

CSF 診断における白血球測定の有用性の検討と課題

中央家畜保健衛生所 こまつてつや 小松徹也・すぎえけんのすけ 杉江建之介

【はじめに】

日本では平成 30 年に岐阜県で 26 年ぶりに豚熱 (Classical Swine Fever: CSF) が発生した。感染は広がり、平成 31 年 2 月に本県においても CSF が発生し、その後発生が続いた。令和元年 10 月に一度、県内の移動制限が全て解除され、同月より CSF ワクチンの全農場接種が始まった。しかし 11 月、12 月にワクチン接種農場においても CSF の発生が認められた。

CSF は CSF ウイルス (CSFV) による豚の伝染病である。CSF の症状は感染したウイルスの病原性により異なるが、発熱、食欲不振、元気消失、チアノーゼ、白血球減少症といった臨床症状 (特定症状) を示し、病原性が強い場合は致死率が高い¹⁾。一方、近年日本で流行しているウイルス株は病原性が低いと報告されている²⁾。

農場主が CSF を疑うような特定症状を示す豚 (異常豚) を発見した場合、最寄りの家畜保健衛生所 (家保) に通報する。通報を受けた家保職員は農場で臨床検査を行い、症状を確認する。管理失宜等で CSF が明確に否定できない場合は、異常豚のほか、周辺の豚 10 頭程度の採血を行い、検査を実施する。死亡豚がいる場合は、扁桃、脾臓、腎臓を採材し、検査を行う。検査内容は、白血球数 (WBC) の測定、核の左方移動、PCR、ELISA を実施し、死亡個体がいる場合は、合わせて蛍光抗体検査 (FA) も行う。PCR で陽性となった場合は、RFLP により CSFV と他のペスチウイルスとの鑑別を行う。最終的に PCR 産物を動物衛生研究部門でシーケンス解析を実施することで確定診断となる。CSF が継続的に発生している場合、感染個体の臓器を材料とした PCR 陽性又は FA 陽性で疑似患畜となるが、診断までにおよそ 6 時間を要する。疑似患畜に確定するまで防疫作業開始の準備は進まず、防疫措置の遅れにつながる可能性がある。仮に陰性であった場合でも、多くの職員が待機することになり、多大な費用を要する。

CSF 感染における WBC の減少は、過去に多数の報告がある^{1), 2), 3)}。この特徴的な WBC の減少は、感染 3 日後の発熱とともに、または臨床症状がない潜伏期間であっても起きることがわかっている^{2), 3)}。杉村らは白血球の変化が CSF の総合判断をするうえで重要と論じているが、WBC 測定が CSF の生前診断をするうえで、統計学的に有用性を調べた報告はない。そこで本県の CSF 発生に伴い蓄

積したデータを用いて、WBC 測定の簡易検査としての有用性を検討した。さらにワクチン接種による CSF 罹患豚における WBC の変化と、WBC 測定の課題についても検討した。

【材料及び方法】

(1) 材料

・発生状況及び清浄性確認検査に供された正常豚の血液（2172 頭）を用いて、ステージ別（哺乳 0-23 日齢、離乳-育成 24-80、肥育 81-180、母豚、種豚）での豚の WBC の正常値について調査した。

・異常豚検査に供された特定症状を示す豚とその周辺豚（異常豚群）の血液（629 頭）を用いて、CSF 罹患による WBC の変化と感度（Se）と特異度（Sp）を検討した。この時、PCR 陽性を真の陽性と定義した。また既述の血液のうち、CSF 発生農場の異常豚群の血液から発生農場の異常豚群の有病率（TP）、つまり PCR 陽性率を求めた。さらに、これらの結果をもとに、以下の計算式から、Cut off 値を指針の 10000 とした場合の、群の感度（少なくとも 1 頭が検査陽性である確率）と、95%の確率で CSF を摘発できる必要検査頭数（N）を求めた。さらに有病率を低く 10%と仮定した場合の必要検査頭数も同様に求めた。

