

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, 津田知幸, 吉田和生, 中沢宗生, 佐藤邦彦, 南 哲郎 (家畜衛試九州), 山崎嘉都夫 (鹿児島中央家保), 長岡健朗 (大分家保), 岩下幸二, 渡辺 学 (鹿児島県南薩家保), 森 昌昭, 鈴木義久 (三重県中勢家保)

Sueyoshi, M. (1995). Microbiological and pathological investigations of piglets naturally infected with porcine epidemic diarrhea virus (1994). *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 27: 12-16

I はじめに

豚流行性下痢 (PED) はコロナウイルス科の PED ウイルス (PEDV) の感染によって起きる豚の流行性下痢である。臨床症状は, 伝染性胃腸炎 (TGE) と類似しており, ほとんど鑑別ができない。PEDV は TGE ウイルス (TGEV) と抗原性を異にする^{2, 6)}。

PED の発生は, ヨーロッパおよび北米において報告されている。日本においては, PED と思われる下痢が 1982 年から 1983 年にかけて全国的に流行し^{4, 7)}, その後, Kusanagi ら³⁾ は PEDV の分離に成功した。TGE に類似しているが, TGEV の関与が否定され, コロナウイルス粒子が確認された下痢発症豚は「PED 様疾病」として, 各都道府県の家畜保健衛生業績発表会でしばしば報告されている。最近では, 北海道で PED の発生と PEDV の分離成功例が報告されている⁵⁾。

1994 年に流行した哺乳豚の流行性下痢は病原病理学

的検査の結果, 国内で発生報告の少ない PED と診断された。ここでは, その診断に至った各検査成績および病理学的検索結果を報告する。

II 材料と方法

1) 動物 哺乳豚の下痢が発生した 5 農場から搬入された 2~7 日齢の哺乳豚 21 頭について検索を実施した (表 1)。これらの農場における新生豚の致死率は 30%~60% で, 約 10,475 頭が死亡した。子豚にはコリスチンあるいはオキシリン酸による治療が施されていたが, 著効はなかった。

今回搬入された哺乳豚は下記の検査結果から, TGE, ロタウイルス感染および細菌感染が否定された。① 21 頭全頭の小腸乳剤からウイルスは分離されなかった。② No. 1 および No. 2 農場の 19 日齢の 9 頭の耐過豚および No. 5 農場の 30~50 日の 20 頭の耐過豚の血清中に TGEV (TO-163 株) に対する中和抗体価の上昇が認められなかった。③ 21 頭全頭の腸内容物中にロタウイルス特異抗原がロタクロンキット (Cambridge Biotech. MA, U.S.A) による検査で証明されなかった。④ No. 1, No. 2 および No. 5 農場から搬入された 13 頭の豚の小腸内容物, 肝臓, 脾臓および腎臓について細菌分離を試みたが, 病原細菌は分離されなかった。

PEDV 抗原検出試験の対照として, SPF 豚 (1 頭), TGEV (静岡-20 株) 経口感染豚 (1 頭) および野外 TGEV 感染豚 (野外において, 腸管粘膜の凍結切片および腸管乳剤を培養した CPK 細胞が抗 TGEV 血清を用いた直接蛍光抗体法で陽性となった新生豚; 4 頭) についても検索した。

表 1 5 農場における発生状況と搬入された 21 頭の哺乳豚の病理学的所見

農場 No.	下痢の 発生期間 (月間)	哺乳豚		搬入豚		肉眼所見		組織所見	
		致死率 (%)	死亡数	頭数	日齢	水様性 下痢	胃内への ミルク様物 充満	絨毛の 萎縮	粘膜上皮 細胞の 空胞化
1	5	30	5,670	4	2-5	2	2	3	2
2	10	50	2,900	4	4	4	3	4	4
3	3	60	700	4	3-7	3	1	4	4
4	2	55	660	4	4-6	3	4	4	4
5	2	39	545	5	4-7	4	4	5	5
2-10		30-60	10,475	21	2-7	16	14	20	19

