本症例群の病変スコア及び臨床症状の差を比較した。なお、本症例群について、実験感染と同日齢の群で比較している。

【結果】

病変スコアを表 2 に記す。

①臓器差

HE 染色において脾臓 > 扁桃 > 腎臓の順に中等度～重度病変が多くみられた。一方、IHC 染色では扁桃 > 脾臓 > 腎臓の順に陽性抗原が多くみられた（図 7）。

②日齢差

哺乳期及び離乳期の豚群において病変スコアが高値になる傾向がみられた（図 8）。

③臨床症状

無症状の豚群に比べ、特定症状を示す豚及び死亡豚において、脾臓及び腎臓の病変スコアが高値になる傾向がみられた。しかしながら、無症状の豚群においても一部は病変がみられた（図 9）。

④他の CSFV 株との比較

病変スコアでは、高病原性及び中等度病原性 CSFV 株に比べ、本症例群の方が低値を示した。また、本症例群では死亡に至らない豚もみられ、臨床症

状は軽度であった（図 10）。

⑤ 実験感染データとの比較

病変スコアでは本症例群は低病原性実験感染群に比べ同等かやや高値を示した。臨床症状では、実験感染群では特定症状のみである一方、本症例群では一部で死亡がみられた（図 11）。

表 2 検査結果一覧

No.	日齢	症状	スコア						合計
			扁桃		脾臓		腎臓		
			HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
1	14	死亡	3	2	2	2	2	2	13
2	14	死亡	NT ^{a)}	NT	1	2	2	2	7
3	100	死亡	0	2	1	2	0	0	5
4	160	なし	2	2	2	0	0	0	6
5	160	なし	2	2	2	1	1	0	8
6	210	なし	2	1	1	0	1	0	5
7	90-120	元気消失	2	1	2	0	1	0	6
8	60-90	死亡	3	2	2	1	1	0	9
9	90-100	死亡	- ^{b)}	2	2	2	0	0	6
10	120	死亡	3	1	2	1	1	1	9
11	120	死亡	2	2	2	1	2	0	9
12	120	死亡	-	1	1	0	0	0	2
13	120	死亡	-	1	2	0	1	0	4
14	2歳	なし	1	2	1	1	0	0	5
15	150	発熱	1	2	2	1	1	0	7
16	150	なし	1	2	2	2	2	1	10
17	150	発熱	2	1	2	0	1	0	6
18	14	発熱、チアノーゼ	3	3	2	2	2	2	14
19	14	消瘦、死亡	0	2	3	3	1	3	12
20	30	発疹	NT	NT	2	2	2	1	7

a)採材なし、b)死後変化が強く判定不可

結果：臓器差による比較 数値：個体数

HE	検体数	スコア				
		0	1	2	3	2-3
扁桃	15	2	3	6	4	10
脾臓	20	0	5	14	1	15
腎臓	20	5	9	6	0	6

中等度～重度病変のみられた検体数：脾臓 > 扁桃 > 腎臓

IHC	検体数	スコア				
		0	1	2	3	1-3
扁桃	18	0	6	11	1	18
脾臓	20	6	6	7	1	14
腎臓	20	13	3	3	1	7

陽性反応のみられた検体数：扁桃 > 脾臓 > 腎臓

図 7 臓器差による比較結果

結果：日齢差による比較 数値：平均値

検体	ステージ	頭数	扁桃		脾臓		腎臓		スコア合計
			HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
哺乳豚	0-30	2	1.5	2.5	2.5	2.5	1.5	2.5	13.0
育成豚	30-90	4	3.0	2.0	1.8	1.8	1.8	1.3	9.0
肥育前期	90-120	7	1.8	1.4	1.7	0.9	0.7	0.1	5.9
肥育後期	150-210	6	1.5	1.7	1.8	0.7	1.0	0.2	6.8
母豚	2歳	1	1.0	2.0	1.0	1.0	0	0	5.0

図 8 日齢差による比較結果

結果：臨床症状による比較								
数値：平均値								
検体		扁桃		脾臓		腎臓		スコア合計
症状	頭数	HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
なし	4	1.8	1.8	1.5	0.5	0.5	0	6.0
発熱 元気消失 チアノーゼ	5	1.8	1.8	2.0	1.0	1.4	0.6	8.6
死亡	11	1.8	1.7	1.8	1.5	1.1	0.8	7.5

図 9 臨床症状による比較

結果：既報のCSFV株との比較									
数値：最大値									
検体			扁桃		脾臓		腎臓		スコア合計
ウイルス株	頭数	症状	HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
本症例群 (育成 30-90)	4	発疹 チアノーゼ 死亡	3	2	2	2	2	2	13
高病原性 ALD株 実験感染	4	死亡 (5日目~)	3	3	3	3	2	1	15
中等度病原性 Wingene'93株 実験感染	25	死亡 (10日目~)	3	3	3	3	2	3	17
低病原性株 JPN/1/2018株 実験感染	8	発熱 元気消失	1	2	3	2	1	1	10

組織病変：本症例群 < 中等度・高病原性CSFV株
臨床症状：本症例群 ≤ 中等度・高病原性CSFV株
⇒ 県内流行CSFVは低病原性

図 10 他の CSFV 株との比較

結果：既報のCSFV株との比較									
数値：最大値									
検体			扁桃		脾臓		腎臓		スコア合計
ウイルス株	頭数	症状	HE	IHC	HE	IHC	HE	IHC	
本症例群 (育成 30-90)	4	発疹 チアノーゼ 死亡	3	2	2	2	2	2	13
高病原性 ALD株 実験感染	4	死亡 (5日目~)	3	3	3	3	2	1	15
中等度病原性 Wingene'93株 実験感染	25	死亡 (10日目~)	3	3	3	3	2	3	17
低病原性株 JPN/1/2018株 実験感染	8	発熱 元気消失	1	2	3	2	1	1	10