群の感度 = $1 - (1 - AP)^N > 0.95$

AP（見かけの有病率） = $TP \times Se + (1 - TP) \times (1 - Sp)$

・ワクチン接種済み発生農場の異常豚検査及び発生農場疫学検査の血液（83 頭）を用いて、ワクチン接種が WBC の変化と Se と Sp に与える影響を検討した。

(2) WBC 測定

全ての WBC 測定は、XN-1000V（sysmex）、pocH-100i V（sysmex）を用いて実施した。

(3) 統計学的処理と ROC 解析

有意差検定は統計ソフト（EZR）を利用し、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。Receiver Operating Characteristic Curve（ROC 曲線）解析も EZR にて実施した。

【結果】

(1) 農場レベルでの豚のステージ別 WBC 正常値

合計例数: 2159					
分類	哺乳	離乳-育成	肥育	母豚	種豚
日齢	0-23	24-80	81-180	—	—
平均値	10220	19797	20905	14950	17297
中央値	10135	19440	20600	14160	18625
標準偏差	5931	5891	5531	4371	3491
標準誤差	417	245	212	167	1104
例数	202	580	681	686	10
	*1	*1	*1	*1	*1
*数字の項目間で有意差あり (Kruskal-Wallis検定)		*2	*2	*2	*2
			*3	*3	

Smirnov-Grubbs検定で外れ値を除外
(離乳-育成:4、肥育:6、母豚:3)

表 1 農場レベルでの
ステージ別豚の WBC 正常

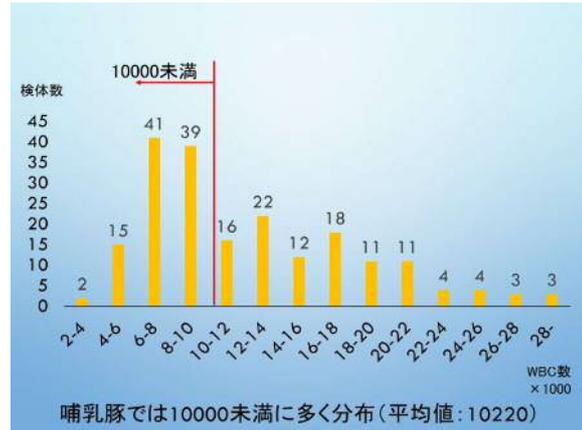


図 1 哺乳豚の WBC の分布

哺乳豚の WBC は他の全てのステージよりも有意に低値であった。母豚の WBC は離乳-肥育豚に比べ有意に低値となった (Kruskal-Wallis 検定) (表 1)。

哺乳豚の WBC の平均値は 10000 以上であったが (表 1)、個体別では 10000 未満に多く分布していた (図 1)。

(2) 異常豚群の WBC の変化

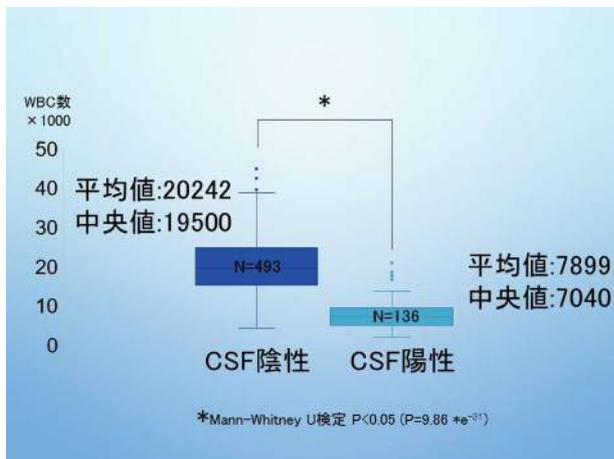


図 2 異常豚群における WBC の変化

異常豚群の WBC は CSF 陰性豚に比べ、CSF 陽性豚では有意に低値を示した。

(3) WBC 測定 of Se と Sp と最適 Cut off 値

CSF 特定防疫指針に基づき、WBC の Cut off 値を 10000 と設定した時の WBC 測定 of Se は 74.3%、Sp は 93.9% であった。ROC 曲線解析から、最適 Cut off 値は 11700 であり、その時の Se は 89.1%、Sp は 85.9% であった。