飼育母豚数、下痢の発生期間および致死率から推定した値。

2) 病理学的検査 搬入された新生豚は、外部検査後剖検し、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、肝臓、肺、脾臓、心臓、腎臓、副腎、扁桃、腸間膜リンパ節、膵臓、大脳、中脳、小脳、延髄、脊髄、三叉神経節、下垂体および腹腔神経節を採材した。組織標本は、10%緩衝ホルマリンで固定・パラフィン包埋後、薄切して、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、光学顕微鏡にて検査した。

3) 電子顕微鏡検査 ①走査型電子顕微鏡検査 空腸粘膜を2.5%グルタルアルデヒド液で固定した後、1%オスミウム酸液で後固定し、脱水、臨界点乾燥し、イオンスパッタリング装置で金蒸着させ、JSM5400 (JEOL) で観察した。②透過型電子顕微鏡検査 空腸粘膜を細切し、2.5%グルタルアルデヒド液および1%オスミウム酸液で二重固定後、脱水、エポキシ樹脂包埋し、超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で二重染色を施し、JEM1010 (JEOL) で観察した。

また、SPF 豚、TGEV 感染豚、野外 TGEV 感染豚の空腸および TGEV を接種した CPK 細胞についても上記の方法で処理した後、JEM1010 (JEOL) で観察した。

空腸の水様性内容物については、固形物を除去した後、超速心して得られた沈査を燐タングステン酸液でネガティブ染色して観察した。

4) 免疫組織化学的検査 PEDV 抗原および TGEV 抗原の検出をストレプトアビジン・ビオチン (SAB) 法で実施した。検査材料としては、ホルマリン固定・パラフィン包埋した組織標本を用いた。SAB 法は、Sensi Tek ユニバーサルキット (Scytek Laboratories, Logan, Utah, U.S.A) を使用した。検査手技は、脱パラフィン後、0.3% H_2O_2 で内因性ペルオキシダーゼをブロックした後、0.05M のトリス緩衝液 (pH 7.6) で洗浄し、以下、市販キットの使用説明書に従った。一次抗血清としては、PEDV (83P-5株) および TGEV に対する家兔免疫血清を使用した。

Ⅲ 検査成績

1) 臨床検査成績 搬入された21頭中の16頭では白色から黄色の水様性の下痢便が認められ、下痢便には未消化物が散見された (表1, 写真1)。

2) 病理学的検査成績

① 肉眼所見: 下痢を呈していた豚の腸管は拡張し、腸壁が著しく菲薄化していたため、腸内容物が外部か

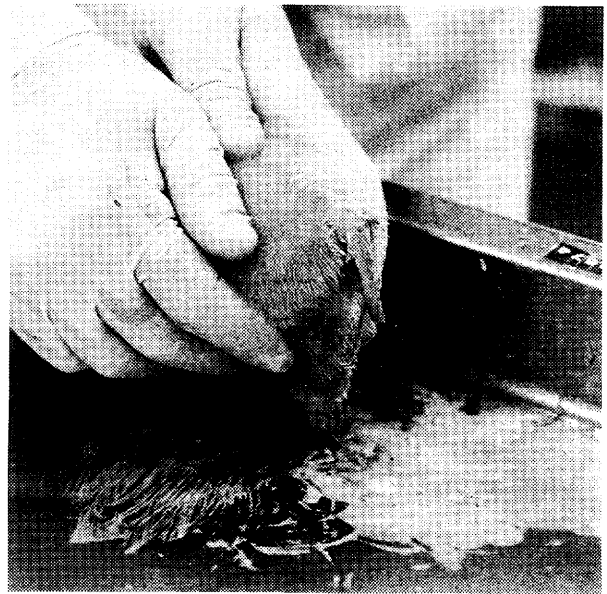


図1 水様性下痢便

ら透けて観察された (写真2)。腸管内には黄色水様性の内容物が充満し、内容物中には、未消化物が散見された。胃内に白色のミルク粕様物が充満し、胃壁の菲薄化、胃の拡張を認める豚もみられた。

