

豚コレラウイルスB亜型による野外発生と豚腎株化細胞（CPK細胞）を用いた豚伝染性胃腸炎ウイルスの診断法の開発研究

駒庭英夫

(栃木県南家畜保健衛生所：〒328-0075 栃木市箱森町22-27)

Komaniwa, H. (2002) Outbreaks of hog cholera virus type B and isolation of TGE virus using CPK cells.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 40 : 3-7

はじめに

栃木県に採用後、私が最初に勤務した家畜保健衛生所（以下、家保）が宇都宮家保でした。昭和51年（1976年）のことです。それから25年余、今回第10回日本豚病研究会藤崎優次郎賞受賞という栄誉を賜り感謝しております。また、今回の私の受賞に際し推薦の労をとってくださった三浦康男幹事にお礼申し上げます。

私が豚のウイルス病と初めて関わったのは、昭和51年でした。本会の会長である藤崎先生から豚パルボウイルスHA抗原を分与していただき、宇都宮家保管内の養豚地帯における豚パルボウイルスの伝播状況を調査しました。当時は豚パルボウイルスの調査をしようと思っても、診断液などは市販されていませんでした。豚パルボウイルスHA抗原を分与していただくため、小平にあった家畜衛生試験場に出かけました。そこで初めて藤崎先生にお会いしました。その時先生は私に2つのことを注文しました。「診断用抗原は必要だけあげます。但し、調査結果をきちんとまとめて私に報告すること。そして、調査した結果は文章にして残すこと。」というものでした。その時はよくわかりませんが、今思うとあの時の藤崎先生の注文が、その後仕事をしたらまとめて報告する、という姿勢につながったのだと思います。

藤崎先生から診断用抗原をいただき、2年間管内養豚地帯の豚パルボウイルス伝播状況を調査したところ、藤崎先生が調査されたとほぼ同様な傾向で豚パルボウイルスの伝播が起きていることが明らかになりました（図1）。

この仕事をしてから3年後、今度はつくば市に移転して2年目の家畜衛生試験場にウイルス病の診断研修に行くことになりました。当時の研修は5月から翌年2月までの9カ月という長いものでした。私の配属先は豚コレラ研究室でした。今は組織改編でなくなってしまいましたが、昭和55年（1980年）当時、研究室は大所帯で活気に溢れていました。私はそこで初めて、清水実嗣先生から組織培養や豚コレラウイルスの定量法であるEND法について教えていただきました。今回の受賞対象となった仕事の大半は、この研究室で学び、指導していただきながら行った内容だと思います。

豚コレラウイルスB亜型による野外発生

昭和55年の5月、ウイルス病診断研修のためにつくば市に長期出張したころ、栃木県では豚コレラは10年間発生がなく（図2）、すでに過去の病気とされていました。全国的に見ても昭和50年（1975年）11月の神奈川県での発生を最後に4年間発生がなく、本県と同様な状況だったと思われます。したがって、豚コレラ

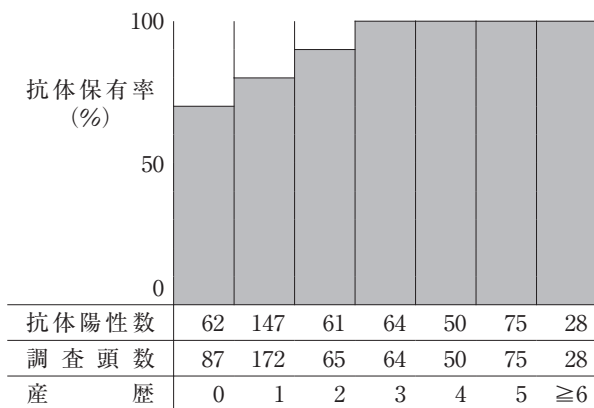


図1 産次別抗体保有状況（豚パルボウイルス）
（養豚の友、昭和54年11月号、128巻）

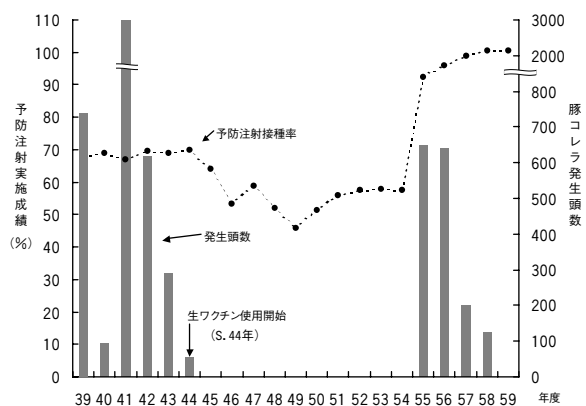


図2 本県における豚コレラの発生と予防注射の実施状況

研究室に配属になってもさほどの緊張感もなくのんびりと構えていました。それが突然、研修の始まった5月に千葉と茨城県で豚コレラの発生があり、8月には愛知、10月には宮崎、島根、埼玉、山形、福島各県で発生、11月には北海道の上川と十勝で発生が確認されました。そしてついに本県でも12月に入り、6戸の農家に本病の発生が確認されました。

