

本県で初めて発生した H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザの病理組織学的考察

中央家畜保健衛生所

○松本裕治・森谷翠・小泉舜史郎・村田拓馬

I はじめに

高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）は伝染力が強く高致死性を有する感染症¹⁾である。病理組織学的には主に脾臓や膵臓などの壊死が特徴的であり、HPAI ウイルス（HPAIV）抗原は感染 2～3 日後には血管内皮細胞で認められ、4～5 日後には顕著に減少する²⁾。その後は脾臓や膵臓等の壊死部で HPAIV 抗原がみられる³⁾。

本県では令和 3 年 12 月に初めて HPAI の発生が確認され、病性鑑定を実施した結果、HPAI で比較的好くみられる脾臓及び膵臓の壊死等とは異なる病理組織学的所見を得たので報告する。

II 発生概要

採卵鶏（ボリスブラウン）を 17,000 羽飼養する養鶏場で、令和 3 年 12 月 6 日、4 鶏舎のうち 1 鶏舎で 26 羽がまとまって死亡していると畜主から通報があった。管轄家保職員が発生鶏舎に立ち入ったところ、うずくまり、斜頸を呈している鶏が 1 羽確認された。高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針（以下、指針）に則り、死亡鶏 11 羽及び生鶏 2 羽を用いて簡易検査を実施したところ、全羽の気管スワブ及び死亡鶏 4 羽のクロアカスワブで陽性反応が認められた。

III 材料及び方法

1 材料

180 日齢の生鶏 2 羽（No. 1 及び No. 2）及び死亡鶏 5 羽（No. 3～7）をウイルス学的検査及び病理組織学的検査に供した。同居鶏 3 羽（No. 8～10）の血清を ELISA 法による抗体検査に供した。（表 1）

表 1 検体一覧

検体No.	生死	気管	血清	簡易検査	解剖	品種	日齢	備考
1	生	○	○	陽性	○	ボリスブラウン	約180日	
2	生	○	○	陽性	○	"	"	
3	死	○		陽性	○	"	"	
4	死	○		陽性	○	"	"	
5	死	○		陽性	○	"	"	
6	死	○		陽性	○	"	"	
7	死	○		陽性	○	"	"	
8	生		○			"	"	同居鶏
9	生		○			"	"	同居鶏
10	生		○			"	"	同居鶏

2 方法

(1) 病理学的検査

No. 1～7 の肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳等を採材した。採材した各臓器は 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。固定した組織はパラフィンワックスに包埋し、厚さ 1.5 μ m で薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。

さらに、No. 2 についてマウス抗インフルエンザ A 抗体 (NP) (HYB-340-05、Statens Serum Institut 社) を用いて A 型インフルエンザウイルス (IAV) に対する免疫組織化学的検査 (IHC) を実施した。

(2) ウイルス学的検査

気管スワブの乳剤を材料として、遺伝子検査 (コンベンショナル PCR、リアルタイム PCR) を実施した。また、PCR が陽性となった検体については農研機構動物衛生研究部門にシーケンス解析を依頼した。

気管スワブの乳剤を材料として、指針⁴⁾に記載された方法でウイルス分離を実施した。その他、血清を材料に市販キット

(IDEXX インフルエンザ A エリーザキット、アイデックスラボラトリーズ株式会社) を用いた ELISA 法による抗体検査を実施した。

IV 検査成績

1 病理学的検査

(1) 剖検所見

No. 4 及び No. 6 の 2 羽で鶏冠先端部のチアノーゼが認められた。その他肝臓の退色や赤色斑、脾臓の暗赤色化などがみられた。(表 2)

