

## 子豚下痢便からの病原微生物の検出成績

勝田 賢、河本麻理子、川島健司、恒光 裕 (動物衛生研究所)

Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K. and Tsunemitsu, Y. (2006):

Enteropathogens in suckling and weaned piglets with multi-etiological diarrhea in Japan.

*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 48, 1-6

## はじめに

豚の消化器感染症は、呼吸器感染症と共に常在性疾病とも称され、多くの農場で問題となっている。常在性疾病による被害は、死亡や淘汰による商品化率の低下に加え、発育遅延・飼料効率の低下、肉質の低下、衛生対策費の増加等多岐にわたり、養豚経営に与える経済的被害が甚大な疾病である。

豚下痢の発生には、病原体に加え、飼育環境や豚の日齢や免疫状態などの様々な要因の影響を受ける。また、下痢症には多様なウイルス、細菌、寄生虫が関与しており、その診断・対策を困難にしていると考えられる。しかし、わが国においては、豚下痢症に関して総合診断的成績がないため、各微生物の関与頻度は明らかにされていない。そこで、わが国における子豚下痢症の実態を明らかとすることを目的として、子豚下痢症の野外調査を下痢に関与頻度が高いと考えられる病原体を中心に実施した。

## 試験研究方法

## 1. 検査材料

2001年から2003年に7県16農場から収集した哺乳豚153頭、離乳豚116頭の下痢便を供試した。

## 2. ウイルス検査

ウイルス検査はロタウイルス、サポウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス、豚流行性下痢ウイルスを検索対象に、糞便からRNAを抽出してreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法により行った(2、6、15、20)。また、ロタウイルスについてはRNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動法を併用し、血清群の同定も同時に行った(19)。

## 3. 細菌検査

細菌検査は大腸菌、サルモネラ菌、*Clostridium perfringens*を対象に定法に従い行った。

大腸菌については1検体当たり10コロニーを純化し、病原因子に関連する遺伝子を標的にPCR法によりスクリーニングを行い、病原遺伝子が検出され

たものを病原性大腸菌(以下「大腸菌」とした。標的遺伝子は易熱性エンテロトキシン(LT)遺伝子、耐熱性エンテロトキシン(STaとSTb)遺伝子、ペロ毒素(VT1、VT2、VT2e)遺伝子、線毛抗原(F4、F5、F6、F41、F18)遺伝子、attaching and effacing病変に関与する遺伝子(eaeA)とした(4、5、9)。また、分離した大腸菌株のO群血清型別は既報(13)に従い行った。

## 4. 寄生虫検査

寄生虫検査はコクシジウムとクリプトスポリジウムを対象に10倍希釈した糞便懸濁液からショ糖液遠心浮遊法でオオシストを集め、その有無を判定した。

## 5. 感染試験

感染試験には毒素原性大腸菌(ETEC)(O9:H:F6、 $1.0 \times 10^8$ CFU/頭)とA群ロタウイルス(Hokkaido-14株(VP7型:G9、VP4型:P[23]型)、 $1.0 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>/頭)を用いた。供試豚は子宮切断術により作出した初乳未摂取豚を用いて、滅菌アイソレーターで飼育した。子豚を大腸菌とロタウイルスの単独感染群と混合感染群の3群(各群2頭)とし、各病原体を3日齢時に経口感染させた。混合感染群では両微生物を同時に接種した。接種後2週間、臨床症状(便性状、食欲、元気)を観察すると共に、直腸便を採取し接種微生物の排出量を調べた。臨床症状は、Shermanら(16)の報告を参考に症状を数値化した。

## 結果の概要

## 1. 下痢便からの病原体検出成績

哺乳豚153頭中90頭(58.9%)は、ロタウイルス(74頭)、大腸菌(3頭)、サポウイルス(2頭)、コクシジウム(14頭)の単独感染であり、34頭(22.2%)からは複数の病原体が同時に検出(以下混合感染)された。また、26頭(17.0%)では今回検索対象とした病原体は検出されなかった(表1)。混合感染と診断された下痢便からの病原体検出成績を図1に示した。哺乳豚では、34頭中11頭でロタウイルスとコクシジウムが、10