当時、豚コレラウイルスの分離・抗体検査には豚精巢細胞を培養して行っていました。たまたま私がTGEウイルスの仕事をするのに、福所先生からいただいた豚腎由来の株化細胞（あとでCPK細胞と名前が付けられました）が豚コレラウイルスにも感受性のあることがわかり、そのCPK細胞を使い、豚コレラウイルスのマイクロ法による定量・中和試験の仕事をするようになりました。この仕事は1981年の Natl.Inst. Anim. Health Q. に載せていただきました。そして、昭和55年から56年にかけて本県で発生したB亜型ウイルスによる豚コレラについて、CPK細胞を用い開発したマイクロEND法により調査を行いました。今回は、その概要について報告します。

豚コレラの検査手順は図3に示したとおりです。

臨床検査で集団検査とあるのは、1～2頭の検査で済ますのではなく、少なくとも10頭以上を対象に検査を行うということです。また、発熱している豚の少なくとも10頭以上について血液検査を行います。特に白血球数が1万個/mm³以下の個体が4割を超えるような場合は豚コレラを疑い、迅速に病勢を決定するとともに、万全な初動防疫体制を構築して病気の伝播を最小

に食い止める必要があります。

図4に、熱性疾患で病性鑑定依頼のあった6件の体温と白血球数を示しました。3件（No.4～6）は豚コ

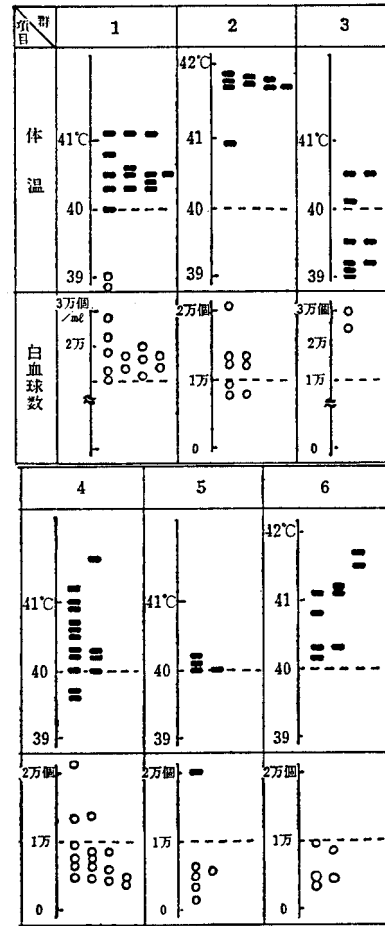


図4 熱性疾患における体温・白血球数

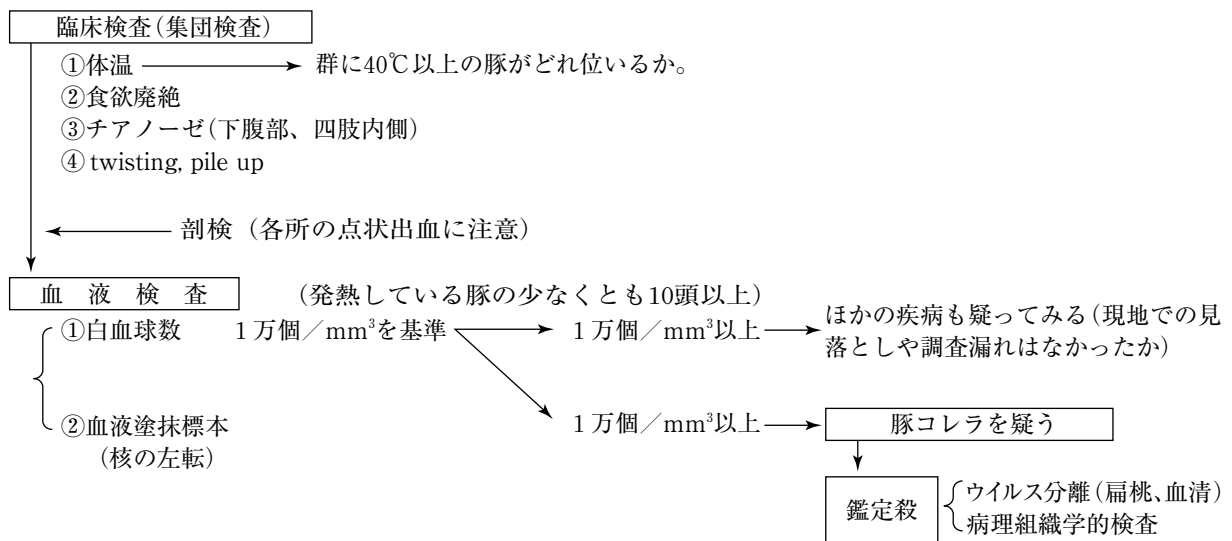


図3 豚コレラの検査手順

レラと診断され、残りの3件 (No.1~3) は豚コレラ以外の熱性疾患と診断されました。

体温については、No.1, 2及び6が全頭40℃以上の発熱、No.4と5が80%以上、No.3では33%に発熱が認められました。一方、白血球数はNo.4, 5及び6では全頭が、No.2では33%が1万個/mm³以下でしたが、No.1と3では白血球数の減少は認められませんでした。

次に、昭和55年から56年にかけて本県で発生したB亜型ウイルスによる豚コレラの野外発生例について、罹患豚の臨床症状、体温、白血球数を調査するとともに、CPK細胞を用いたマイクロEND法により、豚コレラウイルスに対する血清中の抗体価を測定しました。また同時に、罹患豚血清中からの豚コレラウイルスの分離も試みました (図5)。