表 2 剖検所見

検査番号 部 位	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
体重・性別	1.16kg	1.52kg	1.52kg	1.42kg	1.22kg	1.48kg	1.61kg
日 齢	178日齢	178日齢	178日齢	178日齢	178日齢	178日齢	178日齢
死殺の別	鑑定殺	鑑定殺	斃死	斃死	斃死	斃死	斃死
外 貌	著変なし	軽度消瘦	著変なし	鶏冠先端部辺縁軽 度暗赤色 消瘦	著変なし	鶏冠先端部チアノー ゼ	著変なし
皮下組織	著変なし	著変なし	著変なし	乾燥感あり 頸部～胸部、両内股 部暗緑色	著変なし	著変なし	著変なし
腹 腔	著変なし	著変なし	著変なし	乾燥感あり 気嚢軽度白色混濁	著変なし	著変なし	著変なし
胸 腔	著変なし	著変なし	著変なし	気嚢軽度白色混濁	著変なし	著変なし	著変なし
肝 臓	脆弱、退色、腫大 1mm大赤色斑散在	退色、赤色斑散在	軽度退色部散在	辺縁暗赤色、脆弱	暗赤色、脆弱	軽度退色部散在	軽度退色部散在
脾 臓	著変なし	著変なし	軽度腫大、暗赤色	漿膜面暗赤色、脆弱	著変なし	軽度退色部散在	軽度腫大、暗赤色
腎 臓	著変なし	著変なし	暗色	脆弱	軽度脆弱	著変なし	暗色
心 臓	著変なし	著変なし	軽度退色	心嚢軽度肥厚	著変なし	著変なし	軽度退色 心尖部に結合織増生
肺	著変なし	著変なし	暗色	胸腔面灰色	著変なし	著変なし	軽度退色
中枢神経系	NT	NT	NT	脆弱	著変なし	著変なし	NT
消化器系	NT	NT	胃 著変なし 腸 軽度退色	NT	NT	NT	胃 著変なし 腸 軽度退色
その他	NT	卵巣・卵管 未発達	卵巣・卵管 未発達	F嚢なし 卵巣・卵管 未発達	NT	NT	卵巣・卵管 未発達

※NT:検査せず

(2) 病理組織学的検査

肝臓では広範囲で肝細胞の淡明化がみられた。肝細胞の細胞質には空胞変性がびまん性に認められ、特に No. 3、4、6、7 で顕著であった (図 5)。No. 3、5、6、7 では脾臓の白脾髄に限局して巣状壊死がみられ、壊死巣は脾臓全体で散発的にみられた (図 6)。

心臓では多発性に心筋の壊死が認められた (図 1)。壊死巣にはリンパ球やマクロファージの浸潤が認められた (図 2)。このような壊死は全羽で認められ、特に No. 2、4、5 で顕著であった。No. 2 の脳では血管周囲及び髄膜にリンパ球の浸潤がみられた。また、No. 5、6、7 では大脳全体で神経細胞の巣状壊死が散発的にみられた (図 7)。

(3) 免疫組織化学滴検査

IHC では、心臓の壊死巣の心筋細胞、脳の神経細胞やグリア細胞、髄膜細胞等に多数の IAV 抗原が認められた (図 3、4)。また、腎臓の髄質及び皮質の尿細管上皮細胞、気管の気管上皮細胞、肺の気管支上皮細胞でわずかに IAV 抗原が検出された。血管内皮細胞やその他の諸臓器において IAV 抗原は認められなかった。(表 3)。

表 3 病理組織学的検査 (HE 染色)

