

豚病研究会会報 第4号

1984年2月1日発行 事務局 / 茨城県筑波郡谷田部町観音台3-1-1(〒305) 農林水産省家畜衛生試験場内 02975-6-7848

第25回研究集会講演記録

日時：昭和58年11月25日（金）午後1時から

場所：国分寺市立本多公民館

演題：

1. 豚ロタウイルスの病原性
福所秋雄（家畜衛生試験場）
2. 豚ロタウイルスの野外調査成績
斉藤憲彦（埼玉県畜産課）
3. 豚の産褥期無乳症症候群様疾患の発生と手当
石井泰明（群馬県畜産試験場）
4. 豚の細菌性疾病の最近の知見
東 量三（家畜衛生試験場）

豚ロタウイルスの病原性

福 所 秋 雄
（家畜衛生試験場）

ウイルスによる下痢として、古くから豚伝染性胃腸炎（TGE）が知られていたが、最近になって、この疾病のほかに豚ロタウイルスによって起こる豚ロタウイルス感染症やTGEウイルスとは抗原性の異なるコロナウイルス様因子による豚流行性下痢（PED）の存在が明らかになってきた。これらの疾病の原因ウイルスのほかに、下痢便中に電顕によってエンテロウイルス、アストロウイルス様粒子、カリチウイルス様粒子、パルボウイルス、レオウイルス、アデノウイルス、乳幼児下痢に検出されている音更因子に類似した粒子、ロタウイルス様粒子および23 nm ウイルス様粒子などのウイルス粒子が検出されている。しかし、これらのウイルスと下痢との直接の因果関係については不明な点が多い。

下痢との因果関係がはっきりしていて、かつ重篤な下痢を示す病原ウイルスとして、TGEウイルス、豚ロタウイルス及びPEDウイルス

が知られている。TGEウイルスは、培養細胞での増殖が可能のため、ウイルスの感染及び免疫機構が解明され、診断及び予防法の確立まで至っている。しかし豚ロタウイルス及びPEDウイルスでは、培養細胞での増殖が困難なため、診断や予防法の確立が遅延していた。PEDウイルスの培養細胞を用いての分離培養は未だ確立されていないが、最近になって豚ロタウイルスの試験管内での有効な分離法や定量法が確立され、豚ロタウイルスに関する不明な点が解明されてきた。

そこで、この新しい手法を用い、無菌豚における豚ロタウイルスの感染動態を含めた病原性及び免疫応答について検討したので、その概略を述べる。

臨床症状： 2日齢無菌豚では、ウイルスを経口接種後18時間で元気消沈し、24時間後には激しい黄色水様下痢を示した。以後時間の経過とともに淡黄色ないし黄白色の水様性下痢となった。下痢に伴って食欲不振、動作緩慢となり、脱水症状及び消瘦を示し、3～5日後には死亡した。

一方、15日齢及び23日齢無菌豚では、ウイルスを経口接種後2日目に黄褐色水様下痢を示し、以後4～6日目まで白色凝乳を含む黄緑褐色のやや水様下痢を示したが、7～8日目には下痢は回復した。感染初期には、やや元気消沈し食欲も減退したが、下痢の終息と共に元気も回復した。

糞便へのウイルスの排泄： 2日齢無菌豚では、図1に示したように、経口接種後24時間目に下痢の始まりと共に糞便中のウイルス量は 10^6 FFU/0.2 ml以上を示し、その後死亡まで約 10^5 FFU/0.2 mlのウイルスが検出された。

