第　２　部

搾乳牛における出血性腸症候群（HBS）発生報告

東部家畜保健衛生所
○石原希朋・土橋宏司　他

【はじめに】

牛の出血性腸症候群（以下、HBS）は主に搾乳牛で散発し、小腸、多くは空腸の一部に限局した血腫形成を特徴とする高致死性疾病である。発生原因は明らかになっていないが、*Clostridium perfringens* A型（以下、CpA）の関与が示唆されている。今回、本県で初めてHBSと診断した事例に遭遇したので、概要を報告する。

【発生状況】

（症例）

ホルスタイン種、搾乳牛、6歳

（経緯）

本症例は令和4年5月30日に3産目の出産をし､分娩後の経過は良好であったが、分娩から5ヶ月経過した令和4年10月31日の朝に突然、食欲廃を呈し、暗赤色血餅を含む血便を排出、起立不能となった。等張リンゲル糖による補液やセファゾリン、デキサメサゾン及びグルコン酸カルシウム投与の治療により一時は改善したが、発症2日後の11月2日に死亡が確認されたため、同日、病性鑑定を実施した。

【材料・方法】

（血液検査）

死亡前日に採血し、冷蔵保存していた全血及び血清について自動血球計算装置及び生化学自動分析装置を用いて血液検査を実施した。

（寄生虫学的検査）

直腸便を用いて、ショ糖浮遊法を実施した。

（ウイルス学的検査）

主要臓器、腸間膜リンパ節及び直腸内容を用いて、牛ウイルス性下痢ウイルス、牛アデノウイルス、牛パラインフルエンザウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛コロナウイルス、牛ロタウイルス、牛トロウイルスについて常法に従い、ウイルス分離検査またはPCR検査を実施した。

（細菌学的検査）

主要臓器、脳、腹水及び十二指腸内容について以下の方法を用いて、細菌分離培養を行った。

① 羊血液加コロンビア寒天培地：37℃・48時間・5%CO_2培養
② DHL寒天培地：37℃・24時間・好気培養
③ 卵黄加CW寒天培地：37℃・24時間・嫌気培養

（病理学的検査）

10%中性緩衝ホルマリン固定臓器について、HE染色、グラム染色、PAS反応、PTAH染色及び家兎抗 *Clostridium* sp.抗体（ViroStat、U.S.A.）（以下、*Clostridium*抗体）を用いた免疫染色を実施した。

【結果・成績】

（血液検査）

既報と同様に高血糖、低カリウム血症、低クロール血症、低カルシウム血症が認められた（表 1）。既報では貧血は認められないまたは軽度とされているが、本症例では赤血球数の減少、ヘモグロビン値・ヘマトクリット値の低下が観察された。なお、生前発症後に複数回の血液検査を実施しているが同様の傾向が認められている。

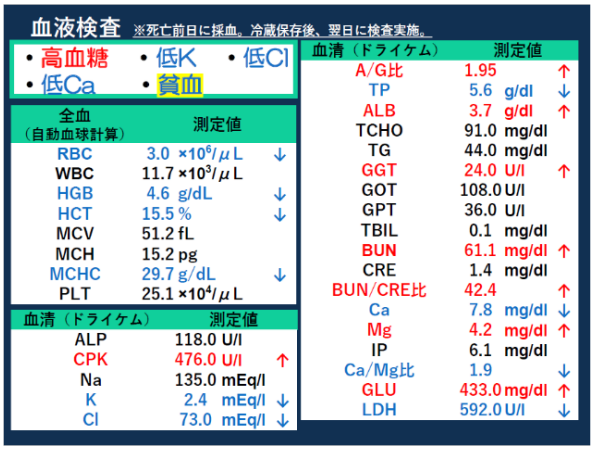

表 1

（剖検所見）

腹囲膨満がみられ、尾部では暗赤色の血便が付着し、可視粘膜は蒼白を呈していた。主要臓器は腎臓及び肝臓で褪色がみられたが、心臓、肺及び脾臓では著変はみられなかった。腹腔では赤色透明の腹水が中等量貯留していた。空腸上部の限局した領域において重度の出血がみられ、血腫により、管腔は狭窄していた。第三胃から血腫よりも上部の空腸の内容では円筒状の血餅が多数観察された（図 1）。一方で、胃～十二指腸の粘膜・漿膜に著変はみられなかったことから、血餅は空腸上部から逆流したものと考えられた。また、空腸下部から盲腸の粘膜は赤色を呈していたが、結腸及び直腸の粘膜・漿膜には著変は認められなかった（図 2）。

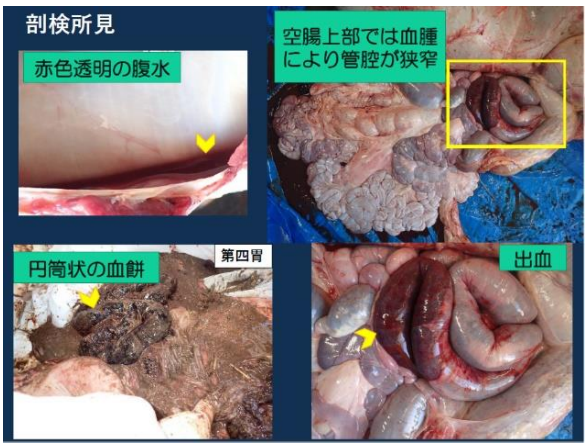

図 1

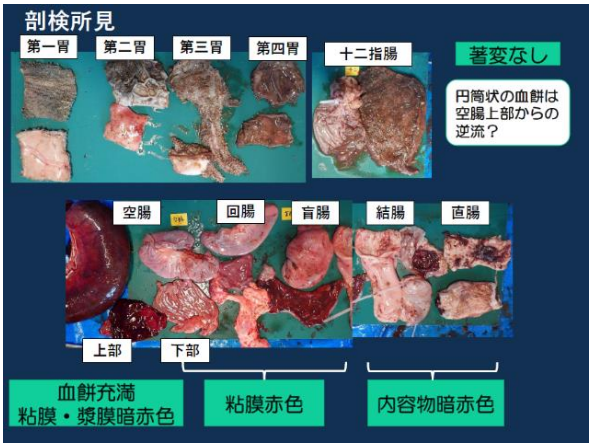

図 2

（寄生虫学的検査）

寄生虫検査では寄生虫卵は検出されなかった。

（ウイルス学的検査）

検査した項目すべてが陰性であった。

（細菌学的検査）

主要臓器からは病原細菌は分離されなかった。十二指腸内容から 1.0×10^5 CFU/g の CpA が分離された。

（病理学的検査）

空腸上部の血腫がみられた部位を横断したところ、血腫は腸間膜反対側の粘膜下組織に形成され、管腔は重度に狭窄し（図 3、4）、腸間膜反対側の粘膜は広範に剥離していた（図 5）。出血は粘膜固有層においても重度に認められ、粘膜固有層では好中球を主体とする炎症細胞が中等度に浸潤していた（図 6）。粘膜表層ではグラム陽性桿菌

