

豚増殖性腸炎とその起因菌に関する最近の知見

長井伸也・小山智洋（財団法人 日本生物科学研究所）

Nagai, S. and Koyama T. (2004) Recent progress in the research on porcine proliferative enteropathy and its causative agent *Lawsonia intracellularis*.*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 46, 8-15.

豚増殖性腸炎は、偏性細胞内寄生性細菌 *Lawsonia intracellularis*（以下 LI と略）を原因とし、遠位小腸および近位大腸の粘膜の過形成による肥厚を特徴とする疾病である。特に回腸に病変が多発することから回腸炎 (Ileitis, イリテイス) という名称もよく用いられる。本病は、肥育末期あるいは繁殖候補豚に発生し出血性下痢を伴って急死する急性型と、離乳期から肥育期にかけて軟便や下痢が持続し、増体重が低下する慢性型の、二つの病型に分類される。本病は世界各国の養豚地帯で発生し、わが国においても90%以上の農場が本菌に汚染されているとされる。LI は1995年に命名された新菌種で、その分離は極めて困難であり、未だ人工培地での増殖には成功していない。このため、世界の分離株数は15に達せず、本菌の性状には病原性を含めて不明な点が多い。本稿では、最近報告された本菌の細菌学的性状とともに、本病の診断法および海外で実用化されているワクチンについてもあわせて述べたい。

1. 臨床症状

本疾病は、急性型と慢性型に大別される。急性型（増殖性出血性腸炎 proliferative haemorrhagic enteropathy : PHE）は一般に肥育後期および繁殖候補豚に発生する（図1）。突然発症し、暗赤色のタール状便を排出して急死する。発症後、死亡をまぬがれた豚は1週間程度で次第に回復してゆく。慢性型（腸腺腫症 porcine intestinal adenomatosis : PIA）では40日齢以降、肥育後期までの豚が罹患する（図2）。便の状態は軟便程度で、重度の下痢は呈さない。元気、食欲が低下し、増体重が減少する。PIA が多数発生している農場では、ひね豚が多く、肥育豚に体重のばらつきが多い。しかし、症状だけでは本疾病と特定できず、後に述べる検査法を用いてはじめて診断することができる。

これら二つの病型は、感染する菌株の病原性ではなく、宿主の免疫状態と密接に関係すると考えられている。最近欧米で行なわれた調査によると、米国で多く見られるオールイン・オールアウト (AI/AO) を徹

