

豚のウイルス予防に関する研究

桑 原 博 義

(財)日本生物科学研究所：〒198-0024 東京都青梅市新町 9-2221-1)

Kuwahara H. (2001). Immunological studies on viral infectious disease of pigs. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 38, 1-5.

はじめに

受賞対象業績は、「豚のウイルス病の予防に関する研究」という大変幅の広い内容であった。私は1965年に日本獣医畜産大学獣医学科を卒業後、直ちに日本生物科学研究所及び日生研株式会社（以下日生研と略）に入社以来35年間、主に豚のウイルス性疾病の予防に関する研究に従事してきた。その内容を簡単に述べると、入所社当時野外で使用されていた豚コレラクリスタルバイオレット不活化ワクチンの製造に従事すると共に、すでに開発されていた豚コレラ生ワクチン試作品の野外応用試験、豚伝染性胃腸炎ウイルスの分離と弱毒化およびそれをを用いた高濃度生および活性化ワクチンによる強力なL-K免疫法の開発と実用化、豚ロタウイルスの分離と分離株の血清型の決定、豚オーエスキー病ウイルスの分離と分離ウイルスから作出した弱毒gI欠損株の免疫効果の確認、新たな豚コロナウイルスである豚流行性下痢（PED）ウイルスの分離と弱毒化、および筋肉内注射法による予防法の開発と生ワクチンの実用化、TGE・PED 混合生ワクチンの実用化、豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルスの分離とその性状解析などについて試験を行ってきた。また、当初実験動物研究所で固定、生産されたミニチュアピッグの各種病原体に対する感受性試験、各種動物の臓器から細胞株の作出とその感受性の確認及びワクチン製造

への応用、試験用細胞としての実用化にも取り組んできた。これらの業績が今回の受賞対象となったものであり、本来ならばそれぞれについて説明せねばならないが、最近実用化が達成されたPEDについて説明する。

1 PED 発生の概況

日生研は従来より野外材料の抗体検査、病性鑑定を受け入れてきた。私が日生研に入所社した当時の豚の主要なウイルス性疾病は豚コレラ、日本脳炎であり、従って抗体検査もこの2種類に限定されていた。

その後、日本では豚の新たなウイルス性疾病が海外から次々と侵入して発生し、その原因ウイルスが家畜衛生試験場（現動物衛生研究所）により明らかにされ、TGE ウイルス、豚ロタウイルス、オーエスキー病ウイルスが分離された。我々も野外の抗体検査や抗原証明の要望に答えるべく、独自にこれらのウイルス分離・同定し、それぞれの特異的免疫血清を作製し、中和抗体価の測定や蛍光抗体法による抗原証明が可能となり、野外材料についての検査を行ってきた。

一方、ヨーロッパではTGE及び豚ロタウイルスが否定された豚の水様下痢が次々に発生し、新たな豚の下痢症候群としてPEDと呼ばれていた。その初発は1971年のイギリスと言われているが、1977年に再度イ

表1 PED 発生の経緯

発生年代	発生国	発 生 状 況
1971	イギリス	急性下痢の集団発生、4～5週齢以下の豚では発病せず。流行性ウイルス性下痢（Epidemic Viral Diarrhea：EVD）として区別
1976	イギリス ベルギー	日齢に関係なく急性下痢の集団発生。TGE, Rota ウイルスは否定 新たな豚の下痢症候群として Porcine Epidemic Diarrhea 又は Porcine Epizootic Diarrhea：PED と呼び、区別された。
1977	イギリス ベルギー	急性下痢の集団発生。下痢便からコロナウイルス様（Corona Virus Like：CVL） 粒子を検出、TGEV とは異なるコロナウイルスによる疾病と断定
1979	チェコスロバキア 西ドイツ ハンガリー	急性下痢の集団発生、下痢便から TGE とは異なるコロナウイルス粒子を検出
1980	カナダ	TGE とは異なる豚の急性下痢の集団発生、下痢便から TGE とは異なるコロナウイルス粒子を検出
1981	フランス	TGE とは異なる豚の急性下痢の集団発生、下痢便から TGE とは異なるコロナウイルス粒子を検出
1982	日本	TGE とは異なる豚の急性下痢の集団発生、下痢便から TGE とは異なるコロナウイルス粒子を検出

