

2 豚流行性下痢確定診断における回腸検索の有効性の証明

県央家畜保健衛生所

阿部祥次、飯塚綾子、藤田慶一郎、濱谷景祐、赤間俊輔

豚流行性下痢（以下、PED）は、コロナウイルス科のPEDウイルス（以下、PEDV）の感染により起こる豚の急性ウイルス性疾病で、我が国では家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されている。本病は、アジアと北アメリカで2010年から流行しており、我が国では1996年以来流行は確認されていなかったが、2013年以降、全国的に発生しており、本県でも2014年4月から6月にかけて、計22農場で発生した。

罹患豚の臨床症状は黄色水様性下痢を特徴とし、哺乳豚の致死率は時に100%に達することがある。剖検所見は、小腸壁の菲薄化や未消化凝固乳滞留による胃の膨満が観察される。組織所見は小腸絨毛の萎縮が特徴的であり、小腸粘膜上皮細胞は空胞化あるいは扁平化が認められる¹⁻³⁾。しかし、臨床症状及び上記所見は、伝染性胃腸炎（TGE）と類似するため、類症鑑別あるいは確定診断が必要である。

我が国においては、ウイルス分離、抗体の有意な上昇の確認及び病理組織学的（以下、病理）検査の免疫組織化学染色⁴⁾（以下、免染）が本病の確定診断法となっている。しかし、上述したいずれの検査も結果を得るまでに時間を要し、特に、病理検査は多検体処理に不向きであるため、流行時の迅速診断として課題がある。そこで、PEDの病理診断をより効率的に行うため、野外材料における最も診断価値の高い腸管部位の特定を目的として本研究に取り組んだので、その概要を報告する。

1 材料と方法

(1) 検査頭数の目安設定

病理診断をより効率的に行うため、統計学的に必要な採材頭数を算出した。算出式は、オーエスキー病防疫対策要領の無作為抽出による清浄度確認検査で用いられている、 $n = \{1 - (1 - P1)^{1/d}\} \{N - d/2\} + 1$ （N：母集団頭数、d：母集団の感染頭数、P1：信頼度）を使用した。Nを1腹あたりの哺乳豚の平均頭数である12頭、dを急性感染を想定し80%、P1を95%と仮定した時の必要採材頭数が2.93頭と算出されたこと及び発症している個体を選定できることを踏まえ、採材頭数の目安は3頭とした。

また、慢性化やワクチン接種により、群の抗体価が上昇すると感染率の低下が想定されるため、感染率毎の必要検査頭数を算出した。

(2) 材料

検体が搬入された20農場において、各農場につき2～7頭の子豚（中央値：3、計67頭）を剖検に供し、脳、主要臓器、各消化器及び扁桃等を採材した。腸管は、十二指腸、空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部、回盲部、盲腸、結腸及び直腸を採材した。また、回腸の採材部位を統一するため、専用の定規（図1）を作成し、回盲部から5cmまでの領域を回腸下部、5cm～15cmを回腸中部、15～20cmを回腸上部とした。

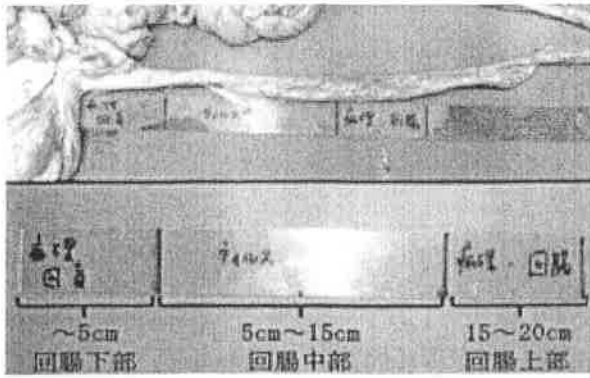


図1 回腸の採材部位を示した専用定規

(3) 病理検査

採材した組織は、常法に従い、10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し組織標本を作製した。なお、胃及び腸管については分割カセットを活用し、胃、十二指腸、空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部及び直腸をまとめて1ブロック、回盲部、盲腸、結腸をまとめて1ブロックとし、1頭当たり2ブロックを作製した。

全ての材料についてヘマトキシリン・エオジン（以下、HE）染色を実施し、胃及び腸管は、抗PEDV免疫家兎血清及び抗TGEウイルス（以下、TGEV）免疫家兎血清（動物衛生研究所）を用い、市販の免染キット（シンプルステイン、ニチレイバイオサイエンス）で免染を実施した。

