

豚流行性下痢の免疫組織化学的診断における 回腸下部の重要性と必要な検査頭数

阿部祥次^{1)†} 飯塚綾子¹⁾ 藤田慶一郎¹⁾ 濱谷景祐¹⁾
播谷 亮²⁾ 川島健司²⁾

- 1) 栃木県県央家畜保健衛生所 (〒321-0905 宇都宮市平出工業団地 6-8)
2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2015年10月26日受付・2016年1月7日受理)

要 約

本研究の目的は、豚流行性下痢 (PED) の免疫組織化学的染色 (IHC) で最も診断的価値が高い腸管の部位と PED の検出に必要な頭数を調べ、IHC による診断の特異性と有効性を改善することである。PED を発症した 18 農場の 56 頭を調べた。腸管の各部位について PED ウイルスに対する IHC を行い、農場ごと及び腸管部位ごとの陽性率を調べた。さらに小腸における絨毛と陰窩の長さの比 (絨毛の萎縮比率) と IHC の陽性面積を計測した。陽性豚の割合は、1 農場が 33% (1/3 頭) でほかの農場はすべて 60% (3/5 頭) 以上であった。回腸下部は IHC 陽性率が 100% であり、最も高値であった。絨毛の萎縮比率は材料間に差はなく、陽性面積は回腸が空腸より有意に高かった ($P < 0.05$)。以上のことから、発症豚 3 頭の回腸下部について IHC を実施することで、PED の正確かつ効率的な診断ができると考えられた。——キーワード：診断、必要頭数、免疫組織化学染色、回腸下部、豚流行性下痢。

-----日獣会誌 69, 138~142 (2016)

豚流行性下痢 (PED) は、新生豚において水様性下痢を起し、致死率が高い急性ウイルス性疾患である。PED ウイルス (PEDV) は腸上皮細胞に感染し、その結果腸絨毛が萎縮して小腸壁の菲薄化が起こる [1-3]。PED の発生は、2010 年からアジアや北米で大規模に起こっている [4]。日本では、2013 年の発生以降全国的に流行し、2015 年 9 月 13 日現在、計約 1 千戸の 150 万頭が発症し、約 50 万頭が死亡した (農林水産省: <http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/ped.html>)。PED は、届出伝染病であり、家畜保健衛生所においてその多くが診断されている。免疫組織化学的染色 (IHC) は、その特異性と信頼性から、日本では PED 診断の必要不可欠な手法となっている [5]。IHC において、PEDV 抗原は、空腸と回腸でよく検出されることが過去の研究で報告されているが [5]、流行時には多検体について IHC を正確かつ効率的に行う必要があり、必要となる頭数や最適な腸管の検査部位についての情報は少なかった。本研究の目的は、IHC を用いた PED 診断の

特異性と利便性を改善するため、野外 PED 発症豚のサンプルを用いて IHC における最も診断的価値が高い腸管の部位を調査するとともに、PED 発症の急性期に必要なとなる検査頭数の目安を調査することである。

材料及び方法

材料：突然複数腹の哺乳豚へ急速に下痢が広がり、PED が疑われた 18 農場において、2~7 頭の子豚 (中央値: 3, 計 56 頭) を剖検し、主要臓器、脳、胃、十二指腸、空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸中部、回腸下部、回盲部、結腸、直腸を採取した。なお、回盲部から頭側 5cm までを回腸下部、15~20cm を回腸上部とした。

病理組織学的検査：組織材料は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、組織切片を厚さ 4 μ m で作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。胃及び腸管の切片については抗 PEDV 免疫家兔血清 [5] により、市販の IHC キット (ヒストファイ

† 連絡責任者：阿部祥次 (栃木県県央家畜保健衛生所)