検査番号 部 位	組 織 変 化	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
肝 臓	うっ血・死後変化	+	+	+++	++++	+	++++	++++
	空胞変性	++	+	+++	+++	-	++++	++++
	肝三つ組み周囲リンパ球浸潤	++	+	++	-	++	-	+
	偽好酸球浸潤	±	+	+	-	+	-	+
	動脈及び中心静脈周囲リンパ球浸潤	+	+	++	-	+	-	++
脾 臓	うっ血・死後変化	+	++	+++	++	+	++	++
	リンパ小節消失	+	+	+	+	+	++	++
	壊死	-	±	+++	±	+	++	±
	ヘモジデリン食マクロファージ	-	++	+	++	+++	+	±
	球菌塊(死後増殖)	-	-	-	-	-	-	++
腎 臓	うっ血・死後変化	++	+++	++	++	+++	+++	++
	間質にリンパ球浸潤	+	-	-	-	-	-	-
	間質に球菌塊	-	-	-	-	-	-	+
心 臓	左心及び右心共通							
	うっ血・死後変化	-	-	+	+	+	+	+
	左心							
	巣状壊死	-	++	+	+	++	+	-
	壊死巣周囲にリンパ球及びマクロファージ浸潤	-	++	+	+	++	+	-
	心内膜にムコ多糖様物沈着	-	+	+	-	-	-	-
	右心							
	巣状壊死	+	+++	++	+++	+++	+	+
	壊死巣周囲にリンパ球及びマクロファージ浸潤	+	+++	++	+++	+++	+	+
	心内膜にムコ多糖様物沈着	-	-	++	-	+	-	-
	心室中隔							
	巣状壊死	+	++	+	+	++	++	++
	壊死巣周囲にリンパ球及びマクロファージ浸潤	+	++	+	+	++	++	+
心内膜にムコ多糖様物沈着	-	+++	-	-	-	-	-	
肺	うっ血・死後変化	++	++	+++	++	++	++	++
	肺胞中隔肥厚	+	±	++	±	-	±	+
	肺胞中隔リンパ球及びマクロファージ浸潤	+	+	++	+	-	-	+
	小葉間結合織内一部壊死	+	±	-	-	-	-	+
	偽好酸球及びリンパ球浸潤	+	-	++	-	+	±	+
	炎症細胞退廃物貯留(壊死周辺部)	++	-	-	-	-	-	-
	気管支壁にリンパ球浸潤	+	-	++	+	+	-	+
	旁気管支内に異物	-	-	-	-	++	-	-
中枢神経系	死後変化	-	-	±	±	±	+	±
	髄膜 リンパ球及びマクロファージ浸潤	+	+	+	+	+	+	+
	大脳 皮質 微小壊死	-	一か所	一か所	-	+	+	+
	乏血性変化	-	-	+	-	+	±	±
	リンパ球及び偽好酸球の囲管性細胞浸潤	-	+	-	+	-	+	-
	髄質 微小壊死	-	-	一か所	一か所	+	+	+
消化器系	小脳 顆粒細胞層 微小壊死	NT	NT	NT	NT	一か所	NT	NT
	気管 上皮層肥厚及びリンパ球浸潤	+	+	NT	NT	NT	NT	NT
その他	うっ血	-	+	NT	NT	NT	NT	NT
	肉冠 真皮表在層にリンパ球及び偽好酸球浸潤	NT	NT	NT	+	NT	++	NT