また、PEDV に対する陽性反応が確認された個体については、胃及び腸管の各部位について陽性抗原検出率を算出した。さらに、死後変化の影響がなく、良好な組織の構造を保っていた個体については、絨毛の萎縮比率と感染抗原量を推定するため、空腸上部、空腸下部、回腸上部及び回腸下部における絨毛と陰窩長の比及び免染の陽性反応面積を測定した。その際、光学顕微鏡下（× 400）で管腔側が入るように統一し（図2、3）、ランダムに4カ所を撮影することで、各部位の平均値を求め

た。絨毛と陰窩の長さは、写真に定規を当てて測定した。陽性反応の面積測定は、画像解析ソフト（Adobe Photoshop; Adobe Systems Incorporated、ImageJ; NIH Maryland）を用いて陽性反応領域を差別化し、スケールを元に単位を μm^2 として算出した（図4）。有意差検定には、Tukey test を用いた。

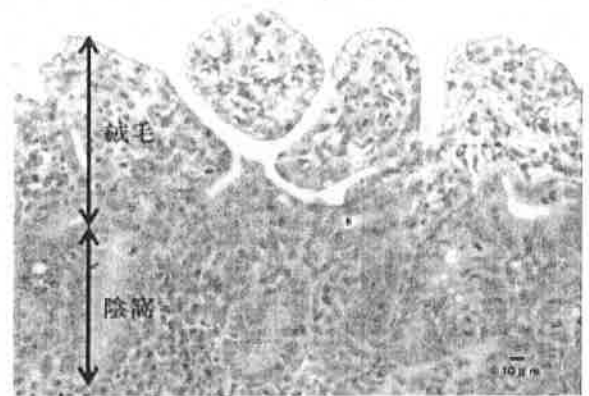


図2 回腸（HE染色、× 400）

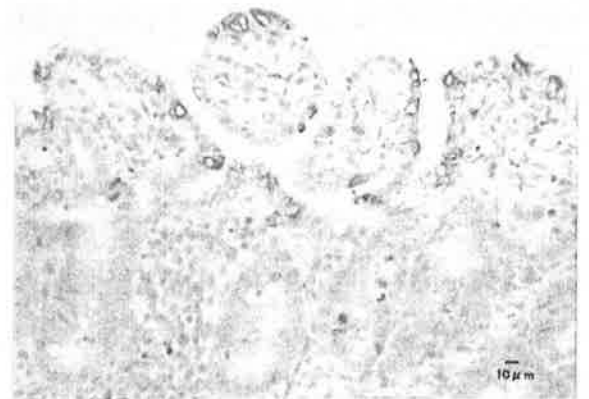


図3 回腸（PEDV免染、× 400）

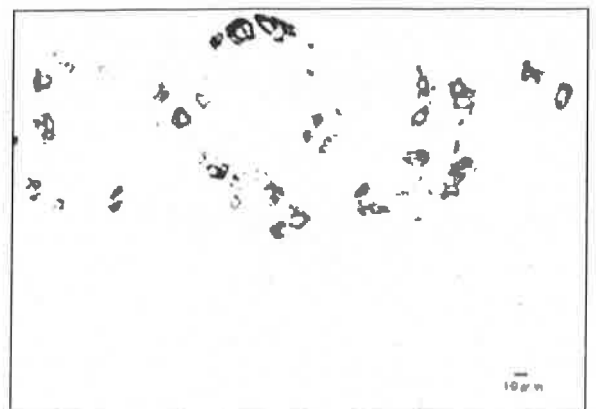


図4 陽性反応の差別化

(4) ウイルス学的検査

回腸中部を用い、PEDVを標的とした reverse transcription polymerase chain reaction (以下、RT-PCR) による遺伝子検査を実施した⁵⁾。

(5) 細菌学的検査

脳、主要臓器について常法に従い、5% 羊血液寒天培地 (37℃、好気) 及び DHL 寒天培地 (37℃、好気) で菌分離を実施した。小腸内容については 5% 羊血液寒天培地 (37℃、好気) 及び DHL 寒天培地 (37℃、好気) で定量培養し、必要に応じて polymerase chain reaction (以下、PCR) による病原遺伝子検査等を実施した。