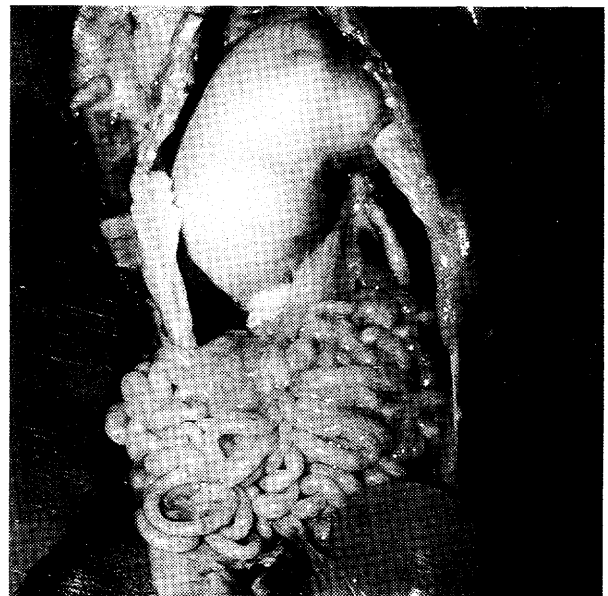


図2 部検写真。小腸から大腸にかけて、腸壁が菲薄化し、水様性の腸内容物が透けて観察される。胃は拡張し、中にはミルク粕様物が充満している。

②組織所見: 特徴病変は、小腸粘膜における絨毛の著明な萎縮であった (表1, 写真3)。絨毛の長さと同陰窩の深さの比率は低下し、1:1~3:1であった。萎縮した絨毛を被う粘膜上皮細胞は、立方化あるいは扁平化し、空胞化がみられ、一部、変性・壊死に陥っていた。粘膜固有層には、リンパ球、好酸球および好

中球の軽度の浸潤が認められ、一部、うっ血および水腫も認められた。それらの特徴病変は、空腸および回腸において最も著明であり、一部、十二指腸でも認められた。盲腸および結腸においては、表層の粘膜上皮細胞の空胞化が認められたが、その他著変は認められなかった。また、肺において軽度の肺胞壁の肥厚が認められたが、その他の臓器には著変が認められなかった。

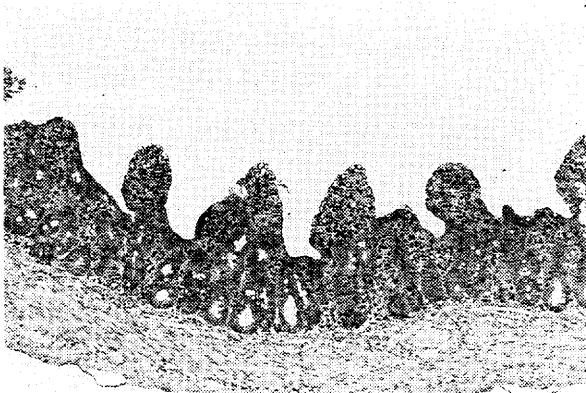


図3 空腸粘膜。絨毛が著明に萎縮している。HE染色。×56。

3) 電子顕微鏡検査成績

①走査型電子顕微鏡検査所見：下痢発症豚の空腸では絨毛の萎縮が著明で、絨毛の基底部あるいは陰窩開口部まで観察された（写真4）。絨毛の先端は、粘膜上皮細胞の配列が乱れ、粗剛となり、上皮細胞表面の微絨毛は配列が不規則で疎らであった。

