

日本豚病研究会報

ISSN 0914-3017

PROCEEDINGS OF THE JAPANESE PIG VETERINARY SOCIETY

No.27

日本豚病研究会・The Japanese Pig Veterinary Society

August 1995

目次

豚流行性下痢(PED)－総論	桑原博義	1-6
三重県における1994年発生の豚伝染性胃腸炎 および豚流行性下痢(PED)の事例	鈴木義久	7-9
鹿児島県における1994年発生の豚流行性下痢 (PED)の事例	岩下幸二ほか	10-11
1994年に流行した哺乳豚下痢の病原病理学的検討	末吉益雄	12-16
(藤崎賞受賞講演)		
豚のストレス	豊浦雅次	17-18
事務局から		19-21

豚流行性下痢(PED)－総論

桑原博義(日生研)

Kuwahara, H. (1995). Outline of porcine epidemic diarrhea (PED). *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 27 : 1-6

I はじめに

豚の主なウイルス性下痢症としては豚伝染性胃腸炎(TGE)と豚ロタウイルス感染症が知られていた。しかし、1971年にイギリスで豚の急性下痢症が発生した。この症例の特徴は、4～5週齢の豚では発症しなかったことで、この点でTGEとは異なっていたことから、流行性ウイルス性下痢症(Epidemic viral diarrhea: EVD)と呼ばれていた。その後、1976年の冬にベルギーおよびイギリスの繁殖養豚場で日齢に関係なく急性の集団下痢症が多発し、この下痢症には

TGE ウイルスや豚ロタウイルスの関与は否定されたため、新しい豚の下痢症候群として豚流行性下痢症(Procine epidemic diarrhea または Porcine epidemic diarrhea: PED)と呼び、区別された。

1977年にベルギーおよびイギリスでこの豚の下痢症が発生した際に採取した下痢便や小腸内容中に電子顕微鏡でコロナウイルス様(Coronavirus-like: CVL)粒子が観察されたことから、PEDの原因はTGEウイルスとは異なるコロナウイルスであると考えられた。

その後、1979年にはチェコスロバキア、西ドイツ、ハンガリーで、1980年にはカナダで、1981年にはフランスでそれぞれ豚の集団下痢が発生し、それぞれの症例でCVL粒子が検出された。

II 日本における発生状況

1) Takahashi ら⁶⁾は、1982年2月に岩手県内の某養豚場で豚の水様下痢が発生し、20日齢以内の子豚が死亡した症例を調査し、死亡率は約20%であったこと、蛍光抗体法によりTGEウイルスの抗原は検出されなかったが、CVL粒子が電子顕微鏡で検出されたことから、日本においてもPEDが存在することを示唆した。

2) 1982年末から1983年初めまでを発生 の 頂 点 と し て、日本の各地で食欲不振と水様下痢を主徴とする豚の急性下痢が集団発生した。この下痢はすべての日齢の豚に発生したが、死亡率は7日齢以内の豚では0～40%であり、10日齢以上の豚では水様下痢が3～4日間続いた後、耐過生存する場合が多かった。桑原ら³⁾は本症例の原因を調査したところ、TGEウイルスや豚ロタウイルスが検出されたが、両ウイルスが検出されない例も多数あったことから、この全国的な大規模な豚の集団下痢の発生原因の中には、PEDウイルスが関与している例があることを示唆した(表1)。

表1 野外下痢材料の検査成績(1982年1月~1983年11月)

検査材料	検査数	TGE陽性	Rota陽性	大腸菌症	TGE・Rota陰性
下痢便	19件 103例	3(15.8) 10(9.7)	8(42.1) 27(26.2)	NT NT	8(42.1) 66(64.1)
発症豚	11件 31例	1(9.1) 4(12.9)	1(9.1) 2(6.5)	3(27.3) 6(19.4)	6(54.5) 19(61.3)
計	30件 134例	4(13.3) 14(10.4)	9(30.0) 29(21.6)	3(10.0) 6(4.5)	14(46.7) 85(63.4)