2 検査成績

(1) 診断頭数及び慢性化時の必要頭数

18 農場の計 48 頭を PED と診断した。陽性農場毎の陽性豚摘発率及び農場数は、33.3% (1/3 頭) が 1 農場、60% (3/5 頭) が 1 農場、66.6% (2/3 頭) が 4 農場及び 100% が 12 農場であり、ほとんどの農場が 2 頭以上陽性と診断された。なお、4 頭は、死後変化により絨毛の状態が不良であったため、診断不能であった。

感染率毎の必要検査頭数は、感染率が低下するにつれて増加し、感染率が 40% を切ると 6 頭以上となり、3 頭を大きく上回った (図 5)。

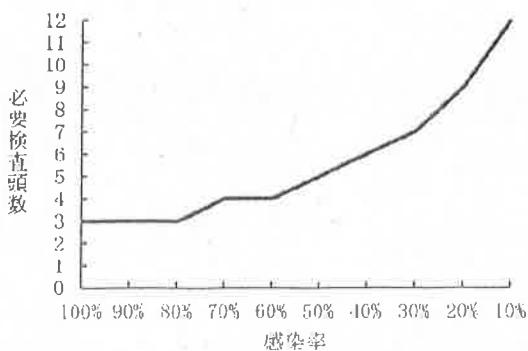


図 5 感染率による必要検査頭数の変動

(2) 陽性抗原検出率

PED と診断した 48 頭中、空腸上部、空腸下部、回腸上部及び回腸下部の全てが採材されていた 44 頭の胃及び腸管について、陽性抗原検出率を算出したところ、胃は 0%、十二指腸は 35.7%、空腸上部は 81.8%、空腸下部は 90.0%、回腸上部は 95.5%、回腸下部は 100%、回盲部回腸側は 100%、回盲部盲腸側は、46.2%、盲腸は 44.7%、結腸は 43.9%、直腸は 2.4% であった (図 6)。

回腸下部と回盲部回腸側が最も高値を示したが、回盲部は、採材時の不備等により検体数が少なかった (図 6)。

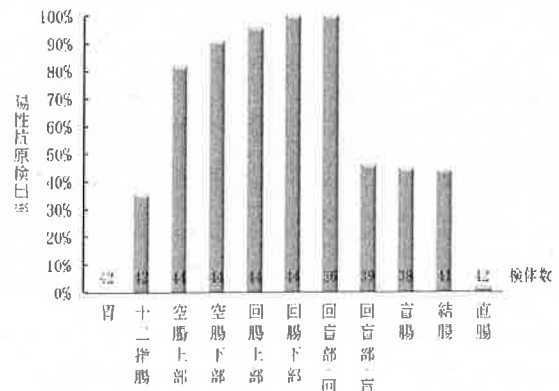


図 6 各部位における陽性抗原検出率

(3) 絨毛の萎縮比率と陽性反応面積

死後変化の影響がなく、良好な組織の構造を保っていた 30 頭の絨毛・陰窩長比の平均値は、空腸上部が 1.82 (0.74 ~ 4.75) : 1、空腸下部が 1.88 (1.21 ~ 4.03) : 1、回腸上部が 1.86 (1.01 ~ 4.87) : 1、回腸下部が 1.82 (0.96 ~ 5.53) : 1 で、正常値の 7:1 に比べ低値を示したが、各部位で差はなかった (図 7)。一方、陽性反応面積の平均値は、空腸上部が $2,310 \mu\text{m}^2$ 、空腸下部が $2,100 \mu\text{m}^2$ 、回腸上部が $4,570 \mu\text{m}^2$ 、回腸下部が $5,236 \mu\text{m}^2$ であり、回腸上部と空腸下部、回腸下部と空腸上部及び空腸下部で有意差が認められた (図 8)。