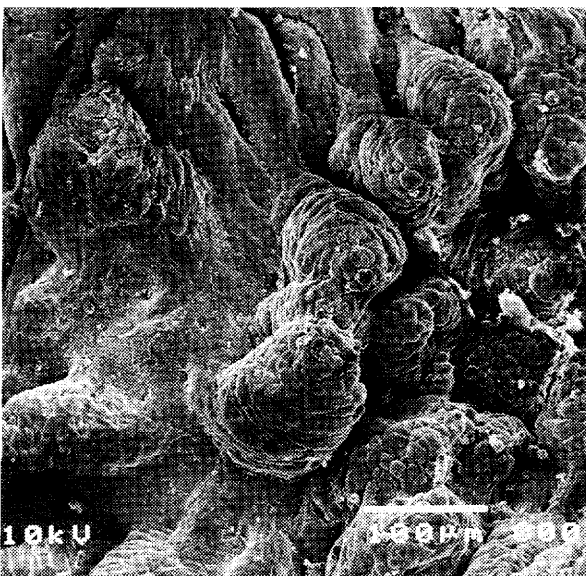


図4 空腸粘膜の走査型電子顕微鏡写真。絨毛が萎縮し、絨毛基底部が著明に観察される。

②透過型電子顕微鏡検査所見：下痢発症豚の空腸の絨毛を被う粘膜上皮細胞は、表面の微絨毛の配列が乱

れ、細胞質の糸粒体および粗面小胞体の腫脹が認められた。上皮細胞質内には、多数のウイルス粒子が核上部の空胞内および細胞小器官内に認められた。また、上皮細胞表面の微絨毛間にもウイルス粒子が存在していた。ウイルス粒子は、大きさが70～140 nmで、球形から卵形の多形性を呈し、ソラマメ状を呈しているものもあった。約20 nmのスパイクを保有したウイルス粒子は、大きさが100～140 nmで、上皮細胞表面の微絨毛間あるいは上皮細胞の細胞質空胞内に観察された（写真5 a）。空腸内容物のネガティブ染色体標本の観察では、スパイクを保有した典型的なコロナウイルス様粒子が認められた（写真5 b）。

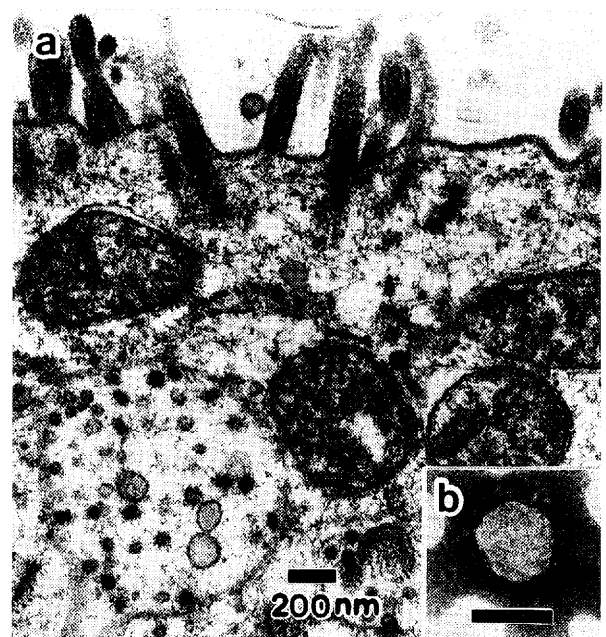


図5 透過型電子顕微鏡写真。a) 空腸の粘膜上皮細胞。細胞質の空胞内にスパイクを保有するウイルス粒子が認められる。微絨毛は疎らとなっている。b) 小腸内容物のネガティブ染色像。コロナウイルス様粒子が認められる。Bar=100nm。

TGEV実験感染豚、野外TGEV感染豚の空腸粘膜上皮細胞およびTGEV接種CPK細胞においては、多形性で、大きさが60～160 nmのウイルス粒子が細胞質の細胞小器官内、空胞内あるいは細胞表面の微絨毛間に認められた。成熟したTGEV粒子は、約20 nmのスパイクを保有し、大きさが100～160 nmであった。