が観察され、*Clostridium* 抗体を用いた免疫染色では芽胞に一致して陽性となった(図7)。また、粘膜下組織や筋層の一部の血管壁は HE 染色で好酸性均質、PAS 反応で陽性、PTAH 染色で藍色に染まるフィブリノイド壊死が認められた(図 8)。空腸下部から盲腸では充うっ血が観察されたが、血管の変性・壊死はみられず、病変は空腸上部に限局していた。

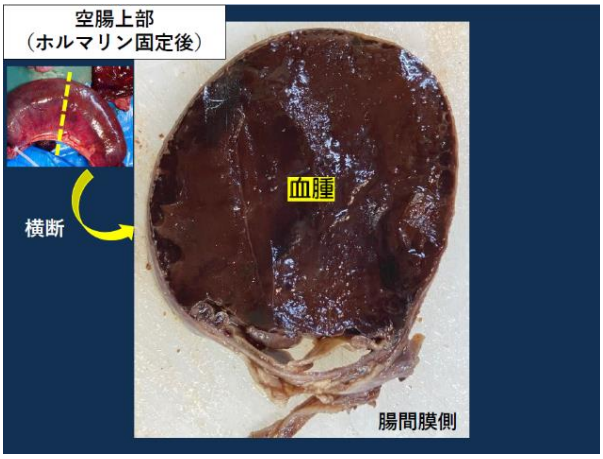

図 3

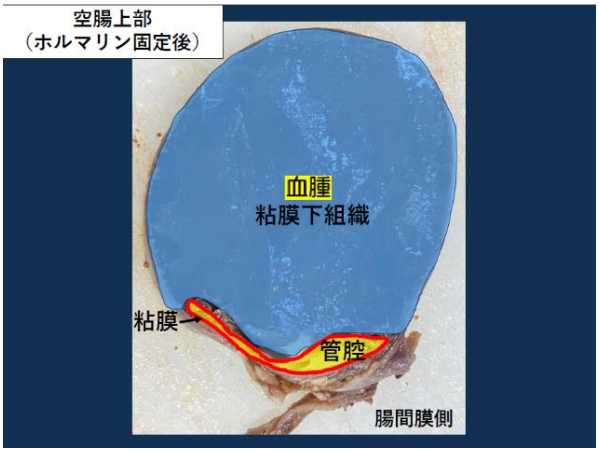

図 4

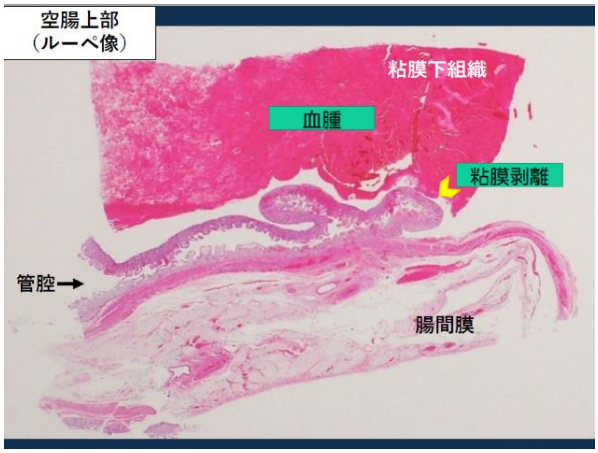

図 5

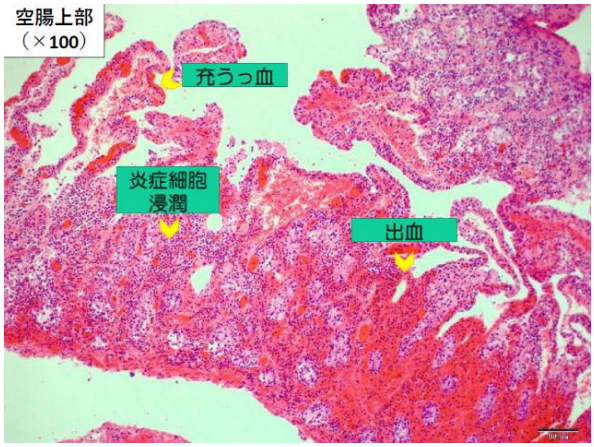

図 6

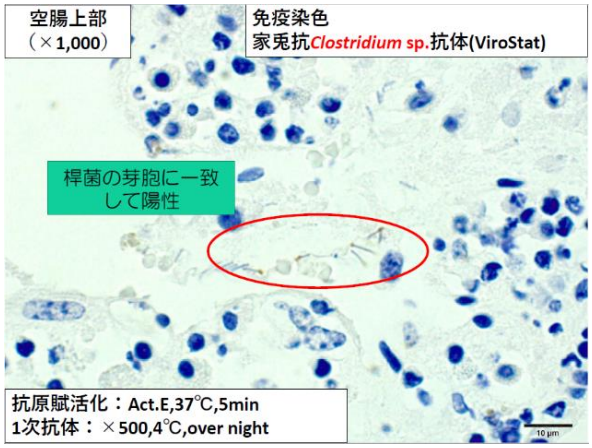

図 7

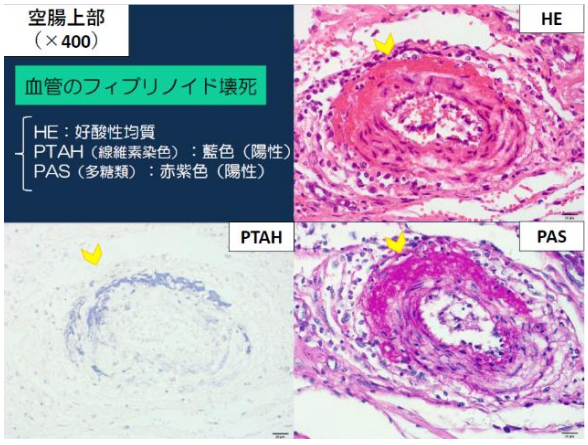

図 8

【考察】

細菌学的検査において十二指腸内容から CpA が分離され、病理学的検査においても病変部の粘膜上皮に *Clostridium* 属菌が確認されたことから、CpA の病態への関与が示唆された。さらに、粘膜下組織や筋層の血管ではフィブリノイド壊死がみられたことから、粘膜下組織における重度の出血は血管の変性・壊死により引き起こされたものと推察された。以上の結果を踏まえ、HBS の発生機序について考察を行った（図 9）。搾乳中期～搾乳最盛期では、免疫機能が低下し、ストレス等の影響によりルーメンアシドーシスが起こりやすいため、腸内環境が悪化し、二次的に CpA が増加したと考えられた。CpA は組織破壊作用がある α 毒素を保有することから、CpA の増加により腸管や血管が変性・壊死し、粘膜下組織に重度の出血を起こしたと考えられた。さらに粘膜下組織に形成された血腫により、腸管管腔は重度に狭窄したことで、イレウスを引き起こし、腸管運動や血管循環の抑制が生じ、最終的にショックに陥り、死亡したと考察した。

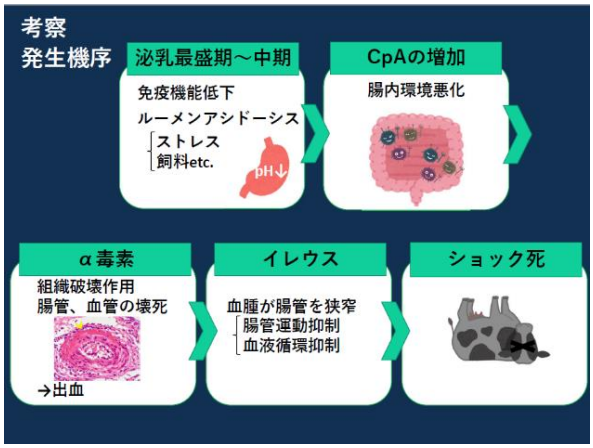

図 9

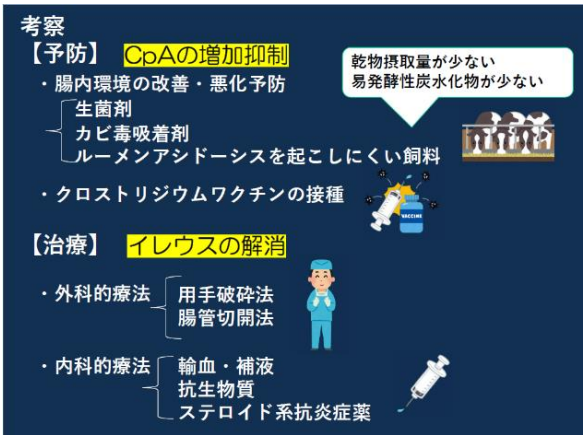

図 10

発症には CpA が関与するとみられたことから、予防には CpA の増加を抑制する対策が有効と考えられた。CpA は腸管内常在菌であり、腸内環境の悪化により増加することから、腸内環境の改善や悪化を予防する対策として、生菌剤やカビ毒吸着剤の投与及びルーメンアシドーシスを起こしにくい飼料の給与などやクロストリジウムワクチンの接種が効果的であると考えられた。死亡する直接の要因はイレウスと考えられることから、治療は開腹し、血餅を手で揉みほぐして破砕する用手破砕法などのイレウスを解消する方法が効果的と考えられた（図 10）。