TGE, Rota: FA抗原の検出, 大腸菌症: 実質臓器からの菌分離
()内数字: %

Ⅲ 豚でのウイルス分離と継代

1) Pensaert ら⁵⁾は, 1978年にベルギーで本症が発生した際に採取した下痢便及び小腸内容を1~5倍乳剤とし, 3,000×g, 30分間4℃で遠心した上清を20%のシュクロースに乗せて150,000×g, 40分間遠心して得た沈渣を燐タングステン酸で染色し, 電子顕微鏡で観察した。その結果, ロタウイルス粒子は観察されなかったがCVL粒子が観察されたことから, 本ウイルスをCV 777株と名付け, 下痢便の20%乳剤を1日齢の初乳未接種の豚に経口投与後30時間目に下痢を起こした8頭を殺処分し, 小腸を内容物とともに20%乳剤とし, メンブランフィルターでろ過した無菌ろ液を3~15日齢の初乳未接種の豚に経口投与した。その結果, すべての試験豚は24~36時間後に水様性の下痢を起こした。それぞれの豚の下痢便又は小腸内容を電子顕微鏡で観察したところ, すべての材料からCVL粒子が観察された。CVL粒子は直径95~190 nmで, 長さが約18 nmの棍棒状のスパイクを有していた。さらに, 12頭中9頭を下痢発生後8日目に殺処分し, 小腸上皮細胞中のTGEウイルス抗原を蛍光抗体法で検索したが, いずれも陰性であったこと, 残りの3頭の豚は下痢発症後4~5日目で回復し, 接種後3週間目の血清中にはTGEウイルスに対する中和抗体が検出されなかったことから, CV 777株はTGEウイルスとは異なるコロナウイルスであることが確認された。

2) 1982年から1983年初めにかけて日本の各地で, すべての日齢の豚に水様下痢を主徴とする疾病が発生した。桑原ら⁶⁾は, 鹿児島県下のJ農場及び香川県下のY農場で, それぞれ1983年3月及び10月に採取され, TGEおよびロタウイルスが検出されなかった下痢発症子豚の小腸を, 内容とともにリン酸緩衝食塩液(PBS-)で10%乳剤とし, 1,100×g, 20分間遠心後, 上清をさらに7,600×g, 20分間遠心し, メンブランフィルターを通過させた上清に結晶トリプシンを1 ml

あたり40μg添加し, 3日齢および9日齢の豚に経口投与して下痢発症の有無を観察した。

J農場由来の原材料を5 ml 経口投与した3日齢の豚2頭(Nos. 3, 4)中No. 3は28時間後に, No. 4は96時間後にそれぞれ灰白色の水様下痢を発現した。投与後28時間目に発症した豚No. 3を46時間目に殺処分し, その小腸を内容とともに10%乳剤とし同様に結晶トリプシンを1 mlあたり10μg添加して5 mlずつを9日齢の豚1頭(Na. 7)と3日齢の豚2頭(Nos. 12, 13)に経口投与した。その結果, 豚No. 7は92時間後に, 豚No. 12は56時間後に水様下痢便を, 豚No. 13は52時間後に軟便を排泄した。

Y農場由来の原材料を5 ml 経口投与した3日齢の豚2頭(Nos. 1, 2)は, 52および56時間後にそれぞれ水様下痢便を排泄した。これらの豚を66時間後に殺処分して採材し, 前試験と同様に豚No. 1の小腸乳剤を作製し, 9日齢の豚2頭(Nos. 5, 6)に5 mlずつを経口投与した。豚No. 6は38時間目に水様下痢便を, 豚No. 5は48時間目に水分に富む泥状便を, 52時間後から水様下痢便を排泄した。この2頭の豚を69時間後に殺処分して採材し, 同様に作製した豚No. 5の小腸乳剤を3日齢の豚4頭(Nos. 8, 9, 10, 11)に2.5 mlずつ経口投与した。その結果, 22時間目にNos. 9および11は嘔吐を, No. 10は嘔吐と水分に富む泥状の下痢を示し, 23時間目にはNos. 10と11は水様下痢便をNo. 9は水分に富む泥状の下痢便を排泄した。残りの豚No. 8には症状は認められなかったがその時点ですべての豚を殺処分し, それぞれ採材した。これらのうち, 殺処分時に無症状であった豚No. 8の小腸の10%乳剤を作製し, 6日齢の豚に1 ml当たり20μgの結晶トリプシンを含むPBSと等量に混合したものを2 mlずつ, トリプシン無添加の乳剤を1 mlずつ経口投与した。その結果, トリプシン添加乳剤を投与した豚5頭のうち1頭は16時間後に他の4頭は20時間後に水様下痢便を排泄した。

一方, トリプシン無添加乳剤を投与した豚5頭のうち1頭は24時間後に, 他の4頭は32~36時間後に水様下痢便を排泄した。

このように, トリプシンを添加した材料を用いた場合, 無添加材料投与豚よりも下痢の発症がやや早い結果となったが, この現象はトリプシンの効果であるか否かは不明であった。(図1)

病理組織学的病変は, 全例に共通して小腸に局限しており, 他の器官に著変は認められなかった。小腸の主要な病変は絨毛の萎縮で, Y材料2代目の豚の感染後69時間目の小腸絨毛の長さは十二指腸で $185 \pm 58 \mu\text{m}$,