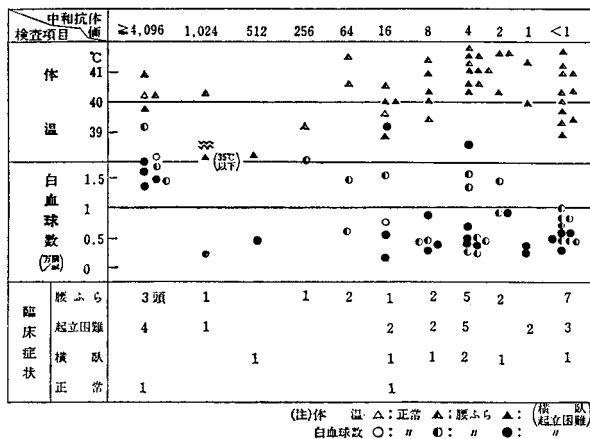


図5 B 亜型ウイルスによる豚コレラの野外発生例

中和抗体陰性の11頭中4頭は起立困難や横臥などの重篤な臨床症状を示しましたが、残り7頭は腰がふらつく程度の臨床所見であり、検温後初めて発熱に気づきました。これら11頭の白血球数は全頭が1万個/mm³以下であり、11頭すべての血清から無希釈で豚コレラウイルスが分離されました。中和抗体価1倍以上、256倍の群で体温の上昇が認められたものは28頭中22頭 (78%)、白血球数の減少が認められたものは29頭中21頭 (72%) でした。また、30頭中11頭の血清からウイルスが分離されました。ウイルスは無希釈の血清からは分離できず、希釈した血清の材料からは分離できるという現象が認められました。

豚腎株化細胞 (CPK細胞) を用いた豚伝染性胃腸炎 (TGE) ウイルスの診断法の開発研究

従来TGEの診断は、豚腎初代培養細胞 (SK細胞) を用いた試験管法により行われてきましたが、CPK細胞

がTGEウイルスに高い感受性を有することがわかりましたので、中和試験のマイクロ化とウイルス分離法の開発を試みました。今回はTGEウイルス分離法の研究について説明します。

表1は、細胞に馴化していないTGEウイルス Toyama株の培養法を検討した成績です。

表1 回転培養とトリプシン添加によるTGEウイルスの増殖効果

細胞	トリプシン添加		培養方法	
	接種材料	維持培地	回転	静置
C P K	有 ¹⁾	有 ²⁾	473.0 ³⁾	58.0
		無	1.0	5.5
	無	有	127.5	51.0
S K		無	2.5	0.0
	有	有	48.0	4.5
		無	1.5	0.0
	無	有	19.5	0.0
		無	0.5	0.0

- 1) 接種材料は10μg/mL (SK細胞は5μg/mL) のトリプシンで37℃ 30分処理した後、細胞に接種
- 2) 細胞は0.5μg/mLのトリプシンを添加したイーグルMEM (pH7.4) で培養
- 3) 特異蛍光陽性細胞数/0.2mL、接種後3日目のカバースリップ2枚の平均値