(4) 群の感度と必要検査頭数

発生農場における異常豚群の有病率は、0.76であった(表2)。異常豚群を95%以上の確率で摘発するための必要検査頭数は4頭であり、有病率を10%と仮定した場合の必要検査頭数は22頭であった(表3)。

発生農場における異常豚群のPCR陽性率(=有病率)											
農家	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Ave	Med
陽性頭数	2	13	10	8	21	9	11	20	43		
陰性頭数	6	4	0	2	6	1	0	10	24		
合計頭数	8	17	10	10	27	10	11	30	67		
有病率	0.25	0.76	1.00	0.80	0.78	0.90	1.00	0.67	0.64	0.76	0.78

愛知県において、異常豚群の**有病率は0.76**と推定

表2 発生農場における異常豚群の有病率

有病率を76%・Cut off値を1万と仮定

N	0.95以上の確率で摘発される
N=1	0.575761743
N=2	0.820021901
N=3	0.923646405
N=4	0.967607884
N=5	0.986258025
N=6	0.994170129
N=7	0.997526745
N=8	0.998950751
N=9	0.999554868
N=10	0.999811158

摘発確率(異常豚検査実施時)
→4頭検査すると95%以上の確率で摘発される

有病率を10%と仮定した場合の摘発確率

N	0.95以上の確率で摘発される
N=1	0.127943
N=2	0.239516
N=3	0.336814
N=4	0.421664
N=5	0.495658
N=6	0.560185
N=7	0.616456
N=8	0.665527
N=9	0.708321
N=10	0.745639
N=11	0.7781826
N=12	0.8065625
N=13	0.8313114
N=14	0.8528939
N=15	0.8717150
N=16	0.8881281
N=17	0.9024413
N=18	0.9149232
N=19	0.9258082
N=20	0.9353005
N=21	0.9435783
N=22	0.9507970
N=23	0.9570922
N=24	0.9625819
N=25	0.9673693
N=26	0.9715442
N=27	0.9751849
N=28	0.9783598
N=29	0.9811285
N=30	0.9835430

22頭検査すると95%以上の確率で摘発される

表3 CSF感染群を摘発できる検査頭数

(5) ワクチン接種がWBCの変化とSeとSpに与える影響

ワクチン接種農場におけるCSF陽性豚のWBCの平均値は16257であり、ワクチン未接種農場のCSF陽性豚の平均値に比べ、有意に高値となった。またこの時のWBC測定のSeは25%、Spは93.9%と感度が大幅に低下した(図3)。

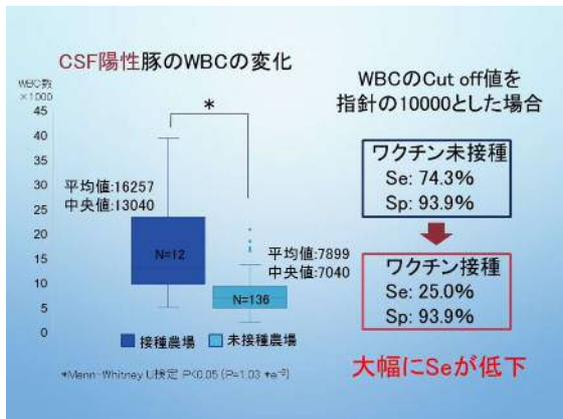


図3 ワクチン接種がWBCの値とWBC測定のSeとSpに与える影響

【まとめ及び考察】

まず農場レベルでの豚のWBCの値は、日齢増加に伴い上昇していた。若齢豚のWBCは、本好らが分娩直後は、9780±2410、1週齢9520±1810、2週齢7850±1220、4週齢11200±1190、7週齢28155±3860と報告しているが、10頭の検査であり誤差範囲が大きい⁴⁾。本研究では、母集団の数が多く、誤差範囲も非