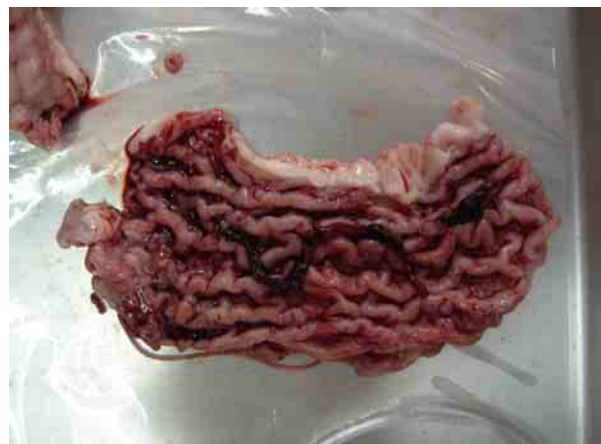


図1 PHE 発症豚の所見 血便の排泄（上）、腸管の出血像（中）、腸粘膜の肥厚と出血（下）



図2 PIA 発症豚の腸管 腸壁の肥厚がみられる

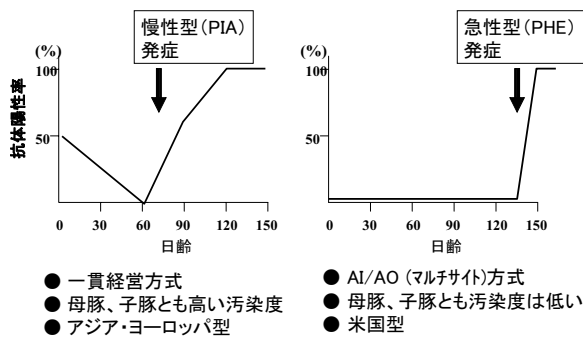


図3 慢性型 (PIA) および急性型 (PHE) 発生農場における肥育豚の各日齢における抗体陽性率

底したマルチサイトによる飼養形態では、母豚群は LI についてほとんど清浄で、抗体も陰性である。子豚群もほぼ清浄で、140日齢近くまで抗体陰性に保たれる(図3)。このような豚群に LI が侵襲すると、肥育後期豚から繁殖候補豚において、急性型である PHE が発生する。高い衛生水準が保たれている農場において、肥育後期以降に生ずる感染が何に起因するのかわからないが、農場環境のどこかに残存する LI を含む糞便が、長靴や衣服あるいは昆虫を通じて新しい豚群に侵入するものと推察されている。一方、アジアやヨーロッパに多い伝統的な一貫経営形態の農場においては、通常、母豚群は高度に LI に汚染されており、その抗体陽性率は50%以上である。そこでは、LI 保菌母豚から哺乳子豚への感染が発生し、次いで保菌子豚間や、異なるステージの豚間での水平感染が次々に起こり、LI が農場内の豚群間で循環している状態にある。抗体検査を行うと、肥育豚群では、母豚からの移行抗体が低下するや否や、すぐに野外感染が生じて抗体が上昇に転ずる。このような農場では、疾病は慢性型の PIA として進行する。PIA では特徴的な症状がみられ

ないため LI 感染症と診断しにくい、わが国の LI の汚染状況からすると、多数の農場でこの病型が発生しているものと考えられる。

2. 原因菌

(1) 分類

増殖性腸炎の病変部の組織学的観察によると、増殖した陰窩上皮細胞の細胞質内に、湾曲した桿菌が多数観察されることから、古くから本疾病は細菌感染症であると考えられてきた。しかし、原因菌を培養することができず、一時期には混合感染していたカンピロバクター属菌と間違えられていたことから、原因菌を IO (intracellular organism) または CLO (campylobacter-like organism) などの、菌種名を特定しない呼称となっていた。このような培養不可能な菌を同定するためには、分子遺伝学的手法の進歩を待たねばならなかった。1993年 Gebhart ら¹⁾は、罹患豚の腸の病変部から直接菌を抽出し、得られた DNA をテンプレートとして PCR を行い、起因菌の16S リボソーム DNA を増幅した。その塩基配列を調べたところ、*Desulfovibrio desulfuricans* の同遺伝子と91%もの高い相同性を示すことが判明し、このことから、本菌を *Desulfovibrio* 属に分類すべきかどうか議論が巻き起こった。しかし、一般に、*Desulfovibrio* 属菌種は環境中に存在する非病原菌であることから、種々の動物に対して病原性を有する本菌とはその性状が大きく異なるものと考えられた。最終的に、1995年に McOrist ら²⁾により、本菌に対して *Lawsonia intracellularis* という新しい菌属および菌種名が与えられ、現在に至っている。

(2) 形態

S字状に湾曲したグラム陰性の桿菌で、長さ1.25~1.75 μ m、幅0.25~0.43 μ m の大きさをもつ(図4)。線毛と芽胞は観察されない。鞭毛は、病変部に存在する菌には見られないが、培養細胞から放出された菌には単一の鞭毛が観察されたという報告もあり、その詳細は不明である。組織切片中に存在する菌は、ワルチン・スターリー-鍍銀染色やポリクロール又はモノクロール抗体を用いた免疫組織化学染色法により、粘膜塗抹標本中の菌は、変法チール・ネルゼン染色により、それぞれ光学顕微鏡を用いてその形態を観察することができる。DNA プロブを用いたイン・サイチュー・ハイブリダイゼーション法による形態観察も報告されている³⁾。

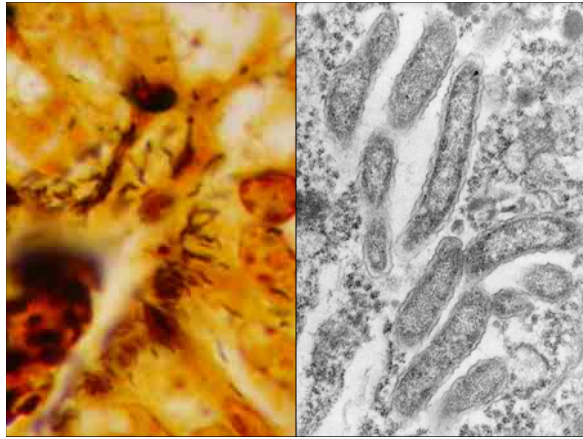


図4 腸管上皮細胞内に存在するLI菌体(写真左、ワルチン・スターリー鍍銀染色、光学顕微鏡観察;写真右、電子顕微鏡観察)