15日齢無菌豚に 10^6 TCID₅₀のウイルスを経口

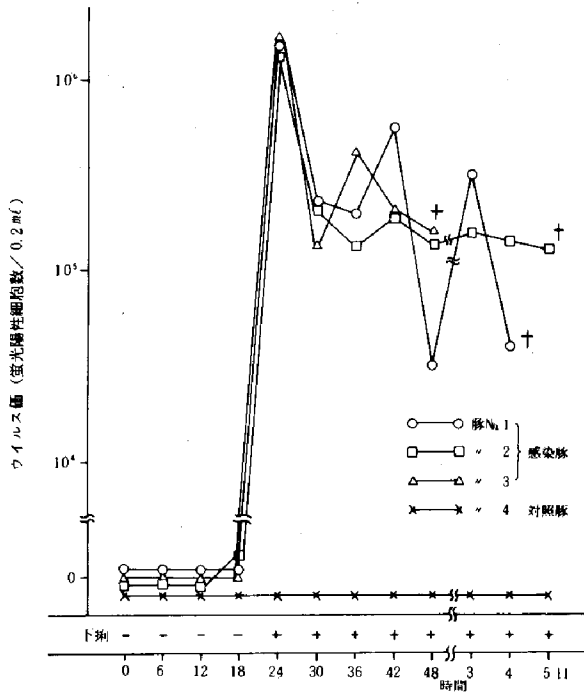


図1 豚継代豚ロタウイルスS80株経口接種
2日齢無菌豚の糞便中のウイルスの推移

接種した結果を図2に示したが、S80株では経口接種後1～2日目からウイルスの排泄が始まり、3日目にウイルスの排泄が最高 (10^5 TCID₅₀/ml) となり、7～8日目にウイルスの排泄が一時的に低下し、9～10日目に再び増加し、12日目以後にはウイルスの排泄は認められなくなった。Z株接種例では、経口接種後1日目よりウイルスの排泄が始まり、2～4日目に最高 (10^5 TCID₅₀/ml) になり、5～6日目には急激にウイルスの排泄が消失した。両株接種豚共に、下痢の終息とともに元気が回復した。

23日齢無菌豚では、図3に示したように、経口接種1日後の糞便から 10^4 FFU/0.2ml のウイルスが検出され、このウイルス量は7日後まで持続した。8日後には、約 10 FFU/0.2ml と低下し、その後検査した15日目まで継続的に微量のウイルスが検出された。

