

新潟県内における豚増殖性腸炎の浸潤状況と疫学調査

中林 大、村山修吾、太田洋一、濱崎尚樹、本間穂積、山本義雄（新潟県中央家畜保健衛生所）

Nakabayashi, T., Murayama, S., Hamasaki, N., Honma, H., and Yamamoto, Y. (2004)

Epidemiological survey on porcine proliferative enteropathy in Niigata Prefecture.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc., 46, 4-7.

豚増殖性腸炎（PPE）は細胞寄生性の *Lawsonia intracellularis* (Li) によって起こる豚の消化器病³⁾で、同一菌が、成豚において出血性腸炎で急死する急性型と、子豚が下痢を起こし、発育不良になる慢性型に分類されている⁶⁾。診断は日本では本菌の分離は成功しておらず、病性鑑定豚の病理組織学的検査で回腸および一部盲結腸粘膜上皮内に Warthin-Starry 染色で褐色に染まる湾曲桿菌の証明で診断を実施している⁷⁾。本県における慢性型の増殖性腸炎の発生増加については村山ら⁵⁾の病理組織学的検索を主体とした詳細な発表があり、慢性型の PPE は多くの子豚が発育不良となり、発育遅延による経済的損失が大きいことから、対策に資するため、新たに生前診断として、間接蛍光抗体法 (IFA) による抗体検査、PCR による糞便中の Li 遺伝子の検出方法が開発され、今回それらを用いて浸潤調査を実施し、興味ある成績が得られたので報告する。

材料および方法

1 材料

IFA は315頭の血清を用い、その内訳は、平成15年現在の浸潤状況把握は、1戸3頭ずつ32農場96頭のと場出荷豚、農場内の動態調査では、感染パターン区分と抗体の推移として、病理組織学的検査で PPE と診断された発生農場2戸、未発生農家4戸について、繁殖豚各5頭計30頭、2、3および4か月の肥育豚各3頭計54頭の合計84頭である。遡り調査では当所保存の6か月齢のと場出荷豚を主体に、無作為に抽出した農場を昭和56年、昭和60年、平成元年、平成5年、平成10年の5年分、1戸3頭で各9戸27頭ずつ、計45戸135頭について実施した。

Nested PCR は病性鑑定豚3頭、農場の動態調査と同一の個体の84頭の糞便を用いた。

2 方法

(1) IFA

IFA はイーライリリー社製のスライド抗原をベーリ

ンガーインゲルハイムシオノギベトメディカから分与を受け、血清を30倍に希釈し4℃18時間、二次抗体はシグマ社製の抗ブタ FITC 家兔血清を32倍で37℃30分間感作し、Li 特有のコナマ状菌形の特異蛍光を観察した。

(2) PCR

テンプレート調整は、糞便を Moller らの方法⁴⁾に準じ、1gの糞便を蒸留水で10倍に希釈し、15分間激しく振とうし、12,000 rpm 5分間遠心した。その後、遠心上清を捨て、沈渣にインスタジーン100 μ lを加え56℃30分間反応後、攪拌し、8分間煮沸し、12,000 rpm 3分間遠心し、上清を検体とした。

Nested PCR 法については Jones らの方法²⁾に基づき、プライマーは 5'-TATGGCTGTCAAACACTCCG-3' と 5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3' を用い、Nested PCR にはさらに 5'-TACAGGTGAAGTTATTGGG-3 と 5'-CTTTCTCATGTCCCATAAGC-3' を用いた。反応条件は両 PCR とも、93℃40秒、55℃40秒、72℃90秒を35サイクル実施し、増幅産物は2%アガロースゲルに電気泳動後、260 bp の増幅の有無を観察した。本試験の反応系は希釈液については Ampdirect を用い、250 μ MdNTP、各プライマー 250 pM、2.5 UrTaqDNA ポリメラーゼおよびサンプル 2 μ l の 25 μ l で実施した。

(3) 発生農家の聞き取り調査

平成13年および14年に PPE の発生のあった9戸について聞き取り調査を実施し、発症要因の検討と対策効果を把握した。

成 績

1 県内の浸潤状況（平成15年度）

平成15年現在の県内の IFA による抗体保有状況は、中央家畜保健衛生所管内で農場陽性率70%（7/10戸）、頭数陽性率50%（15/30頭）、下越家畜保健衛生所管内で農場陽性率100%（10/10戸）、頭数陽性率90.3%（28/30頭）、中越家畜保健衛生所管内で農場陽性率

100% (12/12戸)、頭数陽性率86.1% (31/36頭) と中央管内で若干低い値を示したが、新潟県集計で農場陽性率90.6% (29/32戸)、頭数陽性率77.1% (74/96頭) と高い値を示し、広く浸潤していることがわかった。