また、消化管の通過障害症状を呈する疾病（腸捻転、第四胃変異等）では同様の臨床症状や血液検査結果がみられる。鑑別点としては HBS では早く症状が重篤化する点と体温低下する点が挙げられる。一方で血便の排泄は初診時にはみられないこともあるため、鑑別点にはならない。いずれにしても、外科的介入が必要であるため、ただちに開腹手術することを検討する必要がある。

【まとめ】

空腸に限局した血腫がみられたことから、HBS と診断した。既報と同様に CpA が分離され、免疫染色でも *Clostridium* 属菌が観察されたことから、CpA の病態への関与が示唆された。また、粘膜下組織の出血は血管壁のフィブリノイド壊死によるものと

考えられた。HBS の病態に CpA の関与が示唆されている一方で、同様に CpA による出血性壊死性腸炎を生じる疾病としてエンテロトキセミアがあるが、エンテロトキセミアでは、腸管の広い範囲で壊死・出血がみられ、病変は限局しない。HBS のように腸管の限局した領域に出血が生じる機序についてはさらに検討していく必要がある。また、CpA の実験感染では HBS は再現できないとの報告もあり、HBS は CpA のみで発症するものではないと考えられる。様々な要因が複合的に関与して発症するものと考えられ、CpA 以外に病態形成に寄与する要因を今後、明らかにしていく必要がある。今後も情報を積み重ね、発生原因及び発生機序の特定につなげ、予防や治療に生かしていきたい。

愛玩用繁殖豚における豚熱ワクチン免疫付与状況について

西部家畜保健衛生所　○小林洋平　池永直浩　他

【はじめに】

近年、愛玩豚の飼養者が全国的に増加しており（図 1）、管内においても豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針（以下、「指針」）に基づき愛玩豚に対し豚熱ワクチンの接種を実施している。背景には、成豚となっても体重 40kg 以下のマイクロブタ飼育の流行があり、その寿命は 10～15 年とされている。指針では同じ個体への接種は原則、最大 4 回とすることが推奨されているが、愛玩豚は養豚業として飼養される豚（以下、「畜産豚」）と異なり、4 回接種後も長期にわたり飼育されることが想定される。一方で愛玩豚は免疫付与状況確認検査の対象（豚等を 6 頭以上飼養する農場）に該当しないことが多く、抗体保有状況の調査報告自体が少ない。

当所管内には母豚 30 頭規模の愛玩用マイクロブタ生産農場（A 農場）があり、指針に基づき新生豚及び繁殖豚へのワクチン接種及び免疫付与状況確認検査を実施している（図 2）。今回、これまで蓄積した検査データをまとめ、マイクロブタの免疫付与状況に対する一つの知見として報告する。