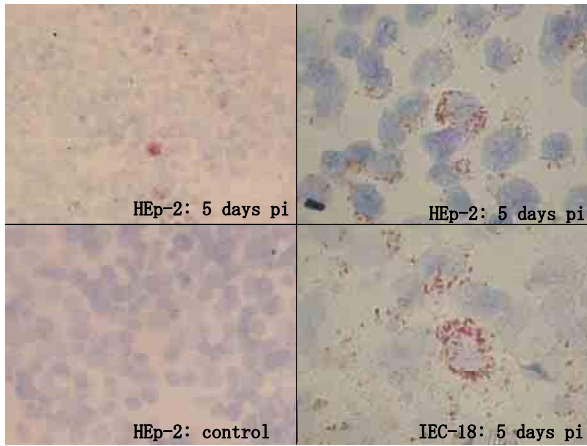


図5 HEp-2細胞およびIEC-18細胞でのLIの増殖像(免疫組織化学染色)

(3) 培養

Desulfovibrio 属菌用の特殊培地も含め、一般細菌用培地を用いて本菌を培養することには成功していない。発育鶏卵を用いた培養も不適とされる。本菌の増殖が可能な培養株化細胞として、IEC-18細胞⁴⁾、HEp-2細胞⁵⁾およびMcCoy細胞⁶⁾などが報告されている(図5)。培養条件として、酸素分圧と二酸化炭素分圧の調整が重要とされる。これらの細胞を用いても、本菌の増殖は容易ではなく、現在世界で継代・維持可能なLIの菌株数は15に満たないとされる。わが国ではKoyamaら(2004)⁵⁾による分離培養の報告がある。これによると、国内分離株の数種の遺伝子の塩基配列は、米国で分離された参照株の遺伝子とほぼ同一であり(表1)、わが国に蔓延しているLIも、欧米で分離された株と同様の性状を有する可能性が示唆されている。

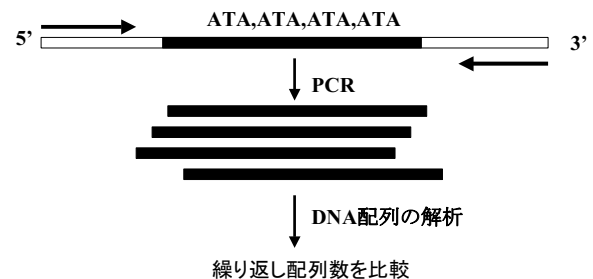
表1 日本分離株とLI参照株との遺伝子の相同

遺伝子	PCR断片のサイズ(bp)	異なる塩基数	一致率(%)	異なる塩基の位置
16S-rDNA	255	0	100	-
Species specific sequence	270	3	98.9	111,112 G→A, 229 C→T
Super oxide dismutase	543	1	99.8	522 T→G
50-kD Outer membrane protein	656	2	99.7	114 A→G, 295 G→A

(4) 分離株間の性状の差異

現在まで、各国で分離されたLI株間の遺伝学的、生化学的および血清学的性状に違いは認められていない。また、豚由来株のみならず、種々の動物由来のLI株にも違いは見つかっていない。例えば、ブタ、ハムスター、フェレット、ウサギ、シカ、ダチョウおよびウマ由来株の16SリボソームDNAの塩基配列は、98%以上同一である。さらに、病原性の強い野生株と、後に述べる弱毒ワクチン株との間にも、病原性以外の性状に差は認められていない。このように、LIは極めて均質な性状をもった菌種であると考えられる。

ごく最近、Becklerら(2004)⁷⁾はVNTR(variable number tandem repeats)法というユニークな株型別法をLIに応用した。これは、LIのゲノム上に「CA」および「ATA」の繰り返し配列がそれぞれ2および4ヶ所存在し、これらの繰り返し配列数を調べ、株固有のマーカーに利用しようとするものである(図6)。その結果、米国における4つのPHE発生事例において、同一事例で分離されたLI菌株のVNTR型は同じであったが、別の事例で分離された株のVNTR型はそれぞれ異なったという。また、各株を培養細胞で継代しても、株固有のVNTR型は変化しなかった。今後、このような遺伝学的性状を利用した株型別方法がさらに開発され、LIの疫学調査に応用されていくものと



(Beckler et al., 2004)

図6 VNTR法の模式図

考えられる。

(5) 遺伝子解析

培養できる菌株が限られていることから、LIの遺伝子解析はまだあまり進んでいない。現在までに配列が公表されている遺伝子として、16SリボソームDNA、熱ショックタンパク質の一種であるGroEL遺伝子⁸⁾、および細胞への接着と侵入に関係するというLsaA遺伝子⁹⁾などがある。また、最近、本菌のゲノムの全塩基配列が解読され、そのサイズは1,457,619bpであったという。しかし、この配列には特許がかかっており、一般には公開されないとのことである。