常に小さいことから、CSFにおけるWBC減少の一基準としてだけでなく、臨床分野においても有用であると考えられる。哺乳豚のWBCはヒストグラムから平均値や中央値では10000を超えていたものの、個体数では6000-10000未満にピークが見られた。CSFを念頭に置いたWBC検査を行う際は、結果の判断に注意する必要がある。

CSFの特定症状を示す異常豚群のWBCを比較すると、CSF陽性豚群では有意に低値となった。WBC測定の見直しとSpはCut off値を指針の10000と設定した場合、それぞれ74.3%、93.9%であった。これは過去に報告があるヒトのインフルエンザの簡易キット（Se: 62.3%、Sp: 98.2%）と比較しても、感度が高く⁶⁾、WBC測定はCSFの簡易検査として有用である可能性がある。一方最適Cut off値はROC曲線解析から11700となり、指針より高値となった。この理由は様々な病態の豚の血液を検査に供していたためと考えられる。現在、10000が広く認識されており、感度もよいことから、この値が適切と考えられる。一方、白血球の顕著な減少はCSFだけでなく、アフリカ豚熱（African Swine Fever: ASF）にも特徴的であることから⁵⁾、文献値などからASFについても同様にWBCの精度を調査する必要がある。

CSFを摘発するための必要検査頭数は、愛知県の発生農場の異常豚群の有病率0.76を利用すると、4頭となった。一方有病率を低く、10%と仮定した場合は22頭であった。現在愛知県が行っている異常豚検査の対応は、異常豚とその周辺豚10頭程度の採血を行い、検査に供している。また発生状況検査や清浄性確認検査、監視プログラム解除検査では1農場につき、少なくとも30頭の検査を実施している。よって現在の対応で、十分にCSFを摘発できる可能性がある。

ワクチン接種農場では、CSF陽性豚群のWBCはワクチン未接種農場のCSF陽性豚群に比べて、有意に高値となった。現在使用しているワクチンは、接種後、3日後から強毒ウイルスの攻撃に耐過、生存し、10~14日後に中和抗体が産生される⁷⁾。今回解析に用いられたワクチン接種済農場のCSF陽性豚群の血液の状態として、①ワクチン接種前に感染成立、②ワクチン接種直後に感染成立、③ワクチン接種後に一時的に感染の可能性が考えられる。感染成立とワクチン接種のタイミングにもよるが、CSF罹患豚においてもワクチン接種により臨床症状や白血球減少症が抑えられる可能性が示された。さらにワクチン接種農場においては、WBC測定のSeが著しく減少していた（25%）。しかし今回の検討は1農場のみ、83頭分のWBCデータしか用いていないため、今後も調査を継続し、最適Cut off値や必要検査頭数を検討する必要がある。

○参考文献

- 1) Wang J., Sun Y., Meng X., Li L., Li Y., Luo Y., Wang W., Yu S., Yin C., Li S. and Qiu H. 2018. Comprehensive evaluation of the host responses to infection with differentially virulent Classical Swine Fever virus strains in pigs. *Virus Res.* **255**: 68-76.
- 2) 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**: 1277-1284.
- 3) 杉村克治, 佐藤卯三, 成田亮一. 豚コレラ人工感染豚における血液変化. 1953. 日獣会誌. **6**.
- 4) 本好茂一, 加納康彦, 三浦高義. 1963. 哺乳子豚の血液学的研究. 日獣会誌. **16**
- 5) Post J., Weesendorp E., Montoya M. and Loeffen L. W. 2017. Influence of age and dose of African Swine Fever virus infections on clinical outcome and blood parameters in pigs. *Viral Immunol.* **30**: 58-69.
- 6) Chartrand C., Leeflang M. G. M., Minion J., Brewer T. and Pai M. 2012. Accuracy of Rapid Influenza Diagnostic Tests: A Meta-Analysis. *Ann. Intern. Med.* **156**: 500-511.
- 7) 豚コレラ防疫史. 第Ⅱ章: 3).