ウイルスの体内での増殖部位： 2日齢の無菌豚を用いて、経時的にウイルスの増殖部位に

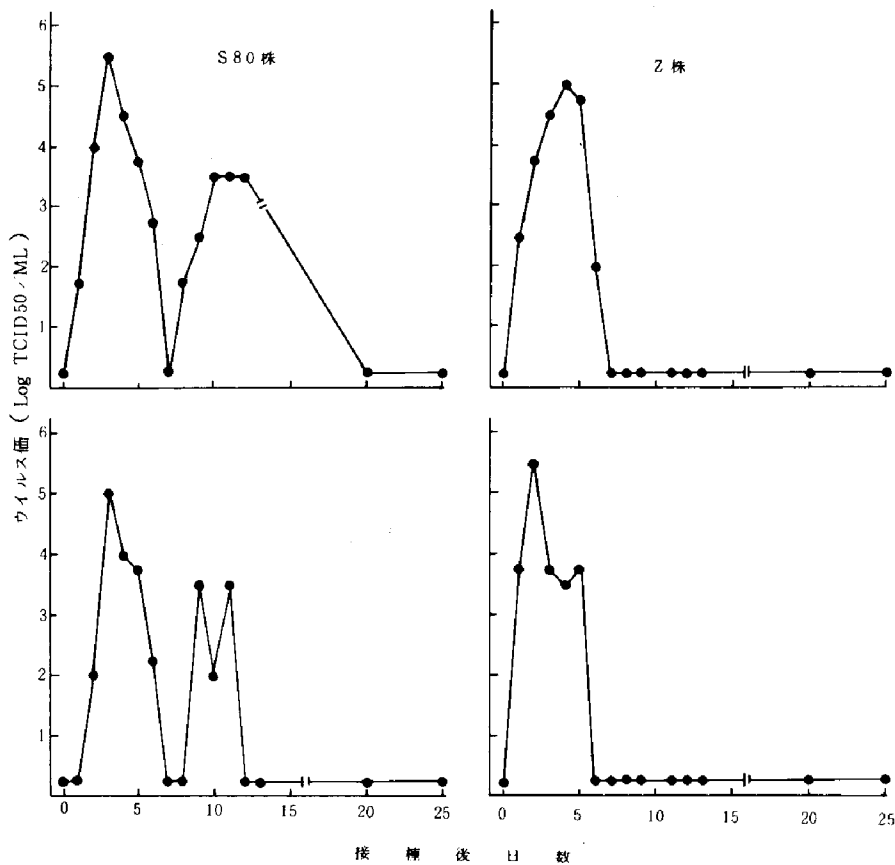


図2 細胞順化豚ロタウイルス接種15日齢無菌豚の糞便中のウイルスの推移

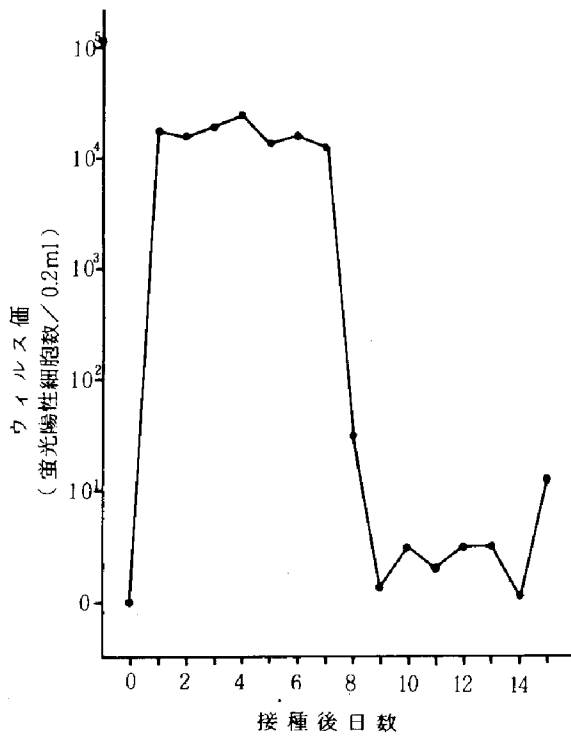


図3 豚継代豚ロタウイルスS80株経口接種23日齢無菌豚の糞便中のウイルスの推移

ついて調べた結果を表1に示した。ウイルスを経口接種後、検索したすべての豚の小腸及び腸管膜リンパ節以外の臓器からは、蛍光抗体法によるウイルス抗原は全く検出されなかった。小腸では、経口投与6時間後に十二指腸及び空腸に少数の特異蛍光抗原を有する絨毛上皮細胞が認められた。しかし、回腸では認められなかった。12時間後、空腸に特異蛍光抗原を有する絨毛上皮細胞が増加し、回腸の絨毛上皮細胞にも検出されるようになった。18時間後には、空腸から回腸にわたる絨毛上皮細胞のほとんどが特異蛍光抗原を有するようになり、24時間から48時間にかけて絨毛が基底部より脱落する所見が認められた。48時間以後は、脱落細胞及び残存した絨毛基部の一部の絨毛上皮細胞に特異蛍光抗原が認められた。

病理組織学的所見： 2日齢無菌豚における小腸の病理組織学的検査の結果、経口接種6～12時間後では病理組織学的変化は認められな

表1 豚継代豚ロタウイルスS80株経口接種2日齢無菌豚のウイルスの体内分布

臓器	接種後の経過								
	6	12	18	24	48時間	3	4	5日	
扁桃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
心	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肝	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脾	-	-	-	-	-	-	-	-	-
腎	-	-	-	-	-	-	-	-	-
顎下リンパ節	-	-	-	-	-	-	-	-	-
腸間膜リンパ節	-	-	-	+	+	+	-	-	-
胃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
十二指腸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
空腸	上部	+	+	+	+	+	+	+	+
	中部	+	+	+	+	+	未検査	+	+
	下部	+	+	+	+	+	未検査	+	+
回腸	上部	-	+	+	+	+	+	+	+
	中部	-	+	+	+	+	未検査	+	+
	下部	-	-	+	+	+	未検査	+	+
盲腸	-	-	-	-	-	-	-	-	
結腸	-	-	-	-	-	-	-	-	
直腸	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ 抗原陽性
- " 陰性

ったが、18時間後には空腸及び回腸の絨毛上皮細胞の変性が認められた。24時間後には、絨毛は基底部を残して脱落した。4日目には、空腸及び回腸において絨毛の再生が認められた。十二指腸においては、特に強い変化は認められなかった。