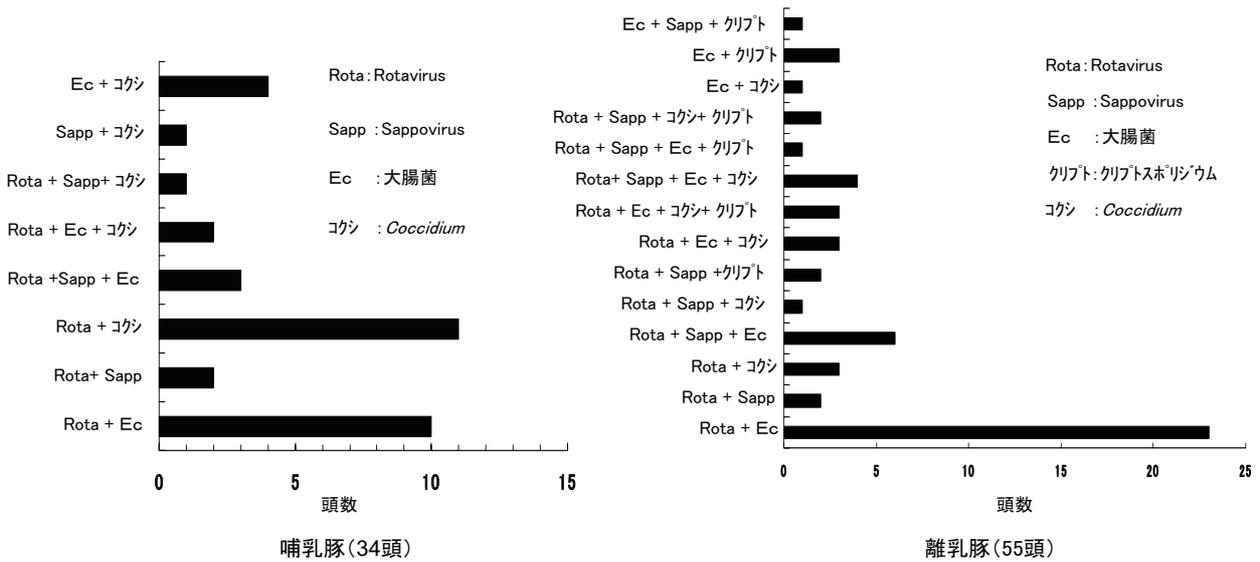


図1 混合感染の病原体検出成績

表1 子豚下痢便からの病原体検出成績

病原体	哺乳豚		離乳豚	
	陽性頭数	陽性率 (%)	陽性頭数	陽性率 (%)
単独感染				
ロタウイルス	74	48.4	26	22.4
大腸菌	3	2.0	16	13.8
サポウイルス	2	1.3	5	4.3
コクシジウム	11	7.2	0	0.0
クリプトスポリジウム	0	0.0	3	2.6
混合感染	35	22.9	55	47.4
原因不明	28	17.0	11	9.5
合計	153	100.0	116	100.0

頭でロタウイルスと大腸菌が同時に検出された。混合感染に関与する病原体としては、ロタウイルスが85.3% (29頭) と最も多く、次いで大腸菌とコクシジウムがそれぞれ55.9% (19頭)、サポウイルスが20.6% (7頭) であった。

離乳豚116頭中50頭 (43.1%) は、ロタウイルス (26頭)、大腸菌 (16頭) サポウイルス (5頭)、クリプトスポリジウム (3頭) の単独感染であり、55頭 (47.4%) は、混合感染であった。また、病原体が検出されなかった離乳豚は11頭 (9.5%) であった (表1)。混合感染と診断した離乳豚では、ロタウイルスと大腸菌の重感染が55頭中23頭 (41.8%) と最も多く認められた。次いでロタウイルス、大腸菌、サポウイルスの3重感染が6頭、ロタウイルス、大腸菌、サポウイルス、コクシジウムの4重感染が4頭認められた。混合感染時の各病原体検出率は、ロタウイルスが90.9% (50頭)、大

腸菌が81.8% (45頭)、サポウイルスが34.5% (19頭)、コクシジウムが30.9% (17頭)、クリプトスポリジウムが21.8% (12頭) であり、離乳豚下痢のほとんどにロタウイルスと大腸菌が関与していた。

なお、伝染性胃腸炎ウイルス、流行性下痢ウイルス、サルモネラ菌および *Clostridium perfringens* C 型菌は今回の調査では検出されなかった。

2. 週齢別病原体の検出率成績

各病原体の検出率を検査豚の週齢別に比較した (表2)。大腸菌の検出率は3週齢まで約13%で推移したが、4週齢以降50%以上の豚から検出されるようになり、検出率に有意差が認められた (P<0.05)。ロタウイルスは、5週齢では検出率が43.5%に低下しているものの、全週齢を通して非常に高率に検出され、特に1週齢では80%以上の豚から検出された。サポウイルスの検出率は、4週齢まで数~10%程度で移行したが、