※NT: 検査せず

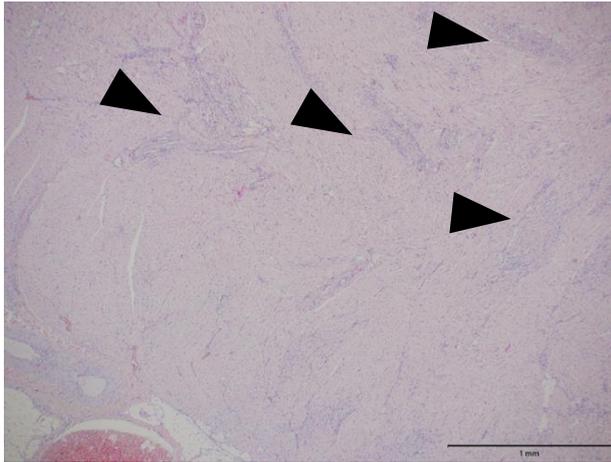


図 1 心臓 (HE 染色)
矢頭：壊死巣

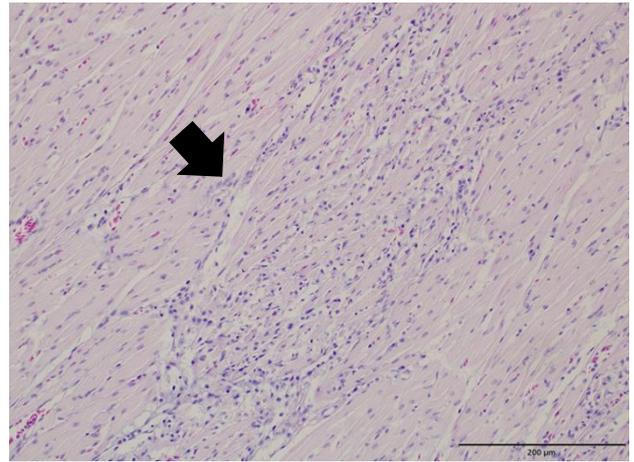


図 2 心臓 (HE 染色)
矢印：壊死性心筋炎



図 3 脳 (IHC)

褐色に染色された部分：ウイルス抗原

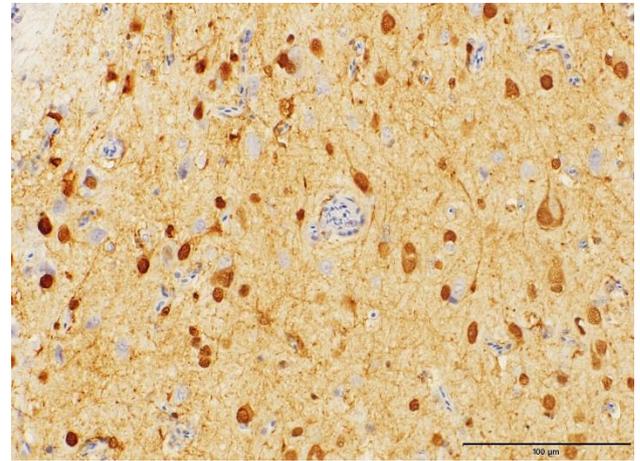


図 4 脳 神経細胞等 (IHC)

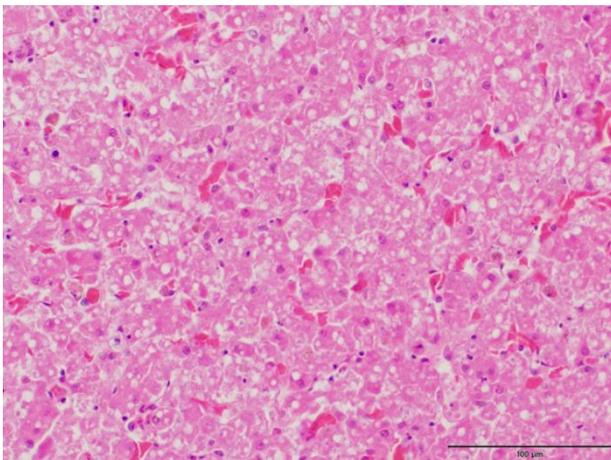


図 5 肝臓 肝細胞の空胞変性 (HE 染色)