3. 病理発生

増殖性腸炎に特有の粘膜の肥厚は、病理組織学的観察によると陰窩上皮細胞の腺腫様過形成からなる。すなわち粘膜は、伸張、拡張あるいは枝分かかれするなど過度に形成された陰窩からなる(図7)。では、LIが感染すると、どのようにしてこのような独特の病変が形成されるのであろうか。現在までの知見をまとめてみた。

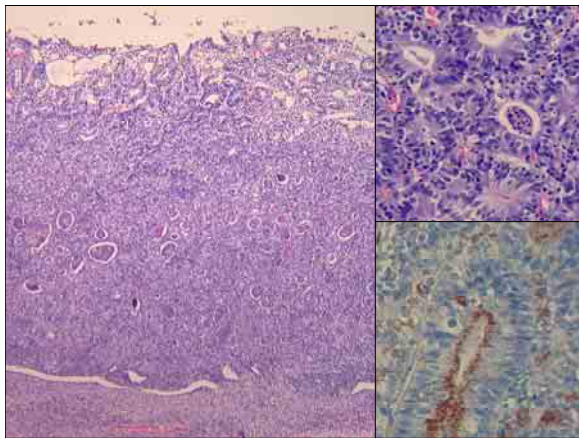


図7 回腸粘膜の腺腫様過形成像(左)、強拡大(右上)、陰窩上皮細胞内に存在するLI菌体(右下、免疫組織化学染色)

細胞レベルでの菌の侵入・増殖機構

LIは、単独で宿主の腸陰窩上皮細胞や培養細胞内に侵入することが可能である。はじめに細胞膜に密着し、次いで膜に結合した状態で細胞内小胞に入る(図8)。その後、LIを取りこんだ小胞は細胞内で破裂し、菌は感染細胞の細胞質内に出て自由な状態で存在し、分裂・増殖する。細胞質内で菌が多数増殖すると、今度は菌を保有した感染細胞自体が分裂を始め、LIを保有したまま次々と増殖していく。培養細胞における観察によると、菌が感染細胞から隣接した細胞に直接伝

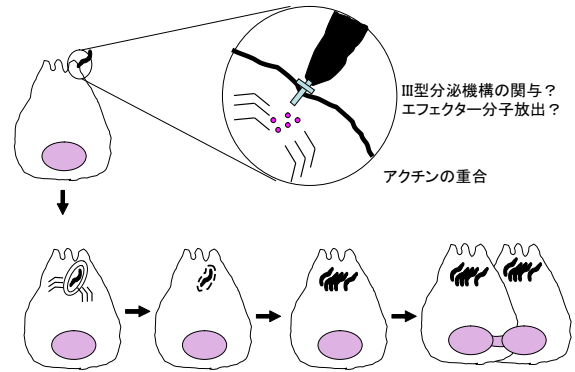


図8 細胞レベルで見たLIの侵入、増殖過程

播していくような像はみられず、感染細胞集団と正常細胞との境界は明瞭である。以上の観察から、LIは、感染細胞が菌を保有したまま分裂を続けるという特殊な方法によって、その感染を拡大していくように思われる。

(1) 宿主における腸管病変形成機構

実験感染5日後には、すでにLIは腸の陰窩細胞の細胞質に検出される(図9)。感染10日後には細胞内の菌数が増加し、未熟な腸陰窩細胞の過剰な発育が認められる。感染15から20日後には、絨毛は通常の2から3倍程度長くなり、湾曲する。これは過形成した上皮か

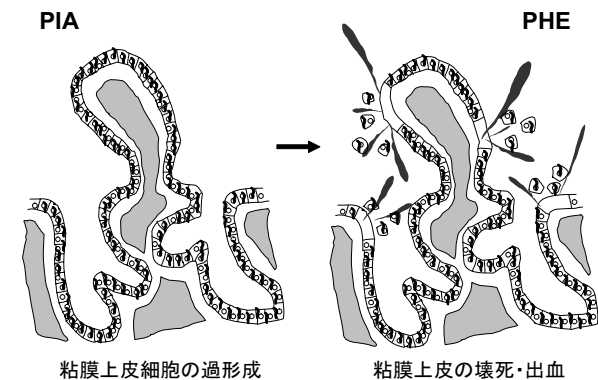
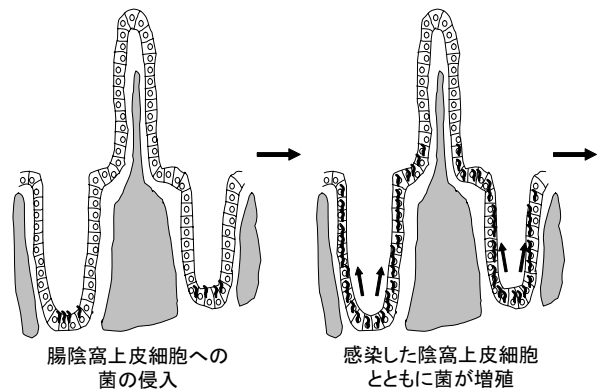