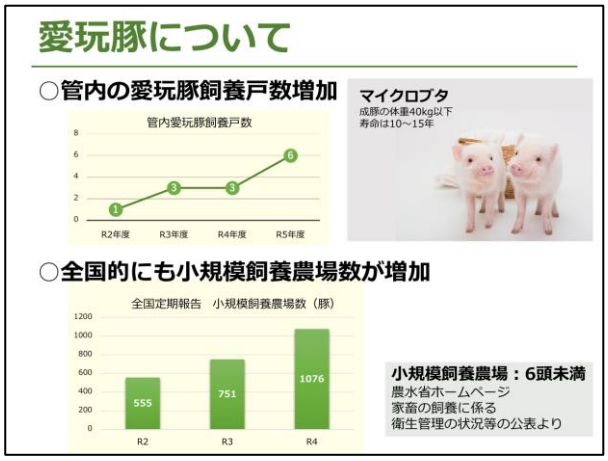

図 1

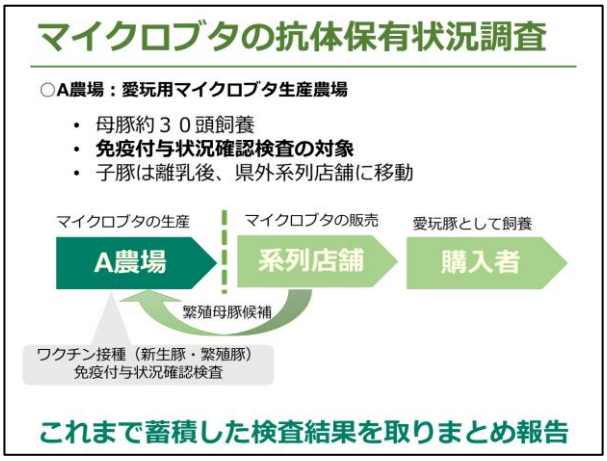

図 2

【材料と方法】

（１）調査１

令和元年から令和５年までにA農場及び管内畜産養豚場において実施した繁殖豚の免疫付与状況確認検査結果を用いて、①各年度における愛玩用繁殖豚及び畜産用繁殖豚の ELISA 検査結果陽性率の比較、②愛玩用繁殖豚及び畜産用繁殖豚の第 1・第 2 世代別による中和抗体価の分布状況及び幾何平均値の比較を行った。なお、ELISA 検査は指針に基づき＋または±と判定されたものを陽性とした（図 3）

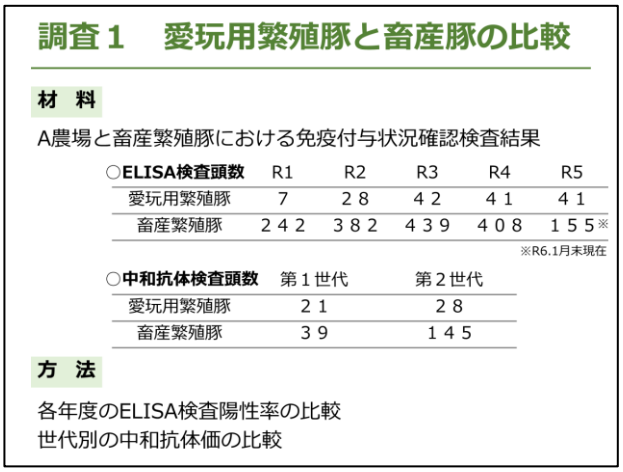

図 3

（２）調査２

愛玩用繁殖豚において、豚熱ワクチン４回目の接種から１年以上経過した個体を 14 頭選定し、各個体の中和抗体価を測定した。また、同一個体において過去の免疫付与状況確認検査のデータがある場合はその抗体価との比較を行った（図 4）。

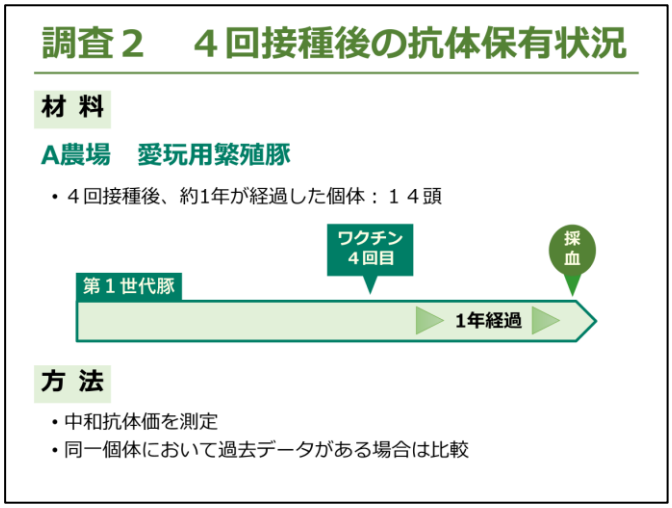

図 4

【結果】

（１） 結果１

① 各年度における ELISA 陽性率は、畜産豚では令和元年度から令和５年度まですべての年度で 90%以上であった。一方、愛玩用繁殖豚においては令和 3 年度までは畜産豚同様に高い陽性率を示していたが、令和 4 年度以降は 70%台に低下した（図 5）。

② 第１世代豚の結果では、畜産豚は中和抗体価 128 倍を中心に分布しているが、愛玩用繁殖豚では 16～32 倍を中心に分布しており、また畜産豚と比較すると、バラつきがある結果となっていた。それぞれの中和抗体価幾何平均値は愛玩用繁殖豚が 23 倍、畜産豚が 111 倍であった。第 2 世代豚の結果では、愛玩用繁殖豚、畜産豚ともに第 1 世代豚の結果より低値に分布しており、各幾何平均値は愛玩用繁殖豚が 7 倍、畜産豚が 34 倍となった。また、愛玩用繁殖豚では第 2 世代豚において抗体価 2 倍未満の割合が 30%以上と増加している結果が認められた（図 6）。