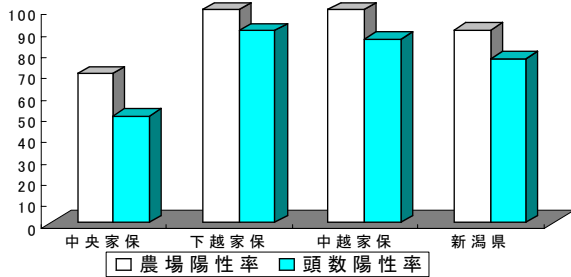
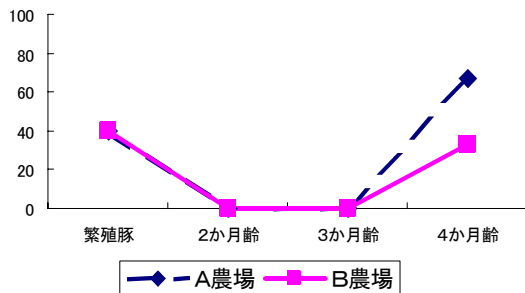


図1 IFAによる新潟県内の浸潤状況 (H15年度)

2 農場の感染パターンと抗体の推移

農場内の動態調査では、発生農場(AおよびB農場)では2戸とも5頭中2頭陽性、4か月齢で3頭中2頭、1頭が陽性であった。未発生農場4戸C、D、EおよびF農場)中1戸は繁殖豚陰性で、2か月齢ではすべて陰性であったが、早いもので3か月齢、4か月齢ではすべての農場で陽性例が存在した。発生農場では飼料添加剤の投与および飼養環境の改善(子豚舎の増設)等の対策を講じ、この時点ではすでに症状はなく、かえって未発生農場の方が陽性率が高く、小規模な発生、

発生農場



未発生農場

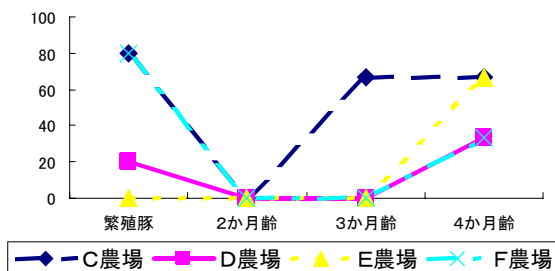


図2 IFAによる農場感染パターンと抗体の推移

または今後発生の危険性があることが示唆された。

3 廻り調査

いつ、どのように新潟県に侵入したのか、その広がりを知る目的で、昭和55年から当所に保存してあった県内養豚場の血清を用い廻り調査を実施した。5年分9戸27頭ずつ実施した。急性型の発生のあった昭和57年以前と昭和60年までは陰性であったが、平成元年には4戸(44.4%)、平成5年には2戸(22.2%)とゆるやかに浸潤していたが、平成10年には8戸(88.9%)と高い陽性率を示した。

このことは平成元年以前は急性型が主流であったが、それ以降は急性型を耐過した豚がと場へ出荷されており、つまり、平成元年は慢性型への移行の年であったのではないかと推察され、平成10年には慢性型がかなり浸潤したものと思われた。

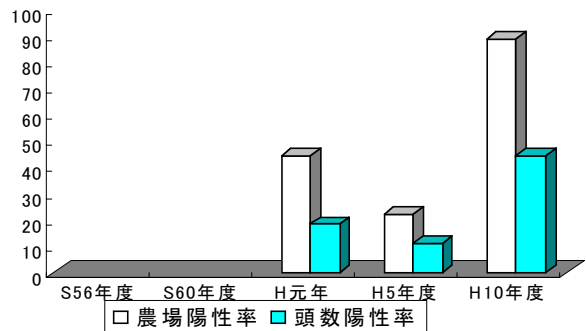
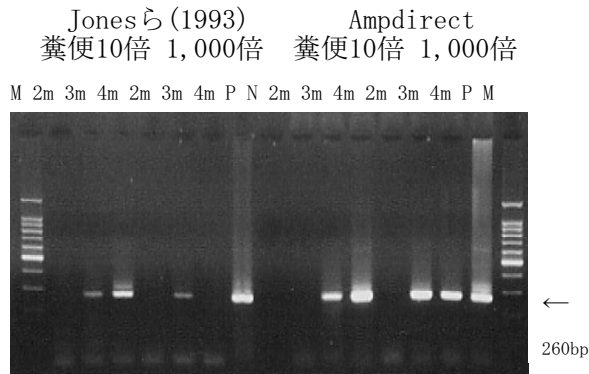


図3 IFAによる廻り調査

4 糞便からのPCRによる Lawsonia 遺伝子の検索

下痢を呈していた病性鑑定豚3頭の糞便について、Jonesらの方法である希釈液にPBS bufferを用いる方法と、血液や糞便中のPCRを阻害する物質の多い検体用に開発されたPCR反応液であるAmpdirectを用いる方法、次に糞便の阻害する物質をできるだけ排除するために、糞便の1,000倍の希釈液を用いる方法の1検体当たり4反応系の検討を実施した。その成績はfirst PCRでは検出されなかったが、Nested PCRでは260bpに3および4か月齢にLi特異バンドが形成され、1,000倍希釈ではよりAmpdirectを用いる方がクリアに検出され、本試験では1,000倍希釈糞便をAmpdirectのPCR希釈液反応系で実施した。