〒321-0905 宇都宮市平出工業団地 6-8

☎ 028-689-1200 FAX 028-689-1279

E-mail: abet07@pref.tochigi.lg.jp

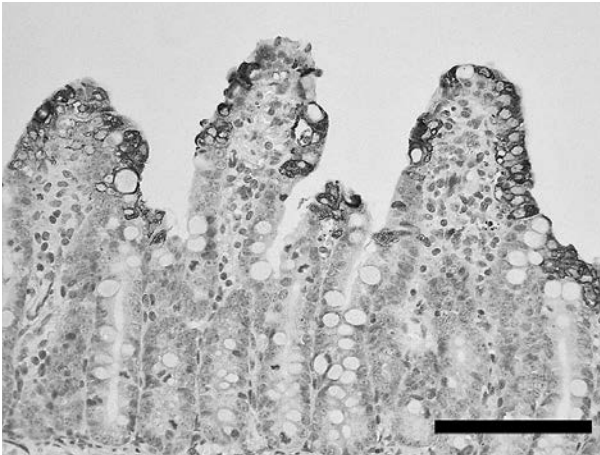


図1 回腸
PEDV抗体に対し陽性を示す絨毛上皮細胞が認められる (IHC Bar=100 μ m).



図2 回腸
画像処理ソフトで白黒化し、陽性面積の計測に用いた (IHC 白黒化処理).

ンシンプルステイン MAX-PO (MULTI) 及びシンプルステイン AEC 溶液, (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用い IHC を行った. いずれかの組織で PEDV 抗原が検出された個体については, 胃及び腸管の各部位におけるウイルス抗原検出率を測定した.

絨毛と陰窩長の比 (絨毛の萎縮比率) と IHC 陽性面積の測定: IHC で陽性を示した個体のうち, 死後変化の影響がなく良好な組織構造を保っていた個体の空腸上部, 空腸下部, 回腸上部及び回腸下部の HE 染色切片について, 管腔側が入るように統一し, 顕微鏡写真 ($\times 400$ 倍) をランダムに 4 カ所ずつ撮影し, 絨毛の萎縮比率を測定した. さらに, IHC 切片を同様に撮影し, 画像解析ソフト (Photoshop, Adobe Systems, U.S.A. 及び ImageJ, National Institutes of Health, U.S.A.) を用い [6], 陽性反応である赤色以外のすべての強度を下げ, 閾値を一定にした状態で白黒化し, スケールバーを元に単位を μm^2 として IHC 陽性面積を測定した (図 1, 2). すべての測定値は, 統計処理として平均値と標準誤差を算出し, Tukey 検定で比較し, $P < 0.05$ を統計学的な有意差とした.

成 績

陽性豚の摘発率: 18 農場 48 頭の腸管組織が IHC で陽性を示した. 陽性豚は各農場で確認され, 農場ごとの陽性豚の割合は 1 農場の 33.3% (1/3 頭) を除くすべての農場で, 60% (3/5 頭) 以上であった (図 3). 18 農場における陽性豚摘発率の平均は 85.7% (48/56 頭) であった. ほかの 8 頭は, 4 頭が陰性で, 4 頭が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.

陽性抗原検出率: 空腸上部, 空腸下部, 回腸上部及び回腸下部の 4 カ所すべてが採材されていた 44 頭の各部

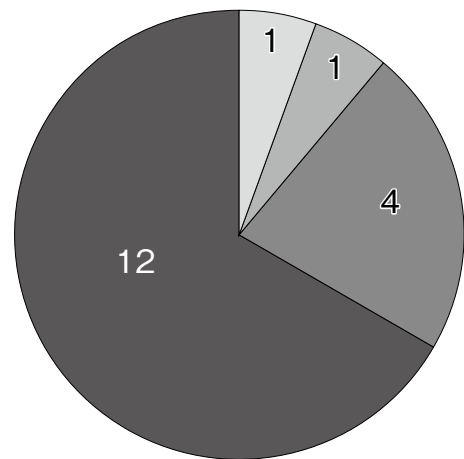


図3 各農場における IHC 陽性豚の摘発率とその農場数
IHC 陽性豚の割合は, 1 農場が 33.3% (1/3 頭), その他すべての農場が 60% (3/5 頭) 以上であった.