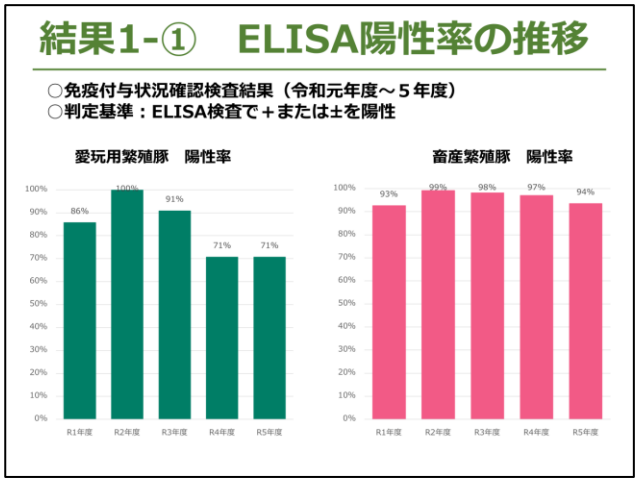

図 5

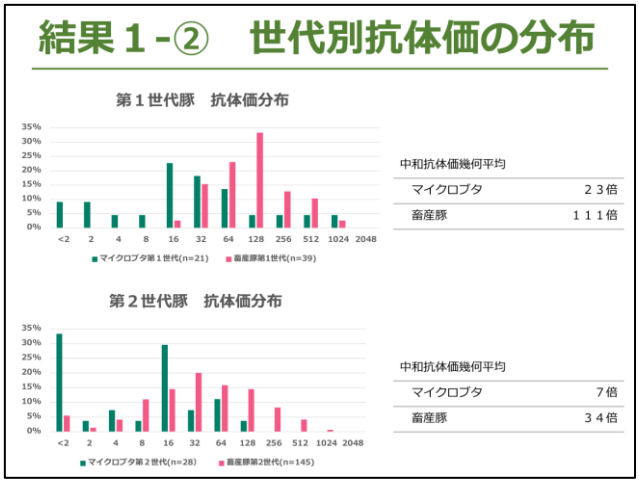

図 6

（２） 結果２

４回目の接種から 300 日以上が経過した個体 14 頭のうち、12 頭が中和抗体価 2 倍以上を保有していることが確認された（図 7）。グラフは横軸に 4 回接種からの経過日数、縦軸に中和抗体価をプロットし、同一個体の結果についてはマーカーを線で結んでいる。今回 2 倍未満を示した 2 頭のうち、1 頭については過去データがないため、もともとワクチンテイクせず 2 倍未満を維持しているのか、もう 1 頭のように抗体価の低下により 2 倍未満となったのかについては不明である。

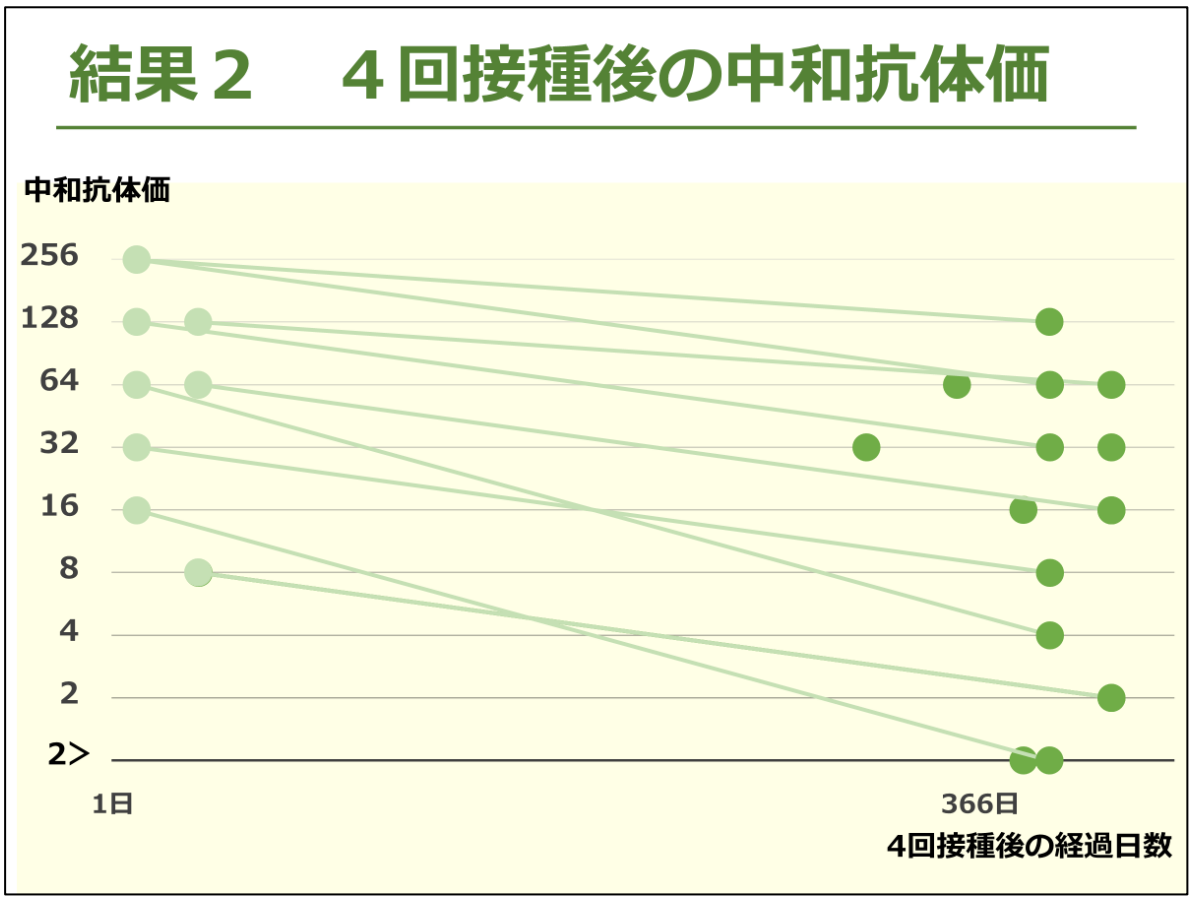

図 7

【まとめ】

結果 1 より、愛玩用繁殖豚においては令和 4 年度以降 ELISA 陽性率が低下、世代別の抗体価の分布を見ると、第 2 代豚において特に 2 倍未満の個体が多く確認された。愛玩用繁殖豚の各年度に占める第 1、第 2 世代豚の割合を調査したところ、令和 4 年度から第 2 世代豚の割合が増加していたことから、第 2 世代豚の増加により全体の陽性率が低下したと推察された。なお、今回検査した愛玩用繁殖豚の第 2 世代は複数回接種後の個体であるため、接種後も抗体上昇が認められない理由としては移行抗体によるワクチンブレイク以外の要因も示唆される（図８）。

また、愛玩用繁殖豚は第 1 世代豚においても畜産豚と比較し中和抗体価が低値を示す傾向が認められたことから、そもそも品種や系統により抗体が上昇しにくい可能性も示唆された。

一方、すでに 4 回目の接種終了から約 1 年が経過した第 1 世代母豚については 1 年後も多くの個体で抗体を保有していることが確認された。しかしながら、愛玩豚においては 4 回目の接種からも長期にわたり飼養されることが想定されるため、この先複数年経過した場合についても引き続き調査をしていく必要があると考えられる。