抗体の産生： 23日齢無菌豚における経口接種後の抗体産生の推移について調べた結果を図4に示した。ウイルスを経口接種後、1週目に

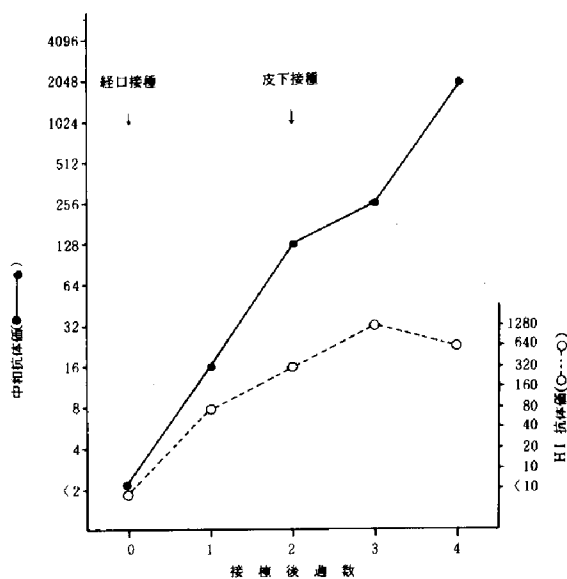


図4 豚継代豚ロタウイルスS80株接種23日齢無菌豚の中和及びHI抗体の推移

中和抗体及びHI抗体がそれぞれ16倍、80倍となり、2週目には、128倍、320倍となり、2週目にウイルスを皮下接種したのち更に抗体価の上昇が認められた。

まとめ： 野外で飼育されている豚に比べて特殊な条件下ではあるが、無菌豚を使用した上述の実験結果より、豚ロタウイルスが日齢のきわめて若い哺乳豚に重篤な下痢を起こす病原ウイルスであることが確認された。豚ロタウイルスについては、培養細胞での増殖及び定量が可能となっていることから、感染及び免疫機構の解明、的確な診断及び予防法の確立が成される日も近いものと考えられる。

他方、下痢を示す豚の糞便から、先にも述べたように多種類のウイルス粒子が検出されており、これらのウイルスとの混合感染によって更に重症の下痢を起こすことも考えられる。電顕で検出されているウイルス粒子の中のいくつかは培養細胞を用いた分離も可能となりつつあり、それぞれのウイルスの起病性などを検討することが必要であろう。

実際の野外での下痢の発生例では、病原体（ウイルス、細菌、寄生虫など）、生態生理、飼育環境などの複合的要因によって起こる場合が多いと考えられるため、あらゆる分野の技術を駆使して下痢の問題解決に取り組む必要がある。

豚ロタウイルスの野外調査成績

齊藤 憲彦

(埼玉県農林部畜産課)

養豚経営の中で、子豚の生産・育成の実態を見ると、ほとんどの畜主は多かれ少なかれ、下痢に悩まされているのが現状であり、経営全体として捕えると、大きなマイナスの原因となっている。

子豚の下痢に関与するとされている豚ロタウイルス（以下PRVと略）の病原性については、CROUCH, WOOD, 福所らにより2日齢無菌豚を用いた試験で、重度の下痢、脱水により死亡することが認められている。

一方、野外のPRVについては、SCHWALTZ及びGLOCKにより下痢発病率50~80%、死亡率0~15%とされているが、国内での実態については、まだ十分調査されていない。

そこで我々は、埼玉県内7戸の一貫生産養豚場において、PRVの野外調査を実施した。

材料と方法

調査期間：昭和54年9月~昭和58年3月

調査場所：埼玉県川本町A養豚場（3,000頭）新座市B, C, D, E, F, G養豚場（200~300頭規模）合計7戸。

調査材料：

採材豚	頭数	材料数	備考
母豚	28	糞便 28	経日的採材含む
子豚	78	" 78	下痢発症豚

子豚 44 糞便 230 経日的採材

150 336

調査方法：

PRV検査は、サル腎由来継代細胞MA-104細胞を用いて、蛍光抗体直接法によりウイルスの検出、分離を行なった（表1、2）。

表1 材料の処理方法

糞便	(-80℃保存)		
10倍乳剤	LE	ゲンタマイシン	400 μg/ml
		カナマイシン	60 "/"
		ファンキゾン	10 "/"
遠心上清	2,500rpm	10~15分	
トリプシン処理	37℃	30分	
		トリプシン	10 μg/ml
遠心上清	2,500rpm	10~15分	
接種材料			

表2 検査方法

MA-104細胞 (サル胎児腎)

カバースリップ作成	4~5日培養
シートの洗浄	PBS ⁺
接種	0.2~0.5ml
吸着	37℃ 60分
シートの洗浄	PBS ⁺
回転培養	トリプシン 0.5 μg/ml 添加 37℃ 24時間
FA直接法	
鏡検	