表2 子豚の週齢別病原体検出成績

豚週齢	検出頭数 (%)					合計
	ロタウイルス	大腸菌	サポウイルス	コクシジウム	クリプトスポリジウム	
1	49 (81.7)	8 (13.3)	2 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	60
2	27 (61.4)	6 (13.6)	1 (2.3)	16 (36.4)	0 (0.0)	44
3	28 (60.9)	6 (13.0)	5 (10.9)	12 (26.1)	0 (0.0)	46
4	31 (77.5)	22 (55.0)	1 (2.5)	4 (10.0)	1 (2.5)	40
5	20 (43.5)	25 (54.3)	13 (28.3)	12 (26.1)	13 (28.3)	46

表3 母豚産歴別病原体検出成績 (120頭)

母豚産歴	検出子豚頭数 (%)				合計
	ロタウイルス	大腸菌	サポウイルス	コクシジウム	
1産	30 (21.6)	10 (5.6)	5 (4.0)	5 (2.9)	38
2産	15 (18.0)	2 (1.3)	1 (0.7)	4 (2.7)	19
3-4産	14 (11.0)	1 (0.2)	2 (1.9)	6 (4.3)	27
5産以上	17 (12.2)	6 (11.1)	2 (1.4)	16 (22.9)	36

5週齢では28.3%の豚から検出された。コクシジウムは1週齢の豚からは検出されず、2週齢以降の豚で検出されるようになった。特に2~3週齢では検査豚の3分の1以上から検出され、4週齢以降に検出率が低下している (P<0.05)。クリプトスポリジウムは哺乳豚からは検出されず、4週齢以降の離乳豚から検出された。

3. 母豚産歴別病原体の検出成績 (表3)

母豚産歴が明らかな哺乳豚120頭について産歴別病原体検出率の比較を行った。ロタウイルスとサポウイルスでは、初産豚での検出率が2産以上の豚と比較して高く、特にロタウイルスの検出率には有意な差が認められた (P<0.05)。一方、コクシジウムの検出率は、5産以上の高産歴で高く、検出率に有意差が認められた。大腸菌の検出率は初産及び5産以上で高く、特に初産豚での検出率と2~3産の検出率に有意差が認められた (P<0.05)。

4. 検出されたロタウイルスの血清群

哺乳豚103頭、離乳豚75頭から検出されたロタウイ

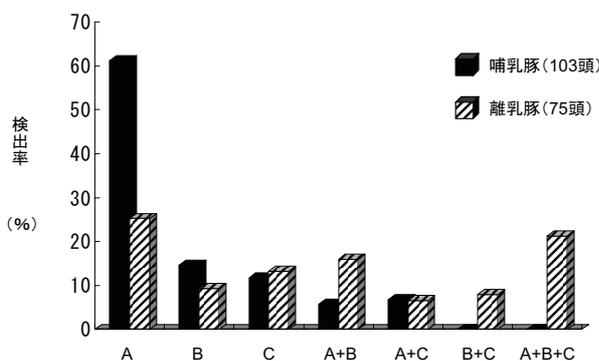


図2 各血清群ロタウイルスの検出率

ルス各血清群の検出率を比較した (図2)。哺乳豚ではA群単独感染が61.2%と最も多く認められ、次いでB群単独が14.6%、C群単独が11.7%であり、検出されたロタウイルスの87.5%が単一血清群で、残り12.5%からは複数の血清群に属するウイルスが同時に検出された。一方、離乳豚では、A群単独が25.3%、B群単独が9.3%、C群単独が13.3%と哺乳豚と比較するとA群単独感染が減少していた。また、ロタウイルスが検出された豚の51.6%から複数の血清群が

同時に検出され、A群、B群およびC群の3群が同時に検出された個体も21.3%認められた。

5. 分離大腸菌の性状

分離された大腸菌の線毛遺伝子は、検出頻度の高い順にF4が38株、F18が12株、F6が10株、F5が7株、F41が2株であり、eaeA遺伝子が4株から検出された。また、これらの付着因子が検出されなかった株が14株認められたが、いずれも離乳豚からの分離株であった (表4)。毒素遺伝子はSTaが22株、LT・STa・STbの3種類のエンテロトキシン遺伝子を保有する株が21株、STa・STbが13株、LT・STa・VT2eが8株、VT1が4株、VT2eとLT・STaがそれぞれ3株、STb・VT2eが2株、STbが1株であった。また、今回検出されたVT2遺伝子はすべてVT2eであった。分離大腸菌のO群血清型は、O149が39株と最も多く、次いでO141が11株、O20が12株、O8が8株、O9が7株、O139が3株、O64が1株であった。また、8株が今回用いた免疫血清で型別できなかった。