ギリスとベルギーで本症が発生した際に採取された下痢便や小腸内から電顕でコロナウイルス様（CVL）粒子が検出された。さらに Pensaert らはベルギーで採取した材料の20%小腸乳剤を1日齢の仔豚に経口投与し、下痢発症後に採取した小腸の20%乳剤を濾過滅菌し、3～15日齢の豚に経口投与したところ、下痢が再現された。その下痢便や小腸内容からCVL粒子が検出され、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ことが確認されていた（表1）。

2 下痢便の病性鑑定成績

日本ではPEDの発生は確認されておらず、PEDウイルスはまだ侵入していないと考えられていたが、1982年末から1983年初めを発生の頂点として、日本の各地で食欲不振と水様性の下痢を特徴とする豚の急性下痢が集団発生した。この下痢は全ての日齢の豚に見られたが死亡率は7日齢以下の豚で0～40%であり、10日齢以上の豚では水様性の下痢が3～4日間続いた後に耐過生存する場合が多く見られた。これらの下痢の原因追及のために当所に病性鑑定材料が多く送付されて

表2 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	3 (15.8)	8 (42.1)	NT	8 (42.1)
	103例	10 (9.7)	27 (26.2)	NT	66 (64.1)
発 症 豚	11件	1 (9.1)	1 (9.1)	3 (27.3)	6 (54.5)
	31例	4 (12.9)	2 (6.5)	6 (19.4)	19 (61.3)
計	30件	4 (13.3)	9 (30.0)	3 (10.0)	14 (46.7)
	134例	14 (10.4)	29 (21.6)	6 (4.5)	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 : %

接 種 材 料	継代数	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	調				
J 材料 トリブシン 添 加	1	3	3																	+			
			4																		+		
	2	9	7																生残	N T			
			3	12																	- (+)		
				13																		N T	
Y 材料 トリブシン 添 加	1	3	1																	N T			
			2																		N T		
	2	9	5																	+ (+)			
			6																		+		
	3	3	8																	+++			
			9																		+++		
			10																		+++		
			11																		+++		
	4	6	15																		N T		
			16																			N T	
			17																			N T	
			18																			N T	
19																					N T		
Y 材料 トリブシン 無添加	4	6	20																	7日目死	N T		
			21																			生残	N T
			22																			7日目死	N T
			23																			8日目死	N T
			24																			7日目死	N T

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) ㄗ 殺 4) ㄗ 死亡

図5 MPS CF 抗体陽性率の推移

きた。

1982年1月から1983年11月までに受領した材料の検査成績を表2に示す。

検体の内容は下痢便が19件103例、発症豚が11件31例、合計30件134例であった。

方法はTGEウイルス及び豚ロタウイルスは間接蛍光抗体法を用い、10%の下痢便または小腸乳剤を作成し、各ウイルス感受性細胞に接種して培養後、常法により標本を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。大腸菌の検出は、実質臓器からの菌分離を行い、病原性であるか否かを確認した。

その結果、TGEウイルス抗原陽性は合計で4件の13.3%、14例の10.4%、ロタウイルス抗原陽性は合計で9件の30%、29例の21.6%、病原性大腸菌は合計で3件の10%、6例の4.5%であったがTGEウイルス、ロタウイルス及び大腸菌陰性は合計で14件の46.7%、85例の63.4%の高い率を示した。

これらのことから、今回の下痢の原因としてPEDウイルスが関与していることが疑われた。

また、高橋らは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粒子が電顕で検出されたことを1983年に報告し、本流行にPEDウイルスが関与していたことを示唆した。

3 PEDウイルスの豚継代

今回の病性鑑定に用いたTGE、豚ロタウイルス抗原陰性材料のうち、鹿児島県下のJ農場及び香川県下のY農場での水様性下痢発症仔豚の小腸を採取し、新たな豚に経口投与して継代したところ、いずれの材料を投与した豚全てが下痢を発症し、J材料では2代目まで、Y材料では4代目まで継代を行った(図1)。これらの豚の小腸材料を電顕で観察したところ下痢発症後、時間が経過した豚でのCVL粒子が検出された。

このことは、PEDウイルス検査材料の採取時期が重要であることと、ウイルス分離材料としては野外材料を新たに7日齢前後の仔豚に経口投与し、下痢発症直後に採取する必要性が感じられた。