成績

F A検査成績：

昭和54年9月より翌年5月までにA~G計7戸の下痢症状を示す子豚から採取した78例の材料について調べた。A養豚場では5回採材したが、54年9月、10月と55年2月、5月の計4回分の39例中12例が陽性であった。全体としては、調査した7戸のうち、C、G養豚場を除く5戸、78例中23例がF A陽性であった。

各種日齢の豚の下痢便からのPRV検出結果：

離乳前の7~25日齢では10~46.2%、離乳の25日齢以後では、前者と比較し例数は少ないが、25~66.6%の陽性例が見られた（表3）。

表3 各種日齢の豚の下痢便からの豚ロタウイルス検出結果

日齢	検査例数	陽性数	%
7	10	1	10.0
12	13	6	46.2
16	12	3	25.0
21	16	7	43.8
27	8	2	25.0
31	3	2	66.6
37	3	1	33.3
不明	4	1	25.0

下痢便採材時期とPRV検出率：

7養豚場の成績を一括して採材時期別にみると、54年9月の秋から55年5月の春までの各季

表4 下痢便採材時期と豚ロタウイルス検出率

(異なる時期に集めた下痢便からの検出率)

	検査例数	陽性数	%
昭54			
9月	16	4	25.0
10月	7	1	14.2
11月	6	2	33.3
12月	3	0	0
昭55			
2月	31	12	38.7
3月	6	0	0
5月	9	4	44.4

節に陽性例が見られ、特に冬季は採材検体数が多く、陽性例は38.7%であった(表4)。

得られた成績から、7養豚場のうちA養豚場について、PRVの実態を正確に把握する目的で、次の調査を実施した。

経日的PRV-FA検査：

昭和57年2~9月に12腹の子豚20頭と母豚7頭について経日的(7~10日間隔)に検査した。採血した血清については、PRV中和抗体を調べた。なお、表5では野外分離ウイルス株、表6、7では、S80株を用いて中和試験を行なった。表では、FA成績を+-で各日齢ごとに示し、下痢症状陽性のものは、FA成績+-の両端に点を記入した。

母豚No.1の子豚2頭は下痢回復後17日齢で、母豚No.2の子豚1頭は下痢症状無く11日齢で、PRV-FAが陽性であった。同様に、母豚No.3、4、5の哺乳中の子豚にPRV-FA陽性豚が見られた。なお、離乳後下痢を起こしたこれらの6頭中5頭が陽性であった。しかし、母豚は全経過中FA陰性であった(表5)。

表5 経日的PRV-FA検査成績(1)

昭57.2.9~3.11

母豚 No.(NT)	子豚 No.	日 齢	3	5	10	20	25~31
1 (< 2)	1	-	-	-	•••	+	-
	2	-	-	•••	•••	+	-
2 (4)	1	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
3 (< 2)	1	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-
4 (2)	1	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
5 (4)	1	-	-	-	-	•••	-
	2	-	-	-	+	-	-
6 (< 2)	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
7 (< 2)	1	-	-	-	-	•••	-
	2	-	-	-	-	•••	-

注. * : 野外分離ウイルス株を用いた中和試験
** : ウイルス分離陽性 ••• : 下痢症状

母豚No.8~12の5腹各2頭の子豚は、No.9の1頭が16日齢に、No.11の2頭が24日齢に陽性であった。(表6)。

表6 経日的PRV-FA検査成績(2-1)

子豚 No.	日 齢				
	5	10	15	20	25
8-1	-	-	•••20*	-	-
	-	-	•死• ••<20	•••	-
9-1	-	•••	•••<20	•••	-
	-	•••	•••20	-	-
10-1	-	-	•••<20	•••	-
	-	-	•••20	•••	-
11-1	-	-	-	40	•••
	-	-	-	20	•••
12-1	-	-	•••<20	-	-
	-	-	•••<20	-	-

注. ••• : 下痢症状 * : 中和抗体価

これら同一子豚10頭のうち6頭(No.標識不明)は、離乳後30~42日齢の間にFA陽性を示し、発育不良なものが3頭見られた(表7)。

表7 経日的PRV-FA検査成績(2-2)

昭57.5.11~7.22

子豚 No.	日 齢				
	30~33	39~42	50~53	64~67	78~81
1	•••<20**	+	•••<20	-	-
2	•••<20	-	-<20	-	-
3	•••20	-	-<20	-	-
4	•••<20	•••	-<20	-	-
5	•••<20	•••	•••*20	•••	-
6	•••<20	+	-<20	-	-
7	•••<20	-	-<20	-	-
8	•••<20	-	-20	•••	-
9	-<20	+	-<20	-	-
10	-<20	•••	•••*	•••	-