豚熱ワクチンの接種開始から数年が経過し、今後新たに購入される愛玩豚は第 2 世代以降となることが想定される。今回の結果では第 2 世代豚において補強接種後も抗体を保有しない個体が複数確認されており、新たに飼養する個体が抗体を保有していないことも充分に考えられるため、今後も増加が見込まれる愛玩豚飼養者に対しては、衛生対策の重要性について周知していくことも重要である（図 9)。

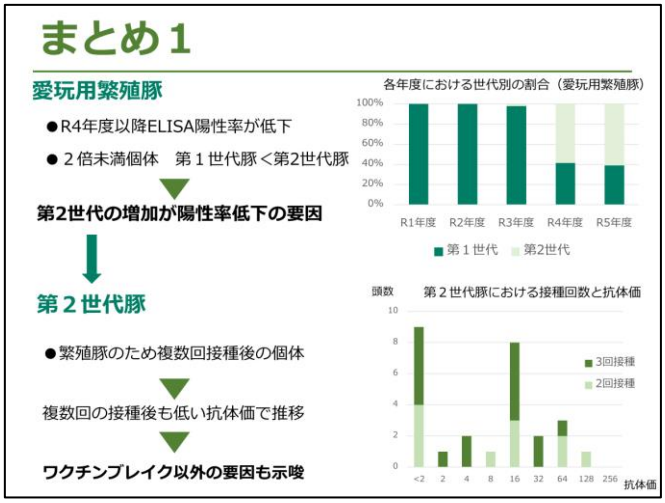

図 8

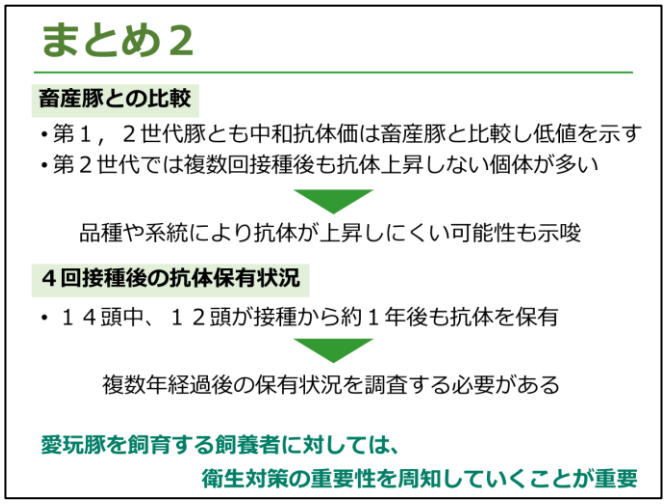

図 9

豚熱防疫指針の一部変更に伴う CPK-NS 細胞の培養方法の検討

東部家畜保健衛生所　　○坂本安由美　土橋宏司

【経緯】

令和 4 年 12 月 23 日付けで「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」が一部変更された。それに伴い、「(別紙１)豚熱の診断マニュアル」(以下、マニュアル) も一部変更され、豚熱ウイルス (以下、CSFV) の中和試験に用いる CPK-NS 細胞 (以下、NS) について、『密栓(フラスコの蓋を固く締めて)培養すること』の記載が削除された。この変更により、NS の培養にあたっては、従来どおりの密栓培養に加え、一般的な細胞と同様の開放培養が可能となった。そこで、培養方法を変更することにより、NS の細胞継代や CSFV 中和試験の結果等に影響が及ぶか否かを確認するため、①密栓及び開放培養における各 NS の発育状況、②各 NS における CSFV の力価、③各 NS における中和抗体価を比較したので、その概要を報告する。

【材料】

細胞は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (以下、動衛研) から配布された NS を従来どおりの密栓培養で継代した NS (以下、密栓 NS) 及び密栓 NS を元に開放培養で継代した NS (以下、開放 NS) を使用した。また、ウイルスは CSFV GPE$^-$株を使用し、検体は過去に免疫付与状況等確認検査で採材した 2 農場、母豚 60 頭の余剰血清を用いた。

【方法】

①密栓及び開放培養における各 NS の発育状況の比較

NS の継代は、平成 29 年度に動衛研から配布された「CPK-NS 細胞扱い方」及びマニュアルに準じて実施し、75cm^2 フラスコを用いて、密栓 NS はフラスコの蓋を締めた状態で、開放 NS はフラスコの蓋を緩めた状態で、それぞれ継代数 30 代目 (P30 と記載、以下同様) まで培養を行った。細胞の発育状態の指標として、各 NS について、継代実施時に(1)細胞量及び NS の特徴である(2)ドームの数(3)ドームの大きさの 3 項目を比較した (図 1)。

図 1　発育状況の比較方法

②各 NS における CSFV の力価の比較

ウイルス力価の測定は、同一ロットの CSFV を用いマニュアルに準拠して実施し、P10、P20、P30 の各 NS における力価をそれぞれ 2 回ずつ測定して比較した。なお、力価の計算は Behrens-Karber 法により行った。

③各 NS における中和抗体価の比較

中和試験はマニュアルに準拠し、P20 または P30 の各 NS を用いて、同時接種法により実施した。また、各検体につき 1well を使用し、1 回ずつ中和抗体価を測定することで比較した。バックタイトレーションの力価の計算は、CSFV 力価測定と同様に Behrens-Karber 法を用いた。

【結果】

①密栓及び開放培養における各 NS の発育状況

各継代数の密栓 NS 及び開放 NS について前述の 3 項目を比較し、左側を密栓 NS、右側を開放 NS として、等号または不等号で示した(図 2)。また、P3、P13、P19、P28 の細胞像については、図 3 に示すとおりである。

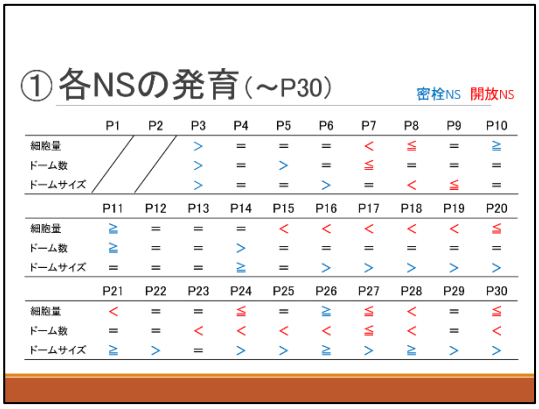

図 2　NS 間の発育状況の比較

開放培養開始直後は、開放 NS にやや発育不良が認められたものの、P30 まで継代した結果、開放 NS の方が密栓 NS よりも継代時の細胞量は多く、増殖が良いことがわかった。また、ドームについては、開放 NS と密栓 NS で数は同程度であるものの、サイズは密栓 NS の方が大きい傾向が確認された。