組織病変：本症例群 ≥ 感染実験データ
臨床症状：本症例群 > 感染実験データ
⇒ 野外感染では実験感染に比べ病態進行

図 11 実験感染データとの比較

【考察】

臓器差では、HE 染色と IHC 染色ではスコアの順列が異なっていた。扁桃では IHC で多数の陽性抗原が検出されたものの、重度病変のみられた検体数は少なかった。CSFV が体内に侵入すると最初に扁桃で一次複製が行われる[6]。また、感染実験では、CSFV が感染初期から慢性期まで長期間かつ多数検出されている[3, 4]。同様に、本研究においても扁桃では他の臓器に比べ、また病変形成度合に比べ陽性抗原が多く検出されたと考えられた。

脾臓は血管及びリンパ管の集合する臓器であり、CSF はリンパ球枯渇や血管障害を主徴とする[6]。本研究では、脾臓では IHC 陽性抗原が比較的少ないものの血管内皮細胞にも陽性反応がみられ、広範囲の出血や梗塞といった重度病変を形成する傾向がみられた。そのため本症例群でも CSF による血管病変に起因した脾臓病変が強く出たと考えられた。

腎臓では、明らかに病変及び陽性抗原は少なかった。CSF では、腎臓の点状出血等軽度病変は頻発してみられるものの、壊死等の重度病変は慢性経過や病

態が進行すると形成される[6]。このことから、本症例群は急性経過または低病原性のため病態が進行せずに摘発されているケースが多いと考えられた。

日齢差では、成豚に比べ若齢豚で病変形成度合が強くみられた。哺乳～離乳期は免疫が十分に発達しておらず、CSFVを含めた様々な病原体に感染しやすく、病態も進行しやすい。また、CSFでは免疫低下が起きるため、二次感染のリスクが高くなる[7]。本症例群では、二次感染について十分な検討はできていないが、少なくとも若齢豚でCSFの病態が進行していると考えられた

中等度～高病原性CSFV株に比べ、本症例群は組織病変と臨床症状ともに発現程度は低く、国内流行株の低病原性を支持する結果となった。また、国内流行株の実験感染群に比べ、本症例群は組織病変と臨床症状ともに同等かやや重度であった。これは、野外感染ではCSFV以外の病原体や環境ストレスなど他の要因により重度化している可能性が考えられた。しかしながら野外感染では感染してからの日数や暴露されたウイルス量が不明であるため正確な比較はできておらず、今後さらなる調査が必要である。

【まとめ】

本研究では、野外症例においてCSFがどのような病態を示すかを調査した。調査の結果、流行しているCSFVは低病原性であるが、野外では他の病原体や環境ストレスなどにより病変及び症状を発現している可能性が考えられた。肥育豚や母豚などの成豚では症状は顕著でない一方、免疫発達の未熟な若齢豚で感染すると症状は強く表れる傾向にあり、他ステージの豚群に比べ摘発されやすくなる可能性がある。また、個々の農場の他病原体の有無や飼育環境によって病変進行に伴う症状の発現程度は左右される可能性があり、そのため農場によって摘発の速さが変わるものと考えられる。

課題として感染時期の追求が挙げられる。野外症例では感染時期が不明であり、同じ条件での比較は困難である。おおよその感染時期を推定する方法としてELISA検査による抗体保有状況の調査を試みたが、死亡豚では採血が困難であるため調査可能な豚は生存豚のみに限られ、本症例群の傾向を反映できるデータとはならなかった。

今後、調査していない症例についても精査し、さらに二次感染の有無やリアルタイムPCRによるウイルス量の計測等を実施することで、感染時の状況を明らかにしていき、さらなる調査をすすめたい。

最後に、本研究にあたり多大なるご指導及びご助言をいただいた農研機構動物衛生研究部門 山田学先生に深謝する。

参考文献

- [1] Kameyama, K., Nishi, T., Yamada, M., Masujin, K., Morioka, K., Kokuho, T. and Fukai, K. 2019. Experimental infection of pigs with a classical swine fever virus isolated in Japan for the first time in 26 years. *J. Vet. Med. Sci.* 81(9):1277-1284.
- [2] 農林水産省 拡大豚コレラ疫学調査チーム. 2019. 豚コレラの疫学調査に係る中間取りまとめ.
- [3] Belák, K., Koenen, F., Vanderhallen, H., Mittelholzer, C., Feliziani, F., De, Mia, G., M. and Belák, S. 2008. 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(1):34.
- [4] Narita, M., Kawashima, K., Kimura, K., Mikami, O., Shibahara, T., Yamada, M. and Sakoda, Y. 2000. Comparative immunohistopathology in pigs infected with highly virulent or less virulent strains of hog cholera virus. *Vet. Pathol.* 37(5):402-408.
- [5] 山田学. 2019. 令和元年度病性鑑定病理部門研修 講演資料.
- [6] Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J. and Beer, M. 2017. Classical Swine Fever - An updated review. *Viruses.* 9(4):86.
- [7] Depner, K., R., Lange, E., Pontrakulpipat, S. and Fichtner, D. 1999. Does porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentiate classical swine fever virus infection in weaner pigs?. *Zentralbl Veterinarmed B.* 46(7):485-491.