線毛遺伝子と血清型との関係を表5に示した。F4線毛遺伝子を保有する38株中33株 (86.8%) がO149で、残り5株がO9であった。F5は5株すべてがO8であり、F6線毛10株中7株がO20であった。また、F18線毛10株中8株がO141であった (表5)。

6. 感染試験結果

大腸菌またはロタウイルスの単独感染群では、観察期間を通して死亡する個体は認められなかったが、混合感染群では、感染6日目に1頭が死亡した。また、混合感染群と単独感染群の臨床症状に有意な差が認められた (P<0.05) (図3)。ロタウイルスの総排出量

表4 分離された大腸菌の病原因子

付着因子	毒素遺伝子陽性株数										合計
	LT	STa	STb	VT1	VT2e	LT+	STa+	STb+	LT+STa	LT+STa	
						STa	STb	VT2e	+VT2e	+STb	
F4	6	3	0	0	0	0	8	0	0	21	38
F5	0	4	0	0	0	0	1	2	0	0	7
F6	0	8	0	0	0	0	2	0	0	0	10
F41	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
F18	0	0	0	0	2	0	0	0	10	0	12
eaeA	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	4
Negative	0	7	1	0	1	3	2	0	0	0	14
合計	6	24	1	4	3	3	13	2	10	21	87

表5 分離大腸菌のO群血清型と線毛遺伝子との関係

線毛および毒素遺伝子型	株数	O群血清型(株数)
F4・LT	6	O149 (6)
F4・STa	3	O9 (3)
F4・STa&b	8	O9 (2), O149 (6)
F4・LT・STa&b	21	O149 (21)
F5・STa	4	O8 (4)
F5・STa&b	1	O8 (1)
F6・STa	8	O20 (5), O64 (1), 141 (2)
F6・STa&b	2	O20 (2)
F41・STa	2	O9 (2)
F18・VT2e	2	O139 (2)
F18・LT・STa・VT2e	10	O141 (10)
Neg・STa	7	O20 (5), O141 (2)
Neg・STb	1	O20 (1)
Neg・VT2e	1	O139 (1)
Neg・LT・STa	3	O8 (3)

や排出期間については、単独感染群と混合感染群の間に有意な差が認められなかったが(図4)、大腸菌については、混合感染群で排出期間の延長や排出量の増加が認められた(P<0.05)(図5)。

考察・まとめ

豚の感染性下痢症について原因調査を行った結果、哺乳豚では58.9%が単独感染、22.2%が混合感染であり、離乳豚では43.1%が単独感染、47.4%が混合感染

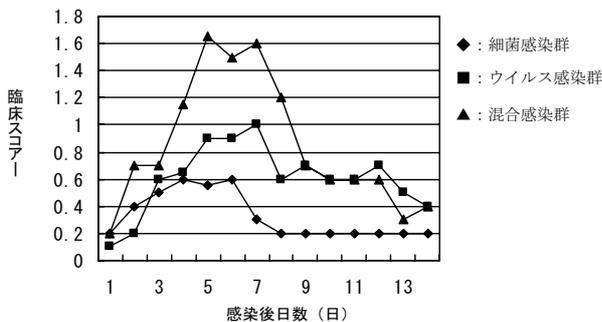


図3 感染試験豚の臨床症状の比較

であった。これまで豚下痢症の原因調査では哺乳豚、離乳豚ともに60~80%が単独病原体感染に起因するとされていたが(8, 12)、今回の調査結果から、わが国においては、複数の病原体が関与する下痢症例が多数存在することが明らかとなった。

検出された病原体別では哺乳豚の67.3%、離乳豚の65.5%からロタウイルスが検出され、本ウイルスが国内の豚下痢症の主要因であると考えられる。Johnsonら(8)もロタウイルスが子豚下痢症に関与する最も重要な病原体で、哺乳豚の35%、離乳豚の60%から分離された事を報告している。今回の調査では、特に哺乳豚における検出頻度が顕著に高く、1週齢以内の新生豚からも高率に検出されている。ロタウイルスによる下痢症は“3 week scours”とも呼ばれ(1)、従来、離乳期に当たる3週齢前後に多発し、移行抗体により防御されている新生豚ではロタウイルスによる下痢の発生は希と考えられていた。今回、1週齢の発症豚から81.7%と非常に高率にロタウイルスが分離されたこと、初産豚由来子豚からの本ウイルスの検出率が経産豚に比較して高かったことから考え、母豚の抗体レベルや子豚の初乳摂取状況がロタウイルス性下痢症の発生に大きく関与していると推察される。