図9 腸管におけるPIAおよびPHA病変形成過程

ら構成され、杯細胞は著しく減少し、PIAの状態となる。さらに病変が進行すると、化膿性肉芽腫性の変化が生ずる。上皮が脱落し、他の細菌感染などによって粘膜が壊死に陥ると、好中球、組織球、形質細胞、好酸球などの浸潤が起こる。粘膜から多量の出血が起こり、PHEの状態となる。さらに長く経過すると、壊死細胞片、浸潤細胞および線維素からなる偽膜を形成し、さらに線維芽細胞の増殖により肉芽組織が形成され、過形成した上皮が消失することもある。回復の転帰をとると、感染細胞を含んだ上皮は腸管管腔に突出し、やがて放出される。収縮した上皮細胞やアポトーシス体を含む細胞が粘膜内に分布する。これらの病変に隣接して、杯細胞をもち、柔突起を形成した、細胞内に菌を含まない正常な上皮組織の広がり認められる。

(2) 病変形成に関与する要因

McOristら(1993)¹⁰報告によると、無菌豚あるいは数種の腸内細菌のみをもつトピオート豚は、攻撃試験によるLIの感染成立が困難であった。このことから、コンベンショナル豚の保有する腸内細菌叢は、LIが感染する過程においてなんらかの役割を示す可能性が示唆された。その詳細は現在のところ不明であるが、腸内の酸化・還元電位の変化、腸細胞の分裂速度への影響、LI自体の病原性を修飾するなどへの関与が推察される。給与された飼料の種類によるLI感染への影響は、一般的には小さいものである。しかし、給与した飼料によっては、実験感染後の菌の排泄期間や病変形成率に差が認められたとの報告¹¹もみられる。

4. 診断

(1) 剖検による肉眼病変の確認と病理組織学的検査

剖検により、回腸から結腸にかけて特徴的な粘膜の肥厚病変の存在を肉眼的に確認する。PHEではさらに偽膜の形成、凝血した血栓の付着、血液の貯留などが観察される。病変部の病理組織学的検索では、粘膜上皮に陰窩上皮細胞の腺腫様過形成を観察する(図7)。杯細胞は著しく減少していることが多い。増殖した粘膜上皮細胞内に、ワルチン・スターリー鍍銀染色あるいは免疫組織化学染色によって、湾曲した桿状の菌体の存在を多数認める。粘膜塗抹標本では、変法チール・ネルゼン染色により細胞内に存在する菌体を観察する。

(2) ネステイドPCR法

Jonesら(1993)¹²は、クローン化されたLI特異DNA断片の配列からプライマーを選定し、ネステ

イドPCR法を開発した。糞便中の阻害物質はしばしばPCR法における検出感度を低下させるが、ネステイド化することにより、感度が100倍上昇したと述べられている。本法によれば、組織から抽出した菌体では10個、糞便中においては10(3)個/gの感度で菌を検出することができ、ワルチン・スターリー鍍銀染色法による回腸切片の病理組織学的検査と同等の感度であるとされる¹³。このように、培養が困難なLIにおいては、本法が最も標準的な菌検出法となっている。屠場出荷豚における増殖性腸炎様病変の検索によると、肉眼的検査において増殖性腸炎と診断された中の50%はLIとは関係のないものであり、病理組織学的検査とPCR法の結果はよく一致した¹⁴。