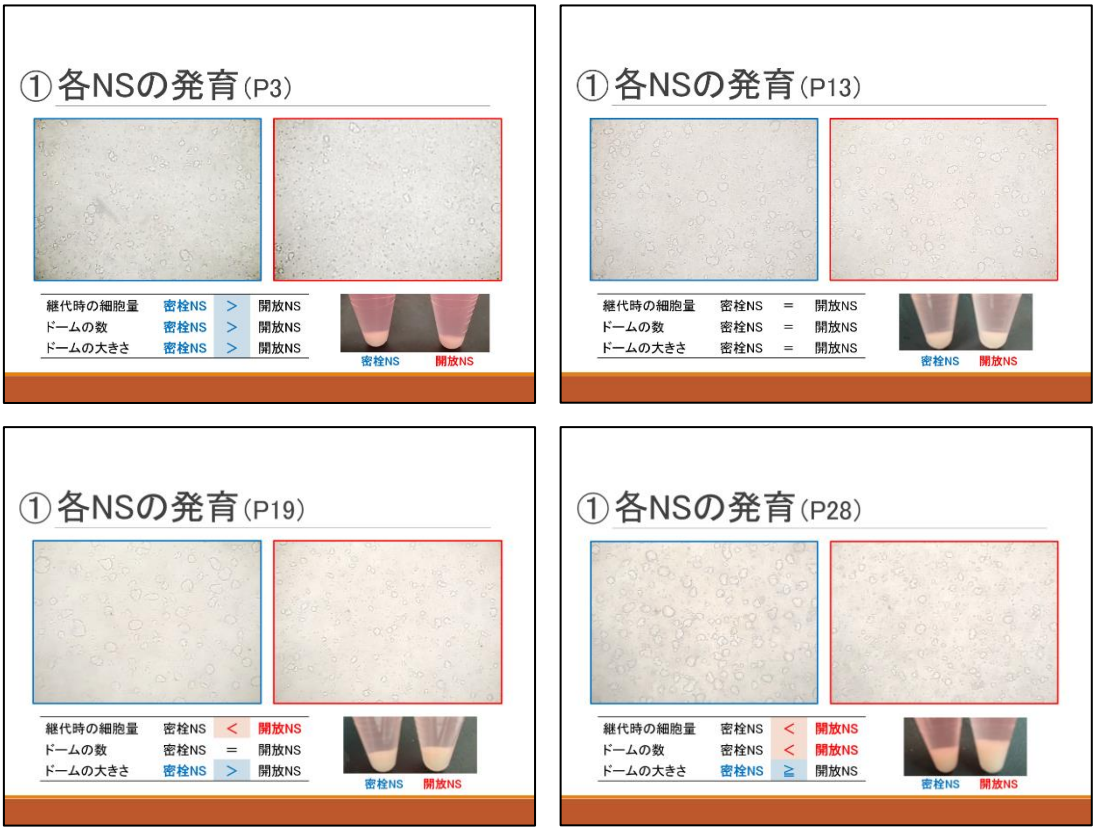

図 3　各継代数(P3, P13, P19, P30)における細胞像

②各 NS における CSFV の力価

各継代数の密栓 NS 及び開放 NS における CSFV の力価は図 4 に示すとおりである。P10、P20、P30 の継代数ごとに比較すると、密栓 NS と開放 NS で測定した力価はほぼ同程度であった。また、NS ごとに比較すると、密栓 NS 及び開放 NS のいずれにおいても、P30 ではやや低い値を示したものの、P10 と P20 では同程度の値で、CSFV 力価に有意差は認められなかった。

また、各継代数における密栓 NS 及び開放 NS の細胞像（図 5）を比較すると、P10 では発育状況に違いは見られなかったが、P20、P30 においては、ドーム数やサイズは明らかに異なっていた。

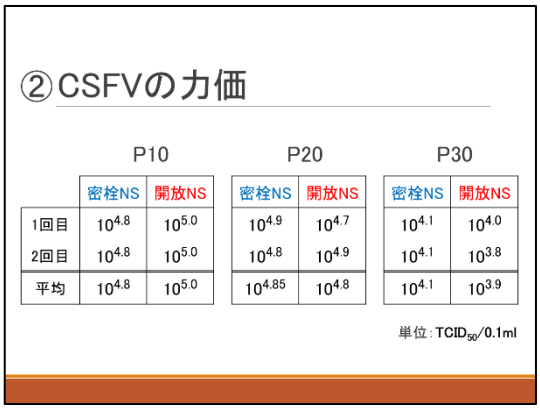

図 4　各 NS における CSFV 力価

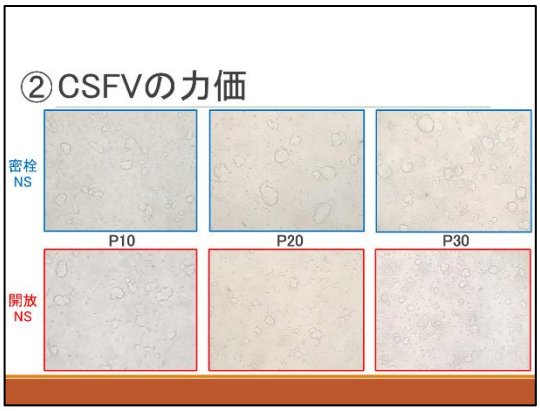

図 5　P10, P20, P30 における細胞像

③各 NS における中和抗体価

豚 No. 1～60 の血清 60 検体について、各 NS における中和抗体価は図 6 に示すとおりである。60 検体中 31 検体（51.7%）において密栓 NS、開放 NS ともに抗体価は同じ値を示した。残り 29 検体のうち、密栓 NS の方が高い抗体価を示したのは 20 検体（33.3%）、開放 NS の方が高い抗体価を示したのは 9 検体（15.0%）あった。密栓 NS の方が高値を示した検体が多く見られたが、いずれの場合も 2 管以上の抗体価の差は認められなかった。

また、各 NS における中和抗体価の分布を図 7 に示した。分布状況やピークの抗体価は異なるものの、中央値はいずれも 96 倍であり、密栓 NS と開放 NS の間に有意差は認められなかった。