CPK細胞とSK細胞を用い、回転培養及び静置培養のそれぞれについて、接種材料並びに維持培養液にトリプシンを添加した群と無添加の群を設け、接種材料中のウイルスの検出効率を比較しました。その結果、接種材料のトリプシン処理と維持培地へのトリプシン添加を行った場合、回転培養ではカバースリップ当たりCPK細胞で473個、SK細胞で48個の感染細胞が検出されました。しかし、静置培養では感染細胞の検出はCPK細胞で58個、SK細胞で4.5個でした。そのほかの方法によるウイルスの検出効率は、いずれも前述の回転培養と接種材料のトリプシン処理、維持培地へのトリプシン添加という系に比べて劣っていました。

以上の結果から、トリプシン処理→維持培地へのトリプシン添加→回転培養の系とCPK細胞を用いる方法が、TGEウイルスの検出に最も優れていることが明らかになりました。

次に、TGEウイルスのCPE出現に及ぼすトリプシンの影響について、CPK細胞と細胞に馴化していないTGEウイルスToyama株を用いて調べました。

接種材料のトリプシン処理・非処理、維持培地へのトリプシン添加・無添加及び回転培養の組み合わせで実験を行いました。

表2 TGEウイルスのCPE出現に及ぼすトリプシンの影響

接種材料	トリプシン添加	維持培地	細胞変性効果(CPE)の出現			
			継 代 数			
			1	2	3	4
有 ¹⁾	有 ²⁾	有 ²⁾	- ³⁾	+ (5)	+ (2)	ND ⁴⁾
	無	無	-	-	-	+ (5)
無	有	有	-	+ (5)	+ (2)	ND
	無	無	-	-	+ (5)	ND

- 1) 接種材料は10 μ g/mLのトリプシンで37 $^{\circ}$ C 30分処理した後、細胞に接種
- 2) 細胞は0.5 μ g/mLのトリプシンを添加したイーグルMEM (pH7.4) で培養
- 3) -は正常細胞、+はCPEの出現を示す。()内の数字はCPEが初めて認められた日を示す
- 4) 検査せず

表2に示したように、トリプシンを維持培地へ添加した群では無添加群に比べて1~2代早期にCPEが認められました。以上の結果から、CPEの発現においても、トリプシンの維持培地への添加と回転培養が有効であることが明らかになりました。

次に、野外の豚下痢便材料について、CPK細胞とトリプシン処理、維持培地へのトリプシン添加、回転培養という方法を応用し、TGEウイルスの分離を試みしました(表3)。

表3 CPK細胞を用いた豚下痢便からのCPEを示すTGEウイルスの分離

農場	発症豚 年齢	カバースリップ上の 蛍光陽性細胞数 ¹⁾	継 代 数 ²⁾	
			1	2
A	15日齢	1,360	6/6(4) ³⁾	6/6(2)
	20日齢	4	1/6(5)	6/6(2)
B	成豚	28	0/6(6)	8/8(2)
	4カ月齢	136	2/8(6)	8/8(2)
	5カ月齢	123	2/8(6)	8/8(2)
C	6カ月齢	12	1/8(6)	8/8(2)
	2日齢	510	2/6(6)	8/8(2)
	2日齢	368	2/6(6)	8/8(2)

- 1) 蛍光陽性細胞数/0.2mL、接種後20時間。接種材料は10 μ g/mLのトリプシンで37 $^{\circ}$ C 30分処理した後、細胞に接種
- 2) 継代には、培養上清を10 μ g/mLのトリプシンで37 $^{\circ}$ C 30分処理した後、細胞に接種。細胞は0.5 μ g/mLのトリプシンを添加したイーグルMEM (pH7.4) で培養
- 3) 分母は使用した試験管数、分子はCPEの出現した試験管数、()内の数字は培養日数またはCPEが初めて認められた日を示す

表3に示したように、TGEウイルスはA農場の15日齢と20日齢の哺乳豚、B農場の4~6カ月齢の肥育豚と成豚、C農場の2日齢の新生豚から分離されました。培養20時間目のカバースリップ上の特異蛍光陽性細胞

数は4個から1,360個と幅がありましたが、試験管を用いた回転培養ではB農場の成豚を除き、糞便材料を接種後4日から6日目にかけてCPEが認められました。これら8例の初代培養上清をトリプシンで処理し継代したところ、8例すべてに培養2日目からCPEが認められウイルスが分離されました。

なお、CPK細胞とトリプシン処理→維持培地へのトリプシン添加→回転培養の系を用い、TGEウイルスの分離を試みる過程で、CPK細胞にCPEを示して増殖するアデノウイルス、レオウイルスが分離されました(表4)。