(3) 血清反応

現在最も一般的に実施されている血清反応は、培養細胞で培養したLI菌体を不活化して抗原とした間接蛍光抗体法(IFAT)である。Knittelら(1998)¹⁵は、LIを実験的に感染させて4週間調査したところ、PCR法では39%、IFATでは90%の豚が陽性と判定された。このことから、生前検査においてはPCR法よりもIFATの方が優れていると述べた。これは、一部の動物しか、検出可能な量のLIを糞便中に排出していないからであると考えられる。Guedesら(2002)¹⁶はLI感染細胞を用いた免疫酵素モノレヤーアッセイ(IPMA)を開発した。実験感染豚における感度および特異性はIFATと同様に高く、両検査法の成績は98.6%一致した。ELISAは一般に感度が高く、多数検体の処理が可能な有用な抗体検査法であることから、LI感染症についてもその開発が望まれている。最近、本菌のELISAについてはBoesenら¹⁷、Wendtら¹⁸、Wataraiら¹⁹による報告がみられるが、その中でWendtらは、ELISAを用いてドイツの豚群について大規模な抗体調査を行ない、各農場のLI汚染状況の把握に利用した(図10)。

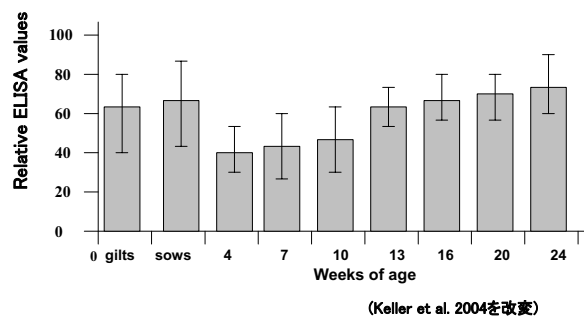


図10 ELISAによるドイツの22豚群のLI抗体検査成績

5. 対策

(1) LIに有効な抗生物質の投与

タイロシン、リンコマイシン、チアムリンなどがLIに対して有効とされる。予防的に投与する場合は、タイロシン110 ppm、リンコマイシン120 ppm、チアムリン130 ppmの濃度で、いずれも3週間連続して飼料添加投与する。臨床的に発症が見られる場合には、隔離して治療を行なうことが望ましい。上記抗生物質を注射にて投与し、次いで、タイロシンを9 mg/kg用量で、一日二回、三日間飼料添加投与する。同居豚への飲水投与も1週間程度あわせて行なう。飲水添加では、タイロシンを5~10 mg/kg用量で7日間投与、あるいはチアムリンを60 ppmで5日間投与する方法が有効とされる。

(2) ワクチン

1993年にLIを培養細胞を用いて増殖できるようになって以来、ワクチン開発に向けた研究が開始された。継代可能となったLI株を、培養細胞を用いてさらに長期継代したところ、豚に対する病原性が低下した株が得られた。この株を利用し、パーリンガー・インゲルハイム社は、2001年、米国において世界で初めてLI生ワクチンを実用化した。この製品は、LI生ワクチン株を培養細胞を用いて増殖させ、細胞ごと液体窒素中に凍結したものであった。用法は、豚1頭当たり2 mLを1回、経口投与する。実際には、自動薬液混合器を用いて飲料水中に加えるか、または各豚房に簡単な水飲み用の桶を設置して、飲水中に所定量のワクチンを加え、自然に飲水させて投与する。2004年中には本ワクチンがEU諸国で認可される模様だが、これはその凍結乾燥型の製品である。凍結乾燥することにより、ワクチンの輸送が容易になり、EU各国への輸出が可能になったものと思われる。投与方法、効能・効果などは凍結型のものと同様である。

本ワクチンの実験室内における効果は、開発者の一人であるJ. Kroll氏により最近学術雑誌に公表²⁰⁾されているので、これを参照されたい。野外豚における効果については、約10万頭の豚にワクチンを投与してその有効性を調べるといふ、大規模な市販後調査が北米で実施された。その結果についてMcOrist(2004)²¹⁾が記載したところによると、屠場検査において増殖性腸炎病変が減少し、菌定着率が抑制されるなどの有効性が示された。PHE発生農場においては、死亡率が低下した。経済効果については、ワクチン群において一日増体重は平均で6%改善し、平均淘汰率は23%改善さ

れた。飼料効率の改善は明白ではなかった。さらに、仕上げ期に投与される抗生物質を50から100%減少させることができた。このように、本ワクチンを投与することにより、増殖性腸炎によってもたらされる経済的被害を大幅に軽減することが可能であったと述べている。