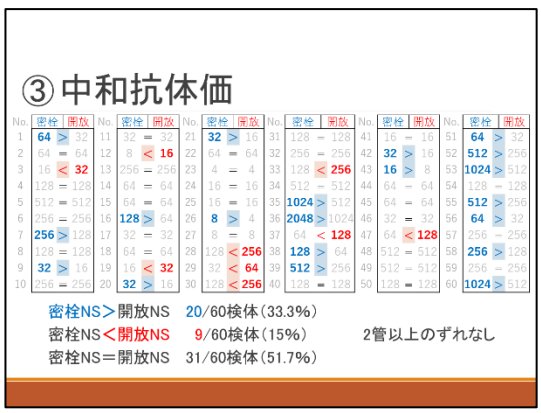

図 6　各 NS における中和抗体価

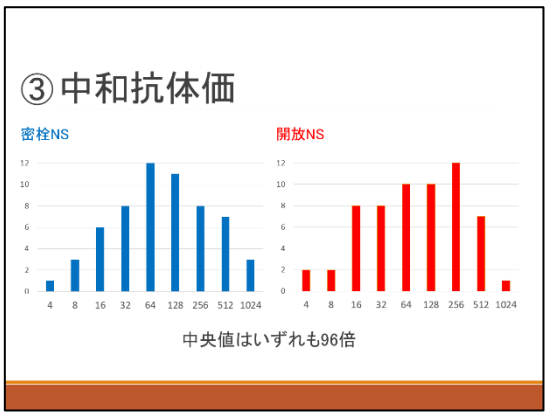

図 7　各 NS における抗体価の分布

【まとめと考察】

密栓 NS と開放 NS の発育状況については、継代時の細胞量、ドームの数やサイズといった外貌は異なるものの、いずれも問題なく発育した（図 8）。また、継代時のトリプシン消化時間や遠心後における細胞塊の再懸濁のしやすさなど、継代の手技的な観点においても、密栓 NS 及び開放 NS の間に特段違いは感じられなかった。

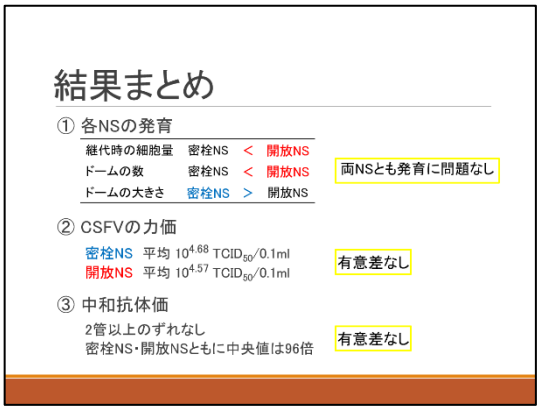

図 8　結果まとめ

CSFV の力価については、P30 で両 NS ともにやや低値を示したものの、継代数ごとや NS ごとで比較しても大きな差は認められなかった。各 NS 計 6 回の平均力価で比較すると、密栓 NS は $10^{4.68}$ $TCID_{50}$/0.1ml、開放 NS は $10^{4.57}$ $TCID_{50}$/0.1ml であり、両者の間に有意差は認められなかった。また、力価測定時の各継代数における細胞像が異なっていたことから、NS の発育状況は CSFV の力価に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

中和試験において、密栓 NS と開放 NS で異なる中和抗体価を示した検体が 48.3%存在したが、各 NS 間で 2 管以上の抗体価の差が認められなかったこと、中央値はいずれの NS においても 96 倍であったことから、中和抗体価の差は誤差の範囲内である可能性が考えられた。

以上の結果から、NS の培養方法を密栓培養から開放培養に変更しても、細胞継代や検査結果に概ね影響はないことが示唆されたが、中和試験を実施する過程で、両 NS 間で大きく異なる点が確認された。

中和試験判定時の各 NS における細胞像を図 9 に示す。密栓 NS では、細胞変性効果（以下、CPE）陰性の視野で明瞭なドームが散見されるが、CPE 陽性の視野ではドームが消失しており、CPE を起こした細胞塊が容易に確認できることから、低倍率でも陽性または陰性の判定が即時可能であった。一方、開放 NS では、密栓 NS と比べて細胞の増殖が良く、CPE 陰性であっても過増殖による細胞塊が視野全体に散在するため、陽性時の CPE による細胞塊の判別が困難になっており、右下の囲みに示したように、高倍率で細胞の形状を確認する必要があることから、密栓 NS よりも判定に時間を要した。

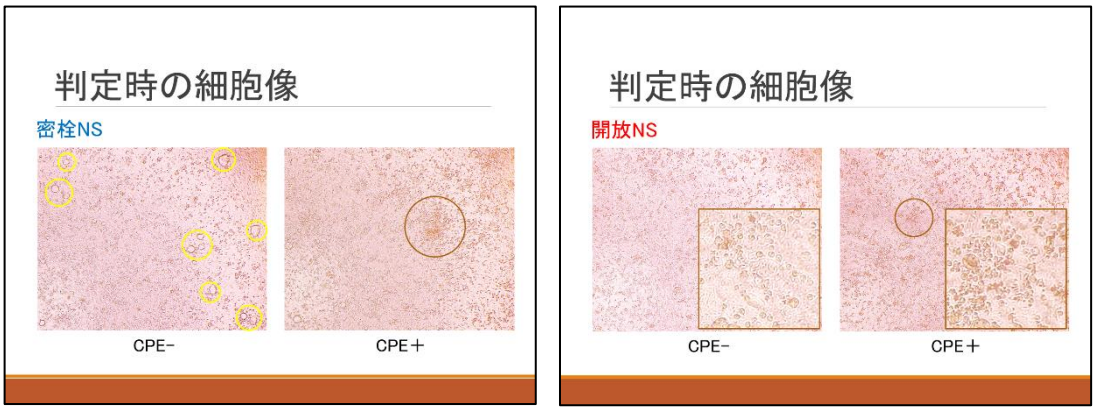

図 9　各 NS における中和試験判定時の細胞像（◯：ドーム、◯：CPE）

以上を踏まえた結論として、培養方法の変更は検査結果等に影響を及ぼさないものの、中和試験判定時にCPEが確認しやすく判定が容易であることから、本県においては、従来どおりの密栓培養の方が使用に適していると判断した。ただし、細胞の状態は、継代を実施する個人や培地作製に使用する水質などによっても変化するため、各都道府県のNSに合った培養方法を検討する必要があると考える。