その結果、発生農場を含む6戸84頭からはいずれも遺伝子は検出されなかった。



注) 2m: 2か月齢 3m: 3か月齢 4m: 4か月齢
M: マーカー P: 陽性コントロール N: 陰性コントロール

図4 病性鑑定豚から Li 遺伝子の検出 (反応系の検討)

5 発生農家の聞き取り調査

発生農家9戸はすべて一貫経営で、繁殖豚は12頭から350頭と飼養規模はさまざまで、平均84.1頭であった。下痢発生の季節は秋が5戸、夏2戸、春と冬各1戸と夏から秋の発生が多かった。発生直前の投薬は投薬なしが4戸、投薬中が5戸で、薬剤の種類はオキシテトラサイクリンが2戸、ペニシリン系2戸、サルファ剤1戸であった。下痢発生の原因と考えられるものとしては大腸菌等の混合感染が4戸、*Lawsonia* による下痢が3戸、暑熱が1戸であった。発生の要因と考えられるものとして、不適正な飼養管理(密飼および移動のストレス)が4戸、環境悪化(暑熱、通風不足および床の湿潤)が3戸、飼料の変更(平成13年10月以降ミルクに血漿蛋白が未添加)が2戸であった。発生時に効果のあった対策として抗生物質の投与9戸全戸(薬剤の種類はオキシテトラサイクリン3戸、チアムリン2戸、タイロシン、リンコマイシン、ブルモチル各1戸)、飼養管理の改善(清掃、通風、消毒、一般衛生管理強化)が6戸、豚舎増設1戸であった。

考 察

以上のように、IFAによる新潟県内の平成15年現在の浸潤状況は、地域の偏りはなく、導入先、系統グループの違いに拘わらず広く浸潤していた。

また、遡り調査では22年前の昭和57年に急性型が県内で発生し、感染したものは急死していたが、急性型の発生から8年後の平成元年に急性型を耐過した豚がと場に出荷されるようになり、徐々に慢性型への移行となった。そして、その10年後の平成10年には現在とすでに変わらない陽性率を示しはじめ、舎疫化し、

当然繁殖豚も高い陽性率となり、子豚への感染する機会が増え、平成11年に病性鑑定で発育不良子豚に慢性型PPEの初確認につながったものと思われ、この遡り調査は意義深いものとなった。

農場内動態調査では、肥育豚では4か月齢で発生農場と未発生農場の区分なく、全農場で陽転し、肥育前期の感染が示唆された。今回は発生農場においても、対策実施後で、検査時には下痢の症状がなかったため、感染推察時期が肥育前期であったが、野外例では離乳後1か月以内の下痢の発生が多いことから、感染は離乳前後が多いものと思われた。

また、糞便のLi遺伝子の検出でも、下痢を呈している病性鑑定豚3頭中2頭から検出されたが、動態調査の6戸84頭の糞便からは検出されず、これは採材時下痢は治癒し、正常便であったため、糞便中のLiの排菌は検出限界の 10^3 CFU/g未満によるものと思われた。また、矢原ら⁸⁾もPPEを疑う症例の下痢便の44%が陽性であったとしているが、Liの排菌は臨床症状を伴う時期と一致しており、検出されない理由として下痢の有無や採材の時期によるものとしている。

以上のように、IFAは農場の浸潤状況の把握に、PCRは下痢の症状を呈している豚の病性鑑定に有効と判断された。

IFAによる抗体調査は矢原ら⁸⁾が全国調査で、農場陽性率95.8%と報告しており、新潟県においても同様に、PPEは広く浸潤しており、劣悪な環境や不適切な飼養管理などの発症要因が重なると、いつでも発症する危険性がある。

本病の防圧として、発症中の子豚には抗生物質の投薬、衛生面での管理として、清掃、通風、および消毒といったいわゆる一般衛生管理の強化が、発生農家の聞き取り調査で効果があったとしており、特に子豚舎の清掃消毒といった日常の衛生管理の徹底が重要である。

謝 辞

最後になりましたが、IFAスライド抗原を分与いただいたベーリンガーインゲルハイムシオノギバトメディカ株式会社に深謝いたします。

引用文献

- 1) 本間穂積ら：昭和57年度新潟県家畜保健衛生業績
発表会集録,145-150(1982)
- 2) Jones G.F.,et al.: J Clin Microbiol,31,2611-
2615(1993)
- 3) McOrist S.,et al.: Infect Immun.61(10),4286-4292
(1993)
- 4) Moller K.,et al.: Vet Microbiol,62,59-1(1998)
- 5) 村山修吾ら：平成14年度新潟県家畜保健衛生業績
発表会集録,54-57(2003)
- 6) 能勢泰宏：臨床獣医,15(10),71-77(1997)
- 7) 大宅辰夫：豚病学, 第四版, 近代出版, 東京 (1999)
- 8) 矢原芳博：臨床獣医,22,13-16(2004)