本ワクチンは、現在のところ日本を含めたアジア諸国では認可・販売されていないが、近々輸入されて利用されることが予想される。強いて本ワクチンの問題点を挙げるとすると、マーカーの点がある。現在のところ、LIに関しては、血清型はもちろん、他の方法においてもオーソライズされた株型別法はなく、ワクチン株と野外株とを識別することはできない。すなわち、ワクチン使用農場において検出されたLIが野外株なのかワクチン株なのかは判別不能であるし、検出される抗体についても、ワクチンテイクによるものなのか野外感染に起因するものかわからない。このことは、ワクチンの有効性と安全性を、科学的に分析する際の障害になるものと考えられる。次に、米国における本ワクチンの成功は先に述べた通りであるが、米国でのLI感染症の主体は急性型のPHEである。一方、ヨーロッパやアジア各国においては、伝統的な一貫経営農場が多く、発生の主体は明白な臨床症状を示さない慢性型のPIAである。このように、異なる疫学状況下において、本ワクチンが明白な経済効果を発揮することができるのかどうか、今後ヨーロッパにおいて蓄積されるであろう使用成績についても注目してゆきたい。また、ワクチンによる免疫成立のメカニズム、例えば体液性免疫、粘膜免疫または細胞性免疫のいずれが防御の主体となっているのかについては現在のところ不明であるため、今後、さらに基礎的知見を積み重ねていくことにより、より効果的なワクチンの利用方法や効果判定方法が明確になると考えられる。

(3) その他の対策

ワクチンや抗生物質以外に、ユニークな対策も報告されている。Winkelmanら(2004)²²⁾は、LI菌体で鶏を高度に免疫し、得られた鶏卵内容を凍結乾燥し、豚の飼料に混合した。5週齢豚に免疫卵パウダーを混合した飼料を投与してLI攻撃を行なったところ、非添加飼料を投与した対照群に比べ、一日増体重が有意に増加した。このことから、増殖性腸炎に起因する増体重の低下を抑制するのに、LI特異的IgY抗体を含む卵パウダーの飼料添加は有効であると述べた。

6. まとめと課題

LI 研究における最大の問題点は、菌の培養方法が確立されていないことである。通常の細菌培養用培地での発育には成功していないし、培養細胞を用いる場合でも、野外材料から LI を分離して維持・継代できるようになるまで、専門の研究室でも半年以上を要するという。人の *Helicobacter pylori* 感染症においては、人工培地を用いて菌を発育できるようになってから目覚しく研究が発展し、数々の新しい診断、治療法が開発された。このような経緯からすると、LI についても、簡易かつ大量に増殖可能な培養法を確立することは、本菌感染症対策を開発する上において、最も重要な課題であるといえる。

次に株型別の問題が挙げられる。LI は世界各国に蔓延しているのだが、アジア、ヨーロッパ、アメリカなど、各地域に分布している菌株にそれぞれ特徴はあるのだろうか？また、各株によって病原性は異なるのだろうか？ワクチン株と野外株の識別は可能になるのだろうか？種々の動物の増殖性腸炎から LI が分離されるが、それらは各動物種に固有の株なのだろうか？あるいは、同一の LI が様々な動物に増殖性腸炎を起こすのか？このように、LI の疫学においては、多数の疑問が残されたままになっている。VNTR 法などの新しい株型別法の開発は、これらの問題の解決への糸口となるかもしれない。また、LI の全塩基配列が解読されたとのことであるが、現在のところは公表されていない。今後、数株の全塩基配列が解読され、それらと比較することができるようになれば、この分野における大きな進展が期待される。

生物学的基礎研究においては、LI 感染による増殖性腸炎病変の形成過程において、数々の興味深い現象が存在する。例えば、菌が細胞に接着する際に鞭毛を利用するのか？なぜ、成熟した腸管上皮細胞ではなく、未熟な陰窩の細胞を標的にして侵入するのか？細胞侵入する際に通常、細胞内侵入菌の用いるⅢ型分泌機構を利用するのか？もしそうならば、宿主細胞内のアクチンを凝集させるための菌側の出すエフェクター分子は何か？細胞内に取りこまれて空胞内で生存するために、過酸化水素などの酸化物質に抵抗する因子を産生するのか？空胞を破壊する機構とこれに関与する分子は何か？また、最も興味を持たれることとして、細胞内で菌が増殖すると、感染した陰窩上皮細胞自体が無制限に増殖するという現象が挙げられる。これは、菌が何らかの物質を生産して宿主細胞に働きかけ、細胞

の増殖を制御している機構に変調を起こすためではないかと想像される。LI は様々な動物で同様の増殖性腸炎を起こすことから、哺乳類の陰窩上皮細胞に共通に存在する機構を利用しているのかも知れない。このように、LI と腸管上皮細胞とのコミュニケーションについて分子レベルで解明することに対する興味は尽きない。また、これらの研究から得られる知見は、より優れた LI 対策用のワクチンを生み出し、さらには新しい普遍的な腸管免疫機構の発見にも繋がるかもしれない。