位における IHC 陽性率はそれぞれ, 胃が 0%, 十二指腸が 35.7%, 空腸上部が 81.8%, 空腸下部が 90.9%, 回腸上部が 95.5%, 回腸下部が 100%, 回盲部回腸側が 100%, 回盲部盲腸側が 46.2%, 盲腸が 44.7%, 結腸が 43.9%, 直腸が 2.4% であり, 回腸下部と回盲部回腸が最も高値を示した (図 4).

絨毛の萎縮比率と陽性面積: 死後変化の影響を考慮し, 44 頭のうち 30 頭について絨毛の萎縮比率と陽性面積を測定した. 絨毛の萎縮比率は, 空腸上部が 1.82 ± 0.17 (最小値 0.74 ~ 最大値 4.75) : 1, 空腸下部が 1.88 ± 0.11 (1.21 ~ 4.03) : 1, 回腸上部が 1.86 ± 0.18 (1.01 ~ 4.87) : 1, 回腸下部が 1.82 ± 0.16 (0.96 ~ 5.53) : 1 で, 正常値の 7 : 1 に比べ低値を示したが, 材料間で差は認められなかった (図 5, 左). IHC 陽性面積はそれ

豚流行性下痢診断における回腸下部の重要性と必要な検査頭数

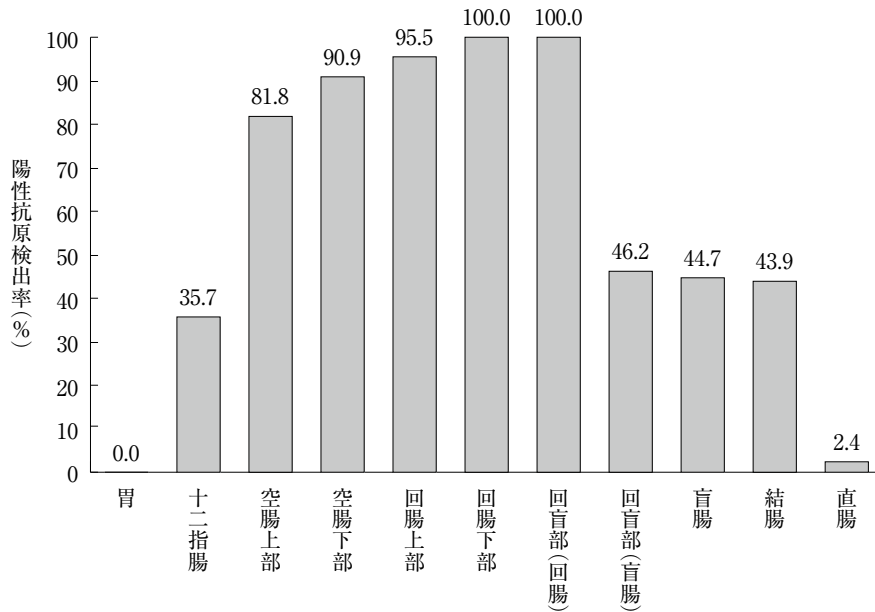


図4 IHC 陽性豚の胃及び各腸管における PEDV 抗原の検出率

回腸下部と回盲部回腸は 100% であり、検出率が最も高かった（胃及び十二指腸：n=42，空腸及び回腸：n=44，回盲部回腸：n=36，回盲部盲腸：n=39，盲腸：n=38，結腸：n=41，直腸：n=42）。