図1 豚コロナウイルス J 及び Y 材料の豚継次試験成績

接種 材料	継次数	供試豚		症 状 ¹⁾ の 推 移														転帰	ウイルス 粒子の検 出程度 ²⁾
		日 齢	番 号	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140 時間	
J 材料	1	3	3																+
			4																+
	2	9	7																NT
			12																-(+)
Y 材料	1	3	1																NT
			2																NT
	2	9	5																+(+)
			6																+
	3	3	8																+++
			9																+++
			10																+++
			11																+++
	4	6	15																NT
			16																NT
			17																NT
			18																NT
Y 材料 (トリプシン 無添加)	4	6	20																NT
			21																NT
			22																NT
			23																NT
			24																NT

1) 症状: 正常, 軟便, 泥状便, 灰白色水様便, V 嘔吐。

2) ウイルス粒子の検出程度: - 検出されず, + 少数検出, +++ 多数検出, (+) 下痢便材料中, NT 検査せず。

3) K 殺 4) † 死亡

空腸で $225 \pm 53 \mu\text{m}$, 回腸で $129 \pm 53 \mu\text{m}$ であり, 対照豚のそれぞれの部位の絨毛の長さと比較すると, ほぼ $1/4$, $1/2$ および $1/3$ であった。

電子顕微鏡観察では, 感染豚の下痢便あるいは腸内容の部分精製試料のネガティブ染色標本および十二指腸, 空腸および回腸の切片にはコロナウイルスの特徴的形態を示す粒子が観察された。水様下痢を起こす直前の材料では多数のウイルス粒子が観察されたが, 下痢を起こしてから時間が経過した材料ではウイルス粒子は検出されないか, またはごく少数が観察されたのみであった。観察されたウイルス粒子は直径 $90 \sim 100 \text{ nm}$ であり, 長さ $10 \sim 20 \text{ nm}$ の特徴的な表面突起を有していた。

血清学的検査では, これらの材料を大量に接種した豚の血清中に TGE および ロタウイルスに対する中和抗体はいずれの時点でも検出されなかった。

これらの成績から, 1983年に採材した鹿児島県下および香川県下で発生した豚の下痢の集団発生の原因は PED ウイルスによるものと結論づけられ, 鹿児島県下の材料から分離された株を KS 株, 香川県下の材料

から分離された株を 83P-5 株と名付けた。

IV 培養細胞でのウイルスの分離と継代

1) Hofmann ら¹⁾は, Witte によって V215/78 と名付けられた豚継代 PED ウイルスと, Pensaert により分離された豚継代 PED ウイルスを用い, 培養細胞によるウイルスの継代を試みた。細胞は豚由来初代または 2 代目の小腸, 肺, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 大脳および皮膚培養細胞と, アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞, 豚甲状腺由来 PD 5 細胞, 豚腎由来 PK-15 細胞, ヒト直腸腫瘍由来 HRT 18 細胞を用い, 維持用培養液には FCS を 2% 添加したイーグル MEN (SM) とトリプシンを 1 ml 当たり $10 \mu\text{g}$ 加えたイーグル MEN (TM) を用いた。2 種類のウイルスを, これらの培養細胞に接種して 2 群に分け, 1 群の細胞には SM を, 他の 1 群には TM を加えて培養した。その結果, 豚由来細胞および HRT 18 細胞では, Pensaert から分与を受けた抗 PED ウイルス FITC 標識抗体で染色したが蛍光抗原は認められず, CPE も出現しなかった。一方, Vero 細胞では SM を用いた場

合、初代培養では蛍光抗原が認められたが、7日間培養した上清を継代した細胞では蛍光抗原は検出されず、その後の7日ごとの継代でも蛍光抗原は陰性であり、CPEも出現しなかった。しかし、TMを用いた場合、蛍光抗原は初代で認められ、しかも合胞体が形成された。培養5日後の培養液をさらに継代したところ、蛍光抗原が認められ、合胞体形成細胞数は増加した。CPEは初代では認められなかったが2代目で出現し、その後はCPEをともなつて継代された。TMを用いてVero細胞で26代継代した培養上清を接種したVero細胞と培養液を凍結融解したものを電子顕微鏡で観察したところ、直径90~160nmのウイルス粒子が観察され、表面には長さ12~15nmのスパイクが確認された。この粒子はコロナウイルスの形態と一致していた。