さらに、発症耐過した豚の血清中にはTGEウイルスに対する中和抗体は検出されず、本コロナウイルスはPEDウイルスであると固定された。

この成績は、1988年に誌上報告された。

4 PEDウイルスの細胞継代

この様にして培養細胞を用いたウイルス分離のための適切な材料が得られたことから、各種細胞を用いてウイルス分離を行った(表3)。

豚腎由来細胞としてはMPKⅢa、CPK、ESKを用い、培養液には結晶トリプシンを1ml当たり10 μ gに含むTPB・イーグルMEM及び血清を加えたTPB・イーグルMEMを用いた。その他の細胞としてはハムスター由来BHK及びHmLu、ウズラ由来QE、猫腎由来CRFK、ヒト羊膜由来FL、マウス由来MEF、さらに豚胎児由来初代の小腸、甲状腺、心臓、肺及び腎臓培養細胞を用い、培養液には血清を加えたTPB・イーグルMEMを用いた。

これらの細胞に分離材料を接種して7日間培養し、その培養液を採取して新たな細胞に接種する方法で3代まで継代したが、いずれの細胞にもCPEは出現しなかった。

一方、ヨーロッパではHofmannらが豚継代PEDウイルスを用い、培養細胞は豚由来初代または2代目の

表3 培養細胞での豚継代PEDウイルスの分離

使用細胞		観察成績					
接 種 名 称		種類後の継代数：					
		初代		2代		3代	
		トリプシン 有	トリプシン 無	トリプシン 有	トリプシン 無	トリプシン 有	トリプシン 無
豚胎仔由来 初代細胞	小腸	・	—	・	—	・	—
	甲状腺	・	—	・	—	・	—
	心臓	・	—	・	—	・	—
	肺	・	—	・	—	・	—
	腎臓	・	—	・	—	・	—
豚腎由来	MPKⅢa	—	—	—	—	—	—
	CPK	—	—	—	—	—	—
	ESK	—	—	—	—	—	—
ハムスター 由来	BHK	・	—	・	—	・	—
	HmLu	・	—	・	—	・	—
ウズラ由来	QE	・	—	・	—	・	—
猫腎由来	CRFK	・	—	・	—	・	—
ヒト羊膜由来	FL	・	—	・	—	・	—
マウス由来	MEF	・	—	・	—	・	—
猿腎由来	Vero	—	—	+	—	+	—
	MA104	—	—	—	—	—	—

継代方法：豚継代PEDウイルス(感染豚小腸の20%PBS乳剤)の1mlずつを接種後37℃で60分間静置吸着させて除去し、各細胞に対応するウイルス増殖用媒溶液を加え、37℃で静置培養後、CPEが認められない場合は7日ごとに、CPEが認められた場合はその極期に培養上清を採取し、新たな細胞に接種して継代する。

表4 分離ウイルスの理化学性状

処理方法	ウイルス感染価 ($\log_{10}$ TCID ₅₀ /ml)				
	PEDV83P-5 (Vero21代)	TGEV	牛アデノ 7 型	ADV	牛エンテロ 6 型
IUDR10 ^{6.5} M/ml 添加培養	5.75	5.75	3.5	ND	ND
同上無添加対照	5.5	5.5	7.75	ND	ND
pH3.0 22° 3 hr	4.5	4.5	ND	3.25	ND
同上無処理対照 (pH7.5)	4.75	4.75	ND	6.5	ND
エーテル20v/v% 加4° 18時間	<0.5	1.75	ND	ND	7.5
同上無処理対照	4.75	4.75	ND	ND	8.0

表5 分離ウイルスと豚コロナウイルスとの交差中和試験

ウイルス	免疫血清		
	抗PEDV	抗TGEV	抗HEV
分離ウイルス (83P-5)	64	< 4	< 4
TGEV (h-5)	< 4	≥1024	ND
HEV	< 4	ND	1024

小腸、肺、腎臓、肝臓、脾臓、大脳及び皮膚培養細胞を、継代細胞としてはアフリカミドリザル腎由来Vero細胞、豚甲状腺由来PD5細胞、PK-15細胞及びヒト直腸腫瘍由来HRT18細胞を用い、培養液は血清加イーグルMEMを用いて培養したところ、トリプシン添加イーグルMEMで培養したVero細胞でのみCPEを示して継代が可能であったこと、培養液の電顕検索でCVL粒子が観察され、さらに感染細胞をPensaertより分与された豚コロナウイルスCV777株免疫血清を用いた蛍光抗体法を実施したところ陽性であり、PEDウイルスが培養細胞で初めて分離されたことを1988年に誌上報告した。