LI 疾病対策については、現在、米国で開発された生ワクチンが、急速に世界へ普及しつつある。本ワクチンには先に掲げたような未解決の課題も存在するが、その有用性は非常に高いものであり、今後、LI 対策を考える上での重要な資材となることは間違いないであろう。

以上述べてきたように、LI 感染症は世界各国において高度に蔓延し、養豚産業に多大な経済的被害を及ぼす疾患であることが解明されつつある。それにもかかわらず、原因菌の培養が困難なことから、他の感染症に比べると、まだまだ未解決の事項が多い疾病でもある。今後、細菌学的な知見の蓄積に伴い、その疾病対策技術も進歩し、LI 感染症を制御することによって、養豚経営上大きなメリットがもたらされることが期待される場所である。

参考文献

- 1) Gebhart, C. et al. (1993) Ileal symbiont intracellularis, an obligate bacterium of porcine intestine showing a relationship to *Desulfovibrio* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 43: 533-538.
- 2) McOrist, S. et al. (1995) Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. Int. J. Syst. Bacteriol., 45: 820-825.
- 3) Gebhart, C. et al. (1994) Specific in situ hybridization of the intracellular organism of porcine proliferative enteropathy. Vet. Pathol. 31: 462-467.
- 4) Lawson, G.H.K. et al. (1993) Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance in vitro. J. Clin. Microbiol. 31: 1136-1142.
- 5) Koyama, T. et al. (2004) In vitro cultivation and partial characterization of *Lawsonia intracellularis*

- from a Japanese field case of porcine proliferative enteropathy. Proc. 18th Int. Pig. Vet. Soc. Congr., 1: 307.
- 6) Guedes, R.M. and Gebhart C.J. (2003) Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. Vet. Microbiol. 91: 135-145.
- 7) Beckler, D.C. et al. (2004) Molecular epidemiologic typing of *Lawsonia intracellularis*. Proc. 18th Int. Pig. Vet. Soc. Congr., 1: 249.
- 8) Dale, C.J. et al. (1998) Identification and sequencing of the groE operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: use in phylogeny. Microbiology., 144 : 2073-2084.
- 9) McCluskey, J. et al. (2002) LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection in vitro and in vivo. Infect. Immun., 70: 2899-2907.
- 10) McOrist, S. et al. (1993) Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. Infect Immun., 61: 4286-4292.
- 11) Boesen, H. T. et al. (2004) The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. Vet. Microbiol., 103: 35-45.
- 12) Jones, G.F. et al. (1993) Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., 31: 2611-2615.
- 13) Jones, G.F. et al. (1993) Relationship between Ileal symbiont intracellularis and porcine proliferative enteritis. Infect. Immun., 61: 5237-5244.
- 14) Jones, G.F. et al. (1993) Comparison of techniques for diagnosis of proliferative enteritis of swine. Am. J. Vet. Res., 54: 1980-1985.
- 15) Knittel, J.P. et al. (1998) Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. Am. J. Vet. Res., 59: 722-726.
- 16) Guedes, R.M. et al. (2002) A comparative study of an indirect fluorescent antibody test and an immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy. J. Vet. Diagn. Invest., 14: 420-423.
- 17) Boesen, H.T. et al. (2004) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serologic test for *Lawsonia intracellularis* the agent of porcine proliferative enteropathy. Proc. 18th Int. Pig. Vet. Soc. Congr., 1: 251.
- 18) Wendt, M. (2004) Epidemiological investigations on *Lawsonia intracellularis* infections in German pig herds. Proc. 18th Int. Pig. Vet. Soc. Congr., 1: 253.
- 19) Watarai, M. et al. (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Lawsonia intracellularis* in rabbits with proliferative enteropathy. J. Vet. Med. Sci., 66: 735-737.
- 20) Kroll, J.J. et al. (2004) Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. Am. J. Vet. Res., 65: 559-565.
- 21) McOrist, S. (2004) Ileitis - one pathogen, several diseases. Ileitis symposium, Hamburg, June 28th 2004, Boeringer Ingelheim.
- 22) Winkelman, N.L. et al. (2004) Effectiveness of *Lawsonia intracellularis* specific chicken egg antibody to control ileitis in a swine disease challenge model. Proc. 18th Int. Pig. Vet. Soc. Congr., 1: 257.