4) 免疫組織化学的検査成績

多くの下痢発症豚の腸管粘膜上皮細胞にPEDV抗原がSAB法で検出された（写真6）。抗原陽性細胞は小腸の腸管粘膜に密に分布していたが、大腸では疎らであった（表2）。十二指腸粘膜におけるPEDV抗原

表2 腸管における PEDV 抗原の分布 (SAB 法)

農場No.	搬入豚頭数	十二指腸	空腸	回腸	盲腸	結腸
1	4	2/+～++ ¹⁾	3/++～+++	2/++～+++	0/	2/+～++
2	4	1/+	4/++～+++	4/++	3/+	3/+
3	4	1/++	4/+～++	3/+～++	0/	0/
4	4	3/++	4/++～+++	4/++～+++	3/+～++	2/+～++
5	5	ND ²⁾	3/++	3/++～+++	1/+	0/
21		7/+～++	18/+～+++	16/+～+++	7/～++	7/～++

1) PEDV 抗原を認めた豚頭数/腸管粘膜上皮細胞における PEDV 抗原陽性細胞数の比率。+, 低度; ++, 中等度; +++, 高度
2) 検索せず。



図6 空腸粘膜。絨毛を被う上皮細胞に PEDV 抗原 (矢印) が認められる。SAB 法。×230°

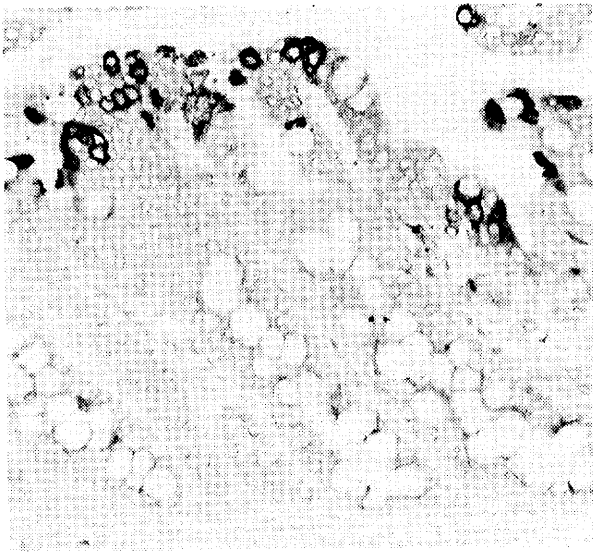


図7 結腸粘膜。粘膜表層の上皮細胞に PEDV 抗原が認められる。SAB 法。×230°

検出率は、空腸および回腸より低頻度で、盲腸および結腸より高頻度であった。PEDV 抗原陽性細胞は、空腸で最も多く認められた。これらの抗原陽性細胞数は絨毛萎縮の程度が軽度の豚の方が重度の豚の方より多く認められた。上皮細胞内の PEDV 抗原は細胞質に限局し、細胞核内には認められなかった。抗原陽性細胞と陰性細胞の境界は明瞭であり、絨毛を不連続的に被っていた。抗原陽性細胞は、一部、陰窩の上皮細胞、回腸の粘膜固有層およびパイエル氏板にも認められた。

PEDV 抗原は、胃、肺および陰性対照動物 (SPF 豚、TGEV 感染豚および野外 TGEV 感染豚) の小腸粘膜には認められなかった。また、十二指腸から結腸粘膜にわたって PEDV 抗原陽性細胞が多数認められ

た症例の採材全臓器について PEDV 抗原の検出を試みたが、腸管以外は検出されなかった。

今回の症例と野外 TGEV 感染豚の標本について、抗 PEDV 血清および抗 TGEV 血清を用いた SAB 法で各特異抗原の検出を試みたところ、交差反応は認められなかった。PEDV 抗原は、今回の症例の盲腸および結腸の粘膜上皮細胞にも認められた (写真7) が、野外 TGEV 感染豚の盲腸および結腸に TGEV 抗原は検出されなかった。小腸においては、両抗原とも絨毛に配列した粘膜上皮細胞を主な標的細胞としていた。