我々はこの成績を参考としてサル腎由来Vero細胞をMA104細胞を用いて再度ウイルスの分離を試みたところ、表3下欄に示した様に、Hofmannらの報告と同様に結晶トリプシン添加TPBイーグルMEMを用いて培養したVero細胞でCPEが出現し、継代が可能であった。さらに継代を続け、その過程で培養中に添加するトリプシン量を徐々に減少させ、トリプシン非依存性株を作出した。その結果、中和試験の実施が可能となった。

分離ウイルスの理化学性状を調べたところ、表4に示したように、コロナウイルスであるTGEウイルスの性状と一致していた。

さらに分離ウイルスに対する特異的免疫血清を作製し、豚コロナウイルスであるTGEウイルスと血球凝

集性脳脊髄炎ウイルスとを用いて交差中和試験を実施したところ、分離ウイルスは2種類の豚コロナウイルスを交差しないことが確認され、分離ウイルスはPEDウイルスであると同定された(表5)。

これらの成績は1992年に誌上発表された。

5 日本における抗PEDウイルス中和抗体保有状況

中和試験が可能となったことから各種抗体検査を依頼され、保存しておいた過去の血清のPEDウイルスに対する中和抗体価を測定した(表6)。血清は1977年から1992年までの16年間に採取された1,678例を用いた。その結果、1977年の血清7例中1例14.2%が中和抗体陽性を示した。1978年から1980年の血清は検査していないが、1981年では65例中4例6.2%が陽性であったが、1982年には21例中18例の85.7%に上昇し、1983

表6 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(14.2)	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

年以降も高い陽性率を示していた。これは、この間に全国的な発生があったことを裏付けている。その後は徐々に減少傾向となっており、発生が散発になったこ

とを示している。

この様に、1977年には1例ではあったが陽性の豚が存在したことは、イギリスでの初発から少なくとも6年後には日本もPEDウイルスの侵襲を受けた可能性が示唆されたが、その前後の年に採血された血清の成績がないのではっきりとは言い切れない。

6 生ワクチンの緊急開発

この様にして作出されたトリプシン非依存株の性状を調べたところ、3日齢の豚に経口投与しないことが確認され、弱毒ウイルスワクチン候補株として有望であることが確認された。しかしながら、PEDは1983年の全国的な大発生後、その発生は散発的となり、ワクチンを要望する声は聞かれなくなった。しかし、1994年には九州の薩摩半島で、1996年には同じく大隅半島でPEDウイルスによる豚の集団発生があり、大きな被害を受けた事から急速にワクチンが必要であるとの声が高まり、大至急実用化にむけた試験を実施し、1996年9月に製造承認申請書を提出したところ、緊急性を有するワクチンとして優先的に審議され、同年11月に承認された。直ちに製造を開始し、同時検定で国家検定申請を行った結果、翌年1月に最初の2ロットが合格し、直ちに九州地方で実際応用されたことにより、PEDの発生は急速に減少し、緊急防疫効果が確認された。

おわりに

以上のように、野外の下痢に関する病性鑑定材料から新たなウイルスが分離され、その結果、新たな生ワクチンが開発され、養豚の安定的な経営の一助として貢献することができた。

また、異常産関係の病性鑑定材料のうち、原因が特定されなかった事例で、その材料を保存しておき、後日改めて新たな資料と知識及び技術を用いてウイルスの分離や保存血清の中和抗体価を測定することでPRRSウイルスが分離され、中和抗体陽性血清の存在が明らかになり、その発生時期はアメリカでの初発とほぼ同時であることが確認された。

このように、病性鑑定を実施することは、大変な手間を要することで敬遠されがちであるが、非常に重要な材料が得られる可能性がある。従って、当所では積極的に病性鑑定を受ける体制を今後も取り続ける所存である。

なお、PED及びPRRSについての詳細は、すでに本

会誌に掲載されている。

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 (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) Kuwahara, et al. (1994) An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan. J. Vet. Sci. 56: 901-909.
- 5) Pensaert, M. B. et al. (1978) A new coronavirus-like 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. Vet. Sci. 45: 829-832.