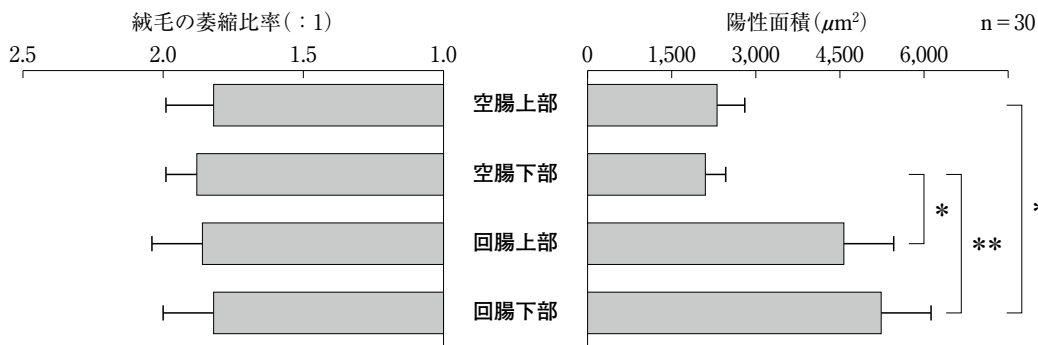


図5 空腸と回腸における絨毛の萎縮比率（左）と陽性面積（右）

萎縮比率に差はなく、陽性面積は回腸が有意に高値を示した（*：P<0.05，**：P<0.01）。

それぞれ $2,309 \pm 501$ (0~13,302) μm^2 、 $2,100 \pm 363$ (0~6,369) μm^2 、4,570 (0~15,796) μm^2 及び $5,236 \pm 889$ (12~21,728) μm^2 で、回腸の陽性面積は空腸の約 2 倍であり、さらに、回腸上部は空腸下部に対して、回腸下部は空腸上部及び下部に対してそれぞれ有意に ($P=0.042<0.05$, $P=0.010<0.05$, $P=0.005<0.01$) 高値を示した (図5, 右)。絨毛の萎縮比率と陽性面積間に相関は認められなかった。

考 察

今回、正確な回腸採材部位の選定や画像解析による陽性面積の評価を行ったことで、統一性が高く、客観性に富む結果を得ることができたと考えられる。農場ごとの陽性豚の割合や平均摘発率 (85.7%) から、農場内の哺乳豚

が一斉に感染・発症する急性期では、1 農場につき発症豚 3 頭を検索することで、問題なく PED の診断ができると考えられた。疾病の有無を調べるための一集団あたりの検査頭数は、有病率が 80% 以上であれば母数が 10,000 頭であっても無作為に 4 頭 (3.25 頭) を検査することで 95% の信頼性が得られる [7]。実際の現場では下痢を発症している個体を選定できることを踏まえると、現実的な数字と考えられる。なお、腸管は死後変化に鋭敏な組織であり粘膜上皮が容易に脱落するため、今回確認された 4 頭のように死亡個体では判定不能及び再検査が必要となる危険性があり、鑑定殺した個体を材料に供す必要があると考えられた。

一方、慢性化した際やワクチン接種により群内の抗体保有率が上昇すると、有病率の低下、感染抗原量の減少

や発症率の低下が想定される。有病率が30%の場合、母数を10,000頭とすると少なくとも10頭の検査が必要となる [7]。そのようなケースでは発症豚を選定しても検査頭数を増やす必要があるかもしれないため、今後さらなる調査が必要である。

今回の調査において、陽性抗原は空腸及び回腸で高頻度に検出され、十二指腸、盲腸及び結腸は中頻度～低頻度、胃では検出されず、Sueyoshiら [5] の報告とおおむね一致した。Debouckら [2] は、PEDVの実験感染豚における絨毛の萎縮比率は2.3～1.5:1であったと報告している。一方、Sueyoshiら [5] は、野外感染豚で最も重度に絨毛が萎縮していた個体は1:1であったと報告している。今回、最も重度に萎縮していた部位の比は1:1を下回り、Sueyoshiら [5] の報告と同様であった。また、Sueyoshiらは小腸粘膜におけるPEDV抗原陽性細胞数は、絨毛の萎縮程度が重度になるにつれて減少する傾向にあると報告している。今回の調査で陽性面積と絨毛の萎縮比率に相関性が認められなかった理由として、評価の手法が異なることや、今回の症例の多くは絨毛の萎縮が重度であり、萎縮の程度に偏りが出たためと考えられた。