表4 CPK細胞を用いた豚下痢便からのCPEを示すウイルスの分離

農場	発症豚 年齢	分離ウイルス	継 代 数 ¹⁾	
			1	2
A	成豚	アデノウイルス	1/8(4) ²⁾	8/8(4)
B	4カ月齢	レオウイルス	1/8(7)	4/6(3)
	5カ月齢	レオウイルス	3/8(7)	8/8(4)

- 1) 継代には、培養上清を10 μ g/mLのトリプシンで37 $^{\circ}$ C 30分処理した後、細胞に接種。細胞は0.5 μ g/mLのトリプシンを添加したイーグルMEM (pH7.4) で培養
- 2) 分母は使用した試験管数、分子はCPEの出現した試験管数、()内の数字はCPEが初めて認められた日を示す

A農場では成豚と子豚の散発的な下痢と嘔吐が認められ、成豚の下痢便からアデノウイルスが分離されました(写真1)。B農場では4カ月齢と5カ月齢の肥育豚が一斉に下痢を呈し、その下痢便材料からレオウイルスが分離されました(写真2)。

以上、主に昭和50年代から60年代にかけて行った仕事の内容について説明しました。少しでも皆様の仕事

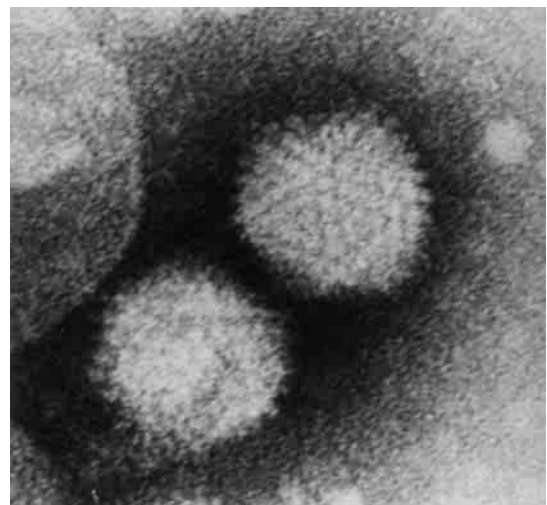


写真1 アデノウイルス粒子(×250,000)

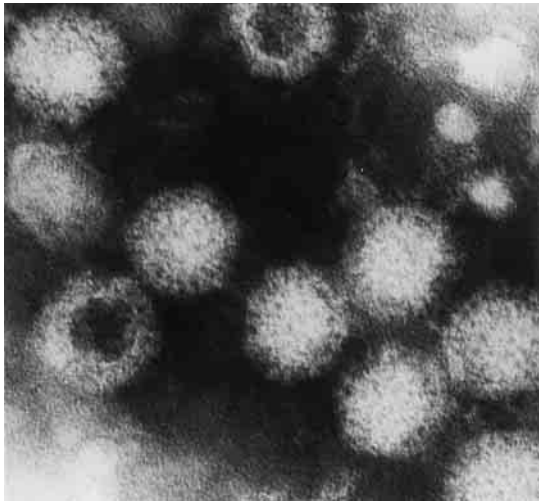


写真2 レオウイルス粒子(×150,000)

に役立てば幸いです。

なお、今回説明した内容については下記の雑誌等に掲載されていますので参考にしてください。

文 献

1. 駒庭英夫(1979)豚の死流産実態調査. 養豚の友. 128:14-18.
2. Hideo, K., et al. (1981) Micro Method for Performing Titration and Neutralization Test of Hog Cholera Virus Using Established Porcine Kidney Cell Strain. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.) 21(4):153-158
3. 駒庭英夫ら(1983)点数方式による豚コレラ診断の試み. 家畜診療. 246:29-32.
4. 駒庭英夫ら(1984)B亜型ウイルスによる豚コレラの野外発生例. 家畜診療. 247:19-21.
5. 駒庭英夫ら(1985)栃木県における豚下痢便からのウイルス分離成績. 家畜診療. 269:27-31.
6. Hideo, K., et al. (1986) Isolation of Transmissible Gastroenteritis Virus from Feces of Diarrheic Pigs in Roller Culture of CPK Cells in the Presence of Trypsin. Jpn. J. Vet. Sci. 48(6):1245-1248
7. Hideo, K., et al. (1987) Micro-Method for Neutralization Test of Transmissible Gastroenteritis Virus Using Porcine Kidney Cell Line, CPK Cells. Jpn. J. Vet. Sci. 49(1):141-144