IV 考察

今回、農場から搬入された下痢発症豚は TGE, ロ

タウウイルス感染および細菌感染がウイルス学的検査、血清学的検査、細菌学的検査あるいは病理学的検査で否定された。いっぽう、SAB法を用いた免疫組織化学的検査で多くの豚の腸管粘膜にPEDV抗原が検出され、本症例はPEDと診断された。

今回の症例の病理学的所見から、PEDVは小腸、とくに空腸において重度の絨毛萎縮をび慢性に引き起こすと考えられる。さらに、PEDV抗原陽性細胞は空腸において最も多くが検出されたので、PEDの検査では、空腸が適切な採材臓器と考えられる。

Debouckら¹⁾は、PEDV実験感染豚で、絨毛の長さで陰窩の深さの比率は2.3:1~1.5:1であったと報告しているが、今回の症例では1:1の例もあり、その病変はTGEの病変と同様で、HE染色標本での鑑別はできなかった。この実験感染豚と今回の症例との所見の違いは、PEDV株の病原性の強弱あるいは感染ウイルス量の違いから生じている可能性もある。

小腸粘膜におけるPEDV抗原陽性細胞数は、絨毛の萎縮の程度が重度になるにつれて、減少する傾向にあった。おそらく、絨毛の萎縮が重度の豚では、PEDVがすでに変性・壊死した粘膜上皮細胞から放出されているか、または、抗原性細胞そのものが粘膜から剝離・脱落してしまったものと考えられる。PEDV抗原の分布は、腸管粘膜病変の進行ステージで異なっており、動物体内へのウイルス侵入の時間的経過と関係があると考えられる。このことから、PEDの検査では、下痢発症豚のみでなく、下痢発症豚と同居で軟便が認められ、ウイルス感染の初期と考えられる豚も検索すべきである。

以上のごとく、PEDは臨床症状だけでなく、その肉眼所見、組織所見および電子顕微鏡観察所見においてもTGEと類似しており、特異抗血清を使用した免疫組織化学的検査以外では鑑別ができなかった。「PED様疾患」として各都道府県の家畜保健衛生業績発表会で報告されていることは先に記述したが、これはPEDの診断方法が確立していないためであり、国内におけるPEDの発生状況は明らかでない。PEDの診断法を早急に開発しなければならないが、現時点では免疫組織化学的検査法を用いてPEDV抗原を証明するのが有用と思われる。特に、SAB法は、ルーチン・ワークとして作製しているホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック材料が使用可能であり、その組織標本は半永久的に保存でき、詳細に観察することができる。したがって、この方法はPEDの診断、さらにPEDV抗原の体内分布を検索するのに有用な手技

であると言える。

稿を終えるにあたり、抗PEDV血清を提供していただいた日本生物科学研究所の桑原博義先生および抗TGEV血清を提供していただいた化学及血清療法研究所の村川泰司先生に深謝致します。

参考文献

1. Debouck, P. et al. (1981). The pathogenesis of an enteric infection in pigs. experimentally induced by the coronavirus-like agent, CV 777. *Vet. Microbiol.*, 6, 157-165.
2. Horvath, I. and Mocsari, E. (1981). Ultrastructural change in small intestinal epithelium of suckling pigs affected with a transmissible gastroenteritis (TGE)-like disease. *Arch. Virol.*, 68, 103-113.
3. Kusanagi, K. et al. (1992). Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhoea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 313-318.
4. 桑原博義ら. (1988). 豚流行性下痢の病原であるコロナウイルスの豚継代. *日獣会誌*, 41, 169-173
5. 松本繁幸ら. (1994). 豚流行性下痢の発生について. *北獣会誌*, 38: 149-152.
6. Pensaert, M. et al. (1981). An immunoelectron microscopic and immunofluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent, CV 777, and several coronaviruses. *Arch. Virol.*, 68, 45-52.
7. Takahashi, K. et al. (1983). An outbreak of swine diarrhoea 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: 〒891-01 鹿児島市中山町2702