小腸における絨毛と陰窩長比の結果から、HE染色標本では空腸と回腸で同等の萎縮病変が観察されたが、回腸下部はIHCの陽性抗原検出率及び陽性面積で高値を示し、PEDのIHCにおいて最も感度が高いと考えられた。さらに、回盲部の存在により、特定の領域を正確かつ簡便に採取できる利点を持つことから、PEDの病理診断には回腸下部の検索が最も有効であると考えられた。回盲部は回腸と盲腸の運動様式に相違があり内容物が停滞する。したがって、上部で増殖した多量の

PEDVを含む腸内容物が回腸下部で停滞し、腸上皮細胞への感染が活発に起こっていたため、回腸下部の検出率が高かったのかもしれない。

以上のことから、発症生体3頭を用いた回腸下部を中心とするIHCによる検索を行うことで、PEDの正確かつ効率的な病理診断ができると考えられた。

引用文献

- [1] Coussement W, Ducatelle R, Debouck P, Hoorens J : Pathology of experimental CV777 coronavirus enteritis in piglets, histological and histochemical study, *J Pathol*, 19, 46-56 (1982)
- [2] Debouck 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)
- [3] Saif LJ, Pensaert MB, Sestak K, Yeo SG, Jung K : Porcine epidemic diarrhea virus, *Disease of swine*, Zimmerman J, et al eds, 10th ed, 514-516, Iowa State Press, Iowa (2012)
- [4] European Food Safety Authority (EFSA) : Scientific opinion on porcine epidemic diarrhea and emerging porcine deltacoronavirus, *EFSA Journal*, 12, 3877 (2014)
- [5] 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)
- [6] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri, KW : NIH Image to ImageJ, 25 years of image analysis, *Nature Methods*, 9, 671-675 (2012)
- [7] 杉浦勝明 : 標本抽出, 獣医疫学, 小川益男他編, 第1版, 43-55, 近代出版, 東京 (2005)

Significance of the Lower Part of Ileum and the Required Head Count
for the Immunohistochemical Diagnosis
of Porcine Epidemic Diarrhea

Tadatsugu ABE^{1)†}, Ayako IIZUKA¹⁾, Keiichiro FUJITA¹⁾, Keisuke HAMATANI¹⁾,
Makoto HARITANI²⁾ and Kenji KAWASHIMA²⁾

1) *Tochigi Prefectural Kenou Livestock Hygiene Service Center, 6-8 Hiraidekogyodanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

This study aimed to improve the specificity and diagnostic utility of immunohistochemistry (IHC) in the diagnosis of porcine epidemic diarrhea (PED). To achieve this aim, we investigated the portion of the intestine that has greatest diagnostic value and the required head count for the detection of PED using IHC. We investigated 56 piglets on 18 farms that had developed PED. We performed IHC against the PED virus in each part of the intestine, and investigated the positive rate on each farm and each part of the intestine. In addition, we calculated the ratio of length between villus and crypt (ratio of villous atrophy) and the IHC-positive area in the small intestine. The rate of positive piglets was 33% (1/3) on one farm, while it was above 60% (3/5) on all the other farms. The lower part of the ileum exhibited the highest value of IHC-positive ratio at 100%. Although there were no differences in villous atrophy between the intestines, the IHC-positive area in the ileum was significantly higher than that in the jejunum ($P < 0.05$). Our results suggest that PED can be diagnosed accurately and effectively by examining the lower part of the ileum of approximately three piglets.

— Key words : diagnosis, required head count, immunohistochemistry, lower part of ileum, porcine epidemic diarrhea.

† Correspondence to : Tadatsugu ABE (*Tochigi Prefecture Kenou Livestock Hygiene Service Center*)

6-8 Hiraidekougyoudanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan

TEL 028-689-1200 FAX 028-689-1279 E-mail : abet07@pref.tochigi.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 138 ~ 142 (2016)