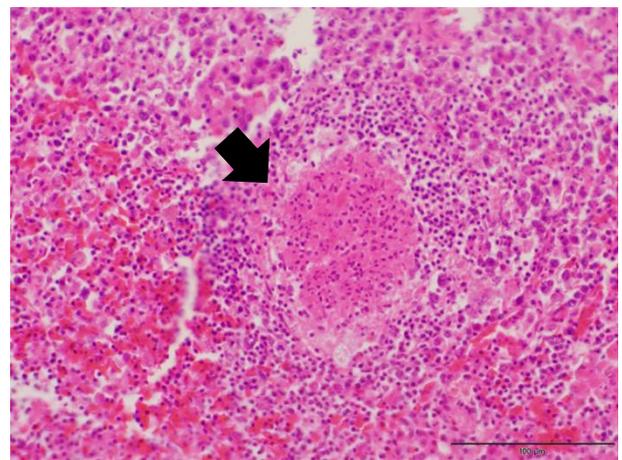


図 6 脾臓 (HE 染色)
矢印：白脾髄の巣状壊死

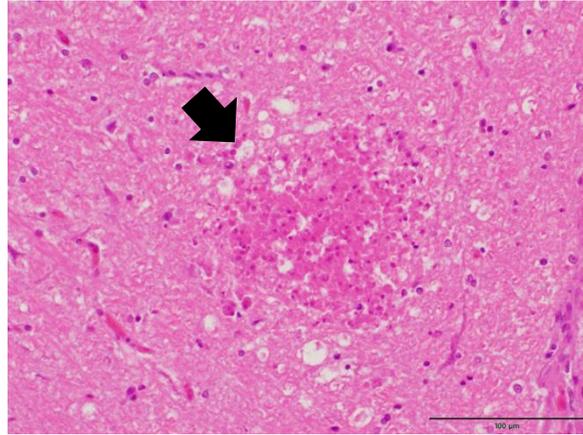


図 7 脳 (HE 染色)

矢印：神経細胞の巣状壊死

2 ウイルス学的検査

遺伝子検査では、コンベンショナル PCR、リアルタイム PCR とともに全羽で H5 亜型の IAV 特異遺伝子が検出され、農研機構動物衛生研究部門で実施されたシーケンス解析の結果、H5N1 亜型の HPAIV と同定された。

ELISA 法による抗体検査では No. 1 及び No. 9 が陽性と判定された。

V まとめと考察

今回、H5N1 亜型の HPAIV に感染した鶏全羽で壊死性心筋炎が認められた点の特異的であった。心筋の壊死は IAV 感染後 3 日程で出現し、心筋炎は感染後 1 週間程で出現するとの報告⁵⁾がある。また、抗体検査陽性の個体が確認されたことから、感染からの経過が長いと推察された。

IHC を実施した No. 2 の心筋と脳ではびまん性にウイルス抗原が検出された。血管内皮細胞ではウイルス抗原がみられなかったことから No. 2 は血管内皮細胞でのウイルスの増殖が終わり、全身の各組織内にウイルスが移行した状態であったと考えられた。

また、No. 2 の脳では全体でウイルス抗原が検出された。死亡鶏では壊死がみられたことから、鑑定殺した No. 2 の病期は壊死が起こる前の段階であったと考えられた。

海外の鶏を用いた HPAI の感染実験では、ウイルス株や鶏の品種によって病態や組織所見が異なると報告^{6, 7)}されている。本症例でみられた壊死性心筋炎は通常の HPAI でみられる所見とは異なっており、ウイルス株の特性や鶏の品種に起因した可能性が考えられた。今後ウイルスが変異することによって臨床症状や病理組織学的所見にも変化がみられる可能性があるため、流行するウイルス株について動向を注視していく必要がある。

VI 謝辞

発表に対するご助言を賜りました、動物衛生研究部門衛生管理研究領域 病理・生産病グループ 山本佑上級研究員、山田学上級研究員に深謝いたします。

VII 参考文献

- 1) 伊藤壽啓 (2011). 高病原性鳥インフルエンザ 明石博臣ら (編) 動物の感染症<第三版>, 近代出版, 203-204.
- 2) Y. Kobayashi et al. (1996). Pathological studies of chickens experimentally infected with two highly pathogenic avian influenza viruses. *Avian Pathology*, 25:2, 285-304
- 3) 中村菊保 (2015). 高病原性鳥インフルエンザ 林俊春ら (編) 動物病理学各論<第2版>, 文永堂出版, 132
- 4) 高病原性鳥インフルエンザ及び低病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針, 別紙1 鳥インフルエンザの病性鑑定マニュアル
- 5) 谷口稔明 (1984). 家禽ペストの病理学的変化の特徴 鶏病研究会報 20 卷 3 号
- 6) Raúl Sánchez-González et al. (2020). Pathobiology of the highly pathogenic avian influenza viruses H7N1 and H5N8 in different chicken breeds and role of Mx 2032 G/A polymorphism in infection outcome. *Veterinary Research*. 51, 113
- 7) Aya Matsuu et al. (2016). Pathogenicity of Genetically Similar, H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains in Chicken and the Differences in Sensitivity among Different Chicken Breeds. *PLoS One*. 11 (4), 10.1371