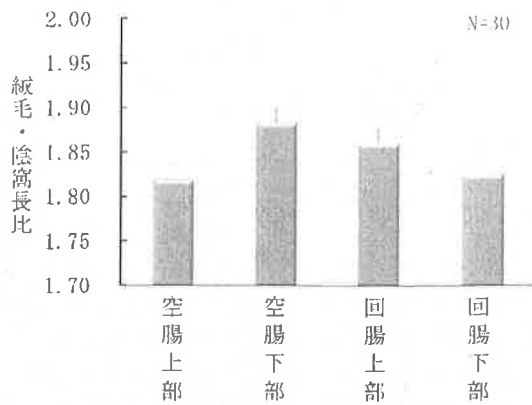


図7 絨毛の萎縮比率

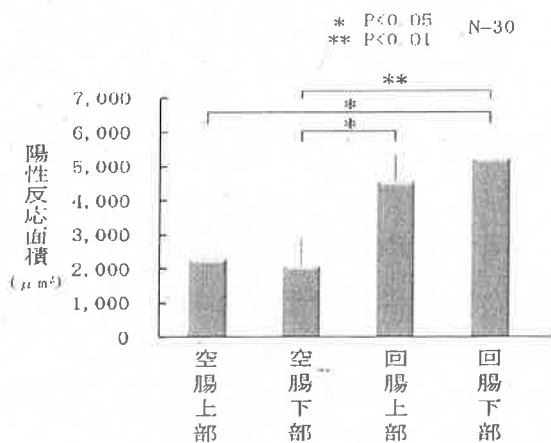


図8 陽性反応面積

(4) 免染と RT-PCR 結果の比較

免染と RT-PCR 結果の一致率は、農場ベースで 100% (20/20 農場)、個体ベースで 95.2% (60/63 頭) であり、高率に一致した (表 1)。

表 1 免染と RT-PCR 成績の比較

		RT-PCR		計
		+	-	
免染	+	47	1	48 (76.2%)
	-	2	13	15 (23.8%)
計		49 (77.8%)	14 (22.2%)	63

(5) その他

農場における PEDV 以外の病原因子の検索では、TGE、豚繁殖・呼吸障害症候群、化膿性髄膜炎、グラム陽性球菌感染が各 1 農場、病原性大腸菌である ETEC や STEC の分離が 3 農場、PED は陰性であったが、同様のウイルス性腸炎像を呈し、デルタコロナウイルスの関与が疑われた農場が 1 農場で確認された。

3 まとめ及び考察

今回、必要検査頭数の目安設定、回腸採材専用の定規作製並びに分割カセットを利用したブロックの作製といった工夫を施したことにより、一貫して統一性の高い採材・検査を行うことができた。また、定規による萎縮比率の評価及び画像解析により陽性反応面積を評価したことで、客観性に富む結果を得ることができた。

陽性豚摘発率の結果から、発生初期は 1 農場につき発症豚 3 頭の検索で問題無く PED の診断ができると考えられた。しかし、死後変化により判定不能となった個体が 67 頭中 4 頭存在したことから、再検査を避けるためには、検査個体を選定するにあたり鑑定殺した個体を材料に供す必要があると思われた。

絨毛の萎縮程度は、末吉ら⁴⁾の報告と同様に重度な個体 (1:1 未満) が認められ、HE 染色標本による TGE との鑑別はできないと考えられた。萎縮比率の結果から、HE 染色標本では空腸と回腸の病変程度に差はないと考えられたが、回腸は回盲部の存在により特定の領域を正確かつ簡便に採材できる利点を持ち、特に回腸下部は、陽性抗原検出率及び陽性反応面積値が高く、PED の病理診断には回腸下部の検索が最も有効である。

以上のことから、発生初期は、発症生体 3

頭を用いた回腸下部を中心とする検索を行うことで、PEDの効率的な病理診断ができると考えられた。

一方、慢性化した際は必要検査頭数の増加が懸念され、迅速かつ正確な病理診断が困難になる場合があるため、同等の信頼性があり迅速性や多検体処理能に優れるRT-PCRの結果を積極的に活用すべきであると思われた。なお、病理検査は迅速性を求めるよりも、広く病原因子の検索が可能な特性を生かし、他の検査結果と合わせ類症鑑別を含む農場における他の増悪因子の検索により重心を置いていくべきであると思われた。

今後、機会があれば、発生初期と慢性化時における病理組織学的な差異についても調査し、診断の精度向上につなげたい。

稿を終えるにあたり、陽性反応の面積測定法を含め、様々なご助言を賜った、動物衛生研究所の播谷亮上席研究員と川島健司上席研究員に深謝する。

参考文献

- 1 Debouk P, Callebaut P, Pensaert M : The pathogenesis of an enteric infection in pigs, experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV777, *Vet Microbiol*, 6, 157-165 (1981)
- 2 Saif et al : Porcine epidemic diarrhea virus. 514-516 In: *Disease of swine*, 10th ed (2012)
- 3 全国家畜衛生職員会 : 病性鑑定マニュアル, 第3版, 242-243 (2008)
- 4 Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, Yoshida K, Nakazawa M, Sato K, et al : An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea, *J Comp Pathol*, 113, 59-67 (1995)
- 5 Ishikawa K, Sekiguchi H, Oqino T, Suzuki S : Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR, *J Virol Methods* 69(1-2), 191-195 (1997)