これらの成績から、Vero細胞にCPEを示した因子はPEDウイルスであることが確認され、培養細胞で初めてPEDウイルスが分離され、1988年に報告された。

2) Kusanagiら²⁾は、桑原ら³⁾が豚で分離し、継代したPEDウイルス83P-5株を用い、Hofmannらの方法に準拠してウイルス感染子豚の20%小腸乳剤をVero細胞に接種し、培養液に結晶トリプシンを1ml中10 μ gに添加して培養したところ合胞体が形成され、CPEが出現した。また、感染細胞を抗83P-5株ウサギ血清を用いた間接蛍光抗体法で染色したところ、特異蛍光が観察された。CPEを示した細胞の上清を飽和硫酸で濃縮し、電子顕微鏡で観察したところ多くのウイルス粒子が観察された。ウイルス粒子の直径は50~140nmで表面に12nmのスパイクを有しており、コロナウイルスの形態と一致していた。

分離ウイルスの理化学性状を調べたところ、IUDRの存在下およびpH3.0で安定であったが、エーテル感受性であった。この性状は対照においたTGEウイルスの性状と一致していた。また、分離ウイルスとコロナウイルスに属するTGEウイルスおよび豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルスの各免疫血清との交差中和試験では、分離ウイルスはホモの血清とのみ反応し、他の2種類の免疫血清とはまったく反応しなかった。

以上の成績から、分離ウイルスはPEDウイルスであると同定され、日本において初めて培養細胞でPEDウイルスが分離された。

3) 松本ら⁴⁾は北海道上川家畜保健衛生所管内の某養豚場で発生した流行性の下痢症を調査した。発病豚には下痢の他に発熱、嘔吐、ロイコペニーが認められ

た。下痢便中には電子顕微鏡でCVL粒子が認められたことから、TGEおよびPEDが疑われた。しかし、発病豚の材料から蛍光抗体法でTGEウイルスの特異抗原は検出されなかったこと、血清中にTGEウイルスに対する中和抗体が検出されなかったことからTGEは否定された。また、発病豚の臓器および下痢便からの豚腎由来細胞、ESK細胞を用いたウイルス分離は陰性であった。そこで、発病豚の材料をVero細胞に接種し、トリプシンを添加した培養液を加えて回転培養したところ、細胞融合を主徴とするCPEが出現し、このCPEを示した細胞はTGEウイルスに対する蛍光抗体法は陰性であった。また、感染細胞を電子顕微鏡で観察したところ、多数のCVL粒子が観察された。粒子の直径は100~150nmであり、コロナウイルスの形態と一致していた。ウイルスの理化学性状試験では、IUDRの存在下で安定であり、エーテル、クロロホルム感受性であった。また、赤血球凝集性は認められず、中和試験ではTGEウイルスとは交差せず、下痢発病豚の発病時と回復期のペア血清で分離ウイルスに対する中和抗体の有意な上昇が認められたことから、今回の下痢症の原因はPEDウイルスによるものであり、下痢発病豚から分離されたウイルスはPEDウイルスであると同定された。

以上のように、現在、PEDウイルスは3株が培養細胞で分離されている。

V 診断法

PEDの診断法は、主に電子顕微鏡による下痢便や感染豚の腸またはその内容物からのコロナウイルス粒子の検出と、TGEウイルスの否定によって行われてきた。しかし、ウイルスが培養細胞で分離されたことから蛍光抗体法が可能になり、下痢発症豚の小腸の凍結切片や、発症豚の小腸、下痢便の乳剤をVero細胞に接種し、特異蛍光抗原を検出することにより、診断ができるようになった。しかしながら、PEDウイルスはこれまで述べてきたように、培養細胞で分離することは容易でなく、野外の材料からの確にウイルス抗原を検出したり、ウイルスを分離するには困難がともなう。一方、細胞順化ウイルス株を用いた中和抗体価の測定も可能となった。このことから、発症期の血清と回復期の血清を用いて中和抗体価を測定し、回復期の血清の中和抗体価が有意に上昇していることを確認することでPEDウイルスの感染の有無を診断することができる。しかしながら、中和試験を行うには細胞順化ウイルスが必要であるが、細胞でウイルスが分離

されたのは日本では前述の2株のみであることから、多くの血清について中和抗体価を測定することは困難である。このようなことから、ウイルス抗原の検出や抗体の検出のための簡易な、例えばELISAやラテックス凝集反応などの診断キットの開発が望まれる。