哺乳豚から分離されるロタウイルスの60~70%は血清群A群に属し、離乳豚では非A群や複数血清群の同時感染の割合が増加する事が報告されている(7)。今回の調査でも同様の結果が得られた。ロタウイルスでは異なる血清群のウイルス間で交差防御反応は成立しないので、離乳豚では、離乳時の群編成により血清群

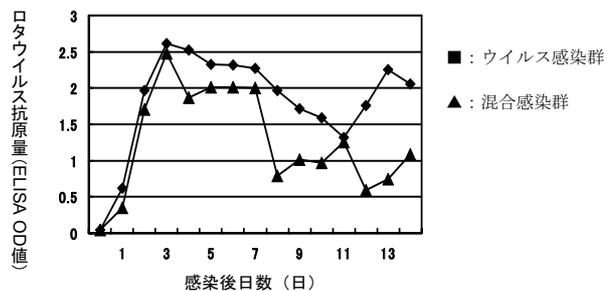


図4 実験感染豚の直腸便中のロタウイルス量の比較

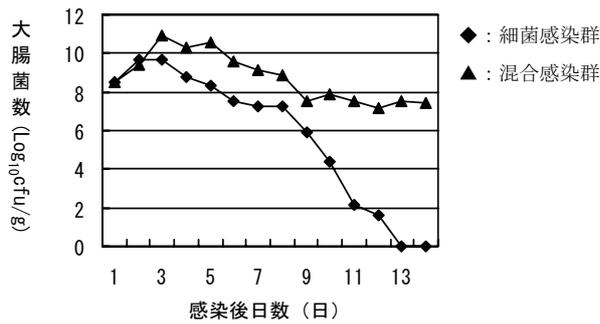


図5 実験感染豚の直腸便中の大腸菌排出量の比較

の異なる株の感染を受けた結果、複数の血清群のウイルスが検出されると考えられる。また、このことが離乳後下痢症の病態をさらに複雑化しているとも考えられる。

大腸菌は、哺乳豚の17.2%、離乳豚の58.1%から分離され、既報(8、12、13)と比較して哺乳豚での分離頻度が低下している。これは、毒素原性大腸菌のワクチン接種や抗生物質の適切な使用により、哺乳期での発生が制御されているためと考えられる。分離された大腸菌の92.0%は1種類以上のエンテロトキシンを産生し、79.3%の株が付着線毛遺伝子を保有していたことから、従来通り、子豚の下痢原性大腸菌の主因は毒素原性大腸菌であることが明らかとなった。

分離された毒素原性大腸菌の血清型は検出頻度順に、O149、O141、O20、O8、O9、O64であり、既報(3、11、13)と同様O149が最優勢であった。また、浮腫病に関与するF18・VT2e遺伝子を保有する株が離乳豚から12株分離され、内10株は同時にエンテロトキシン遺伝子も保有していた。このような株の感染では下痢に引き続き浮腫病が発生することや下痢を主症状として発生することがあり農場での対策を困難にしていると考えられる。

豚の糞便からのコクシジウム検出率は10~15%と報告されているが(18)、今回の調査では2~3週齢の哺乳豚から高率(37%)に検出された。哺乳豚に下痢原性を示すコクシジウムは2属5種が報告されている(17)。今回の調査では種同定まで行わなかったが、今後は種同定を含めた更に詳細な調査を行う必要があると考えられる。

離乳豚に対するコクシジウムやクリプトスポリジウムの下痢原性は明確ではないが、混合感染下痢では主原因が特定できない事例が多く存在し、また、単独感染に比較すると症状が重篤化する傾向が報告されている。また、子豚に対してほとんど病原性を示さない病

原体も混合感染では起病性を発揮することがある。今回離乳豚から分離されたコクシジウムやクリプトスポリジウムはこれに該当すると考えられる。

今回の調査は大腸菌とロタウイルスが同時に検出される症例が多く、哺乳豚では混合感染と診断された豚の44.1%、離乳豚では72.7%から少なくともこれら2種類の病原体が検出された。