* : 発育不良 ** : 中和抗体価

以上の調査成績を参考として、下痢症状とPRVとの関連を検討した。

下痢発生状況：

母豚の下痢は見られなかったが、子豚は40頭中23頭、57.5%に下痢症状が見られた。

PRV 分離成績：

母豚は全例陰性で、子豚は40頭からの材料179例中29例から分離され、40頭中20頭が陽性で50%であった。

PRV-FA と下痢症状陽性率：

下痢は3～83日齢に見られたが、離乳の25日齢前後に集中しており、25～30日齢で84%のピークを示した。PRV は、10～15日齢より40～50日齢にPRV が分離され、分娩後1週齢以内及び60日齢以後は分離陰性であった(図1)。

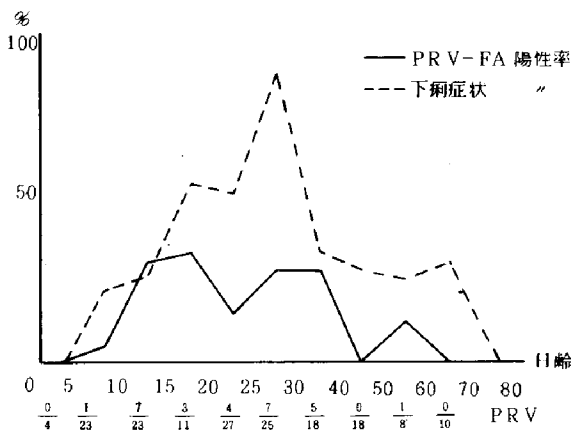


図1 PRV-FA と下痢症状の陽性率

下痢便と正常便からのPRV分離成績：

179例の糞便を採材時の肉眼所見と臨床症状から下痢便と正常便に区分してPRV陽性率をみると、下痢便23.8%、正常便12.1%で両者間に統計的有意差があり、下痢便からは正常便より高率に分離された(表8)。

表8 下痢便と正常便からのPRV分離成績

検体の性状	検体数	陽性数	陽性率(%)
下痢便	63	15	23.8*
正常便	116	14	12.1
計	179	29	16.2

* : 0.01 < P < 0.05

さらに、この成績を離乳前と後に区分して下痢便と正常便のPRV分離率をみると、離乳後において、統計的に有意差が見られ、下痢便の

方が高率にPRVが分離された(表9)。

表9 離乳前および後の下痢便と正常便からのPRV分離成績

検体の性状	離乳前			離乳後		
	検体	陽性	陽性率	検体	陽性	陽性率
下痢便	29	6	20.7	34	9	26.5*
正常便	59	9	15.2	57	5	8.5
計	88	15	17.0	91	14	15.4

* : 0.01 < P < 0.05

まとめと考察

県内の一貫生産養豚場でPRV調査を実施したところ、7戸中5戸(71.4%)、下痢便78例中23例(29.4%)がPRV-FA陽性であった。日齢別陽性率は、7～46日齢の間で10～66.6%で、25日齢以内の材料が多くみられた。PRVは季節との関連は特に見られなかった。

経日的に実施した調査成績から、母豚は陰性であったが、子豚は10～67日齢の間に20頭50%がPRV陽性であった。離乳期の前及び後にも下痢症状が高率に見られPRV陽性豚が存在することが確かめられ、離乳時に目立って発育不良豚の発生も見られた。

PRVの分離状況を見ると、同一豚房内でも全体から同時に分離されず、間隔を置いて分離される状況も見られた。

下痢便と正常便の間においてPRV率を検討してみると、統計的に有意差が見られ下痢便から高率にPRVが分離された。さらに、離乳日25日齢前後で比較すると、離乳後においてのみ統計的な有意差を持って下痢便から高率に分離された。

以上の成績から、野外で子豚の下痢にPRVが関与しているものと考えられるが、正常便からも低率ながら分離されていることから、今後ウイルス証明を行なう場合、採材時期を十分考慮する必要があると思われる。下痢発症については、ウイルス以外に他の発病要因が関与している可能性もあること、さらにPRVが養豚場では、ほぼ常在化に等しい状態で存在している可能性も推察された。