VI 日本における中和抗体の分布

PEDウイルスの日本における分布については、未だ詳しく調べられていない。当所においては過去に各種の抗体検査の目的で送付された豚血清を凍結保存している。この血清を用いて中和抗体を測定した。用いた血清は、1977年から1992年にかけての1都1道17県のごく限られた範囲のものであるが、このうち中和抗体陽性を示したものは1道12県であった。年代別にみると、1992年の血清については1県のみ検査であるが、血清7例中1例(14.2%)が陽性であった。1978～1980年の血清については検査されていない。1981年では4県中1県(血清65例中4例, 6.2%), 1982年では5県中4県(血清21例中18例, 85.7%) 1983年は7県中3県(血清117例中46例, 39.3%), 1984年は4県中全例(血清36例中19例, 52.8%), 1985年は3県中2県(血清76例中62例, 81.6%), 1987年は4県中2県(血清123例中4例, 3.3%), 1988年で4県中3県(血清116例中43例, 37.1%), 1989年は9県中3県(血清364例中52例, 14.3%), 1990年は5県中3県(血清342例中, 10.5%), 1991年は3県中2県(血清322例中21例, 6.5%), 1992年は1県中1県(血清89例中13例, 14.6%)であった。また、これらの合計では検査した1678例中319例(19.0%)が陽性であった。(表2)。

表2 日本における豚血清のPED中和抗体陽性地区(部分)

採血年	陽性数/検査数(%)	陽性県数/検査県数
1977	1/7 (14.3)	1/1
1978	.	.
1979	.	.
1980	.	.
1981	4/65(6.2)	1/4
1982	18/21(85.7)	4/5
1983	46/117(39.3)	3/6
1984	19/36(52.8)	4/4
1985	62/76(81.6)	2/3
1986	.	.
1987	4/123(3.3)	2/5
1988	43/116(37.1)	3/4
1989	52/364(14.3)	3/9
1990	36/342(10.5)	3/5
1991	21/322(6.5)	2/3
1992	13/89(14.6)	1/1
計	319/1,678(19.0)	29/50

このように、1977年の血清で1例ではあるが中和抗体陽性であったことは、日本においては1971年にヨーロッパで初めてPEDと考えられる下痢症が発生してから少なくとも6年後にはウイルスの浸襲があったことを示唆する。今後はさらに広範囲に、また過去にさかのぼって抗体調査を行う必要があると考えられた。

VII 予防

現在、PEDに対するワクチンは世界においても開発されていない。豚のウイルス性疾患のうち、腸管の粘膜上皮細胞を標的組織とする感染症にはTGE、ロタウイルス感染症がある。そのうちTGEに対しては母豚を免疫することによる乳汁免疫を主体としたL-L法に用いる生ワクチン、L-K法に用いる生ワクチンと不活性ワクチンが、子豚に対しては分娩直後の初乳を飲む前の子豚に経口投与する生ワクチンがそれぞれ実用化されている。PEDウイルスはTGEやロタウイルスと同様に腸管の粘膜上皮細胞を標的組織としている。このことから、TGEと同様に哺乳子豚を強毒ウイルスから防御するためには母豚を免疫して乳汁中に抗体、主に1gA抗体を産生させ、その乳を子豚が飲むことにより、腸管粘膜の表面をその抗体で保護する乳汁免疫法が有効と考えられる。しかしながら、TGEと同様の免疫法で有効か否かについては種々の試験結果から判断されなければならない。

VIII おわりに

PEDウイルスは細胞を用いて分離された。現在、分離ウイルスの弱毒化が行われている。また、経口投与型各種ワクチンの開発も開始された。これらの成果によっては、離乳後の豚に対するTGEやロタウイルス感染症などの腸管感染症に対する経口投与型ワクチンが開発される可能性は高いと思われる。しかし有効なワクチンが開発されていないロタウイルス感染症やPEDに加え、最近PRRSの日本での発生も確認されている。これらのことから未知の疾病にも対処する意味で、一般衛生管理の充実、オールイン、オールアウトと消毒の励行が重要であると考えられる。

参考文献

- 1) Hofmann, M. et al.(1988) Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture. J. Clin. Microbiol. 26: 2235-2239.
- 2) Kusanagi, K. et al.(1992) Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus

in cell cultures and partial characterization of the isolate. J. Vet. Sci. 54 : 313-318.

3) 桑原博義ら(1988)豚流行性下痢症の病原であるコロナウイルスの豚継代 日獣会誌 41 : 169-173.

4) 松本繁幸ら(1995)豚流行性下痢症 (PED) の発生 平成6年度全国家畜衛生業績発表会要旨 27

5) Pensaert, M. B. et al. (1978) A new coronaviruslike particle associated with diarrhea in swine. Archives of virology. 58 : 243-247.

6) Takahashi, K. et al. (1983) An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 45 : 829-832.

(第48回日本豚病研究会発表)

住所: 〒198青梅市新町2221-1