大腸菌とロタウイルスの重感染では、腸管での分泌亢進と吸収不全が同時に起こるため、単独感染に比較し、死亡率の上昇や症状の悪化に繋がる(14)。また、離乳豚においてはロタウイルスの先行感染による小腸絨毛の損傷が毒素原性大腸菌の定着を容易にしているとの報告もある(10)。今回行った混合感染試験においても、大腸菌の動態に有意な差が認められたことから、ロタウイルスと大腸菌の混合感染による病態の悪化は、感染病原体間の相加作用(吸収不全と分泌亢進)だけではなく、ロタウイルス感染による小腸粘膜等の腸内環境の変化が、大腸菌の定着または増殖を促進し、病態の悪化に繋がったとも推察される。

今回の調査から、子豚下痢症の30%には複数の病原体が関与していることが明らかとなった。特にロタウイルスは検査豚全体の65%以上と非常に高率に検出されており、本ウイルスを中心とした複合感染下痢症の予防対策の確立が急務であると考えられる。

おわりに

本研究は、(独)動物衛生研究所所内プロジェクト「複合感染症としての豚下痢症の実態解明」により実施された。本課題を推進するに当たり、検査材料の採取等にご協力頂いた皆様に深謝致します。

参考文献

- 1) Bohl, EH., Kohler EM., Saif, LJ. et al.: Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 172, 458-463 (1978).
- 2) Duarte, M., Tobler, K., Bridgen, A. et al.: Sequence analysis of the porcine epidemic diarrhea virus genome between the nucleocapsid and spike protein genes reveals a polymorphic ORF. Virology. 198, 466-476 (1994).
- 3) Fairbrother, JM., Lariviere, S. & Johnson, WM.: Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. Am. J. Vet. Res.

- 49, 1325-1328 (1988).
- 4) Frydendahl, K.: Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol.* 85, 169-182 (2002).
  - 5) Gannon, VP., Rashed, M., King, RK. et al.: Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 31, 1268-74 (1993).
  - 6) Gouvea, V., Glass, RL., Woods, P. et al.: Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28, 276-282 (1990).
  - 7) Janke, BH., Nelson, JK., Benfield, DA. et al.: Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 308-311 (1990).
  - 8) Johnson, MW., Fitzgerald, GR., Welter, MW. et al.: The six most common pathogens responsible for diarrhea in newborn pigs. *Vet. Med.* 4, 382-386 (1992).
  - 9) Kwon, D., Kim, O. & Chae, C.: Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 146-151 (1999).
  - 10) Lecce, JG., Balsbaugh, RK., Clare, DA. et al.: Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrheic pigs. *J. Clin. Microbiol.* 16, 715-723 (1982).
  - 11) 又吉正直、貝賀眞俊、大城聡他: 沖縄県で分離された子豚下痢由来腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の細菌学的性状と病原遺伝子保有状況. *日獣会誌*54, 595-600 (2001).
  - 12) Morin, M., Turgeon, D., Jolette, Y. et al.: Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: Infectious causes of significant outbreaks. *Can. J. Comp. Med.* 47, 11-17 (1983).
  - 13) Nakazawa, M., Sugimoto, C., Isayama, Y. et al.: Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from piglets with neonatal and post-weaning diarrhea in Japan. *Vet. Microbiol.* 13, 291-300 (1987).
  - 14) 中澤宗生: 大腸菌病. 豚病学 (柏崎守ほか編). 第4版, 328-337, 近代出版、東京 (1999).
  - 15) Qian, YA., Jiang, BM., Saif, LJ. et al.: Sequence conservation of gene 8 between human and porcine group C rotaviruses and its relationship to the VP7 gene of group A rotaviruses. *Virology* 182, 562-569 (1991).
  - 16) Sherman, DM., Acres, SD., Sadowski, PL. et al.: Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Escherichia coli* K99-specific monoclonal antibody. *Infection Immunity* 42, 653-658 (1983).
  - 17) 志村亀夫: 寄生虫による豚の下痢症. *臨床獣医*, 807, 17-20 (1988).
  - 18) 志村亀夫: コクシジウム病. 豚病学 (柏崎守ほか編). 第4版, 407-409, 近代出版、東京 (1999).
  - 19) Theil, KW., McCloskey, CM., Saif, LJ. et al.: Rapid, simple method of preparing rotavirus double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 14, 273-280 (1981).
  - 20) Vaughn, EM., Halbur, PG. & Paul, PS.: Three new isolates of porcine respiratory coronavirus with various pathogenicities and spike (S) gene deletions. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1809-1812 (1994).