

豚流行性下痢症の病原であるコロナウイルスの豚継代

桑原博義* 布谷鉄夫* 鮫島都郷* 田島正典*

(昭和 62 年 12 月 24 日受理)

Passage in Piglets of a Coronavirus Associated with Porcine Epidemic Diarrhea
HIROYOSHI KUWAHARA, TETSUO NUNOYA, TOGO SAMEJIMA and
MASANORI TAJIMA (Nippon Institute for Biological Science, Ome, Tokyo 190)

SUMMARY

During a period from late 1982 to early 1983, outbreaks of acute diarrhea were observed in swine of all ages throughout Japan. Transmissible gastroenteritis virus and rotavirus were ruled out as the cause by the immunofluorescent and serological examinations performed on specimens from two infected piglets obtained from two farms. The disease was reproduced, and the causative agent was passaged in piglets by oral inoculation with a trypsin-treated emulsion prepared from the small intestine of infected piglets. Numerous coronavirus-like particles were demonstrated by electron microscopy in negatively stained preparations of feces and intestinal contents, as well as in thin sections of the small intestinal mucous membrane from infected animals. Based on the data collected, it was concluded that the present cases should be diagnosed as porcine epidemic diarrhea caused by a coronavirus different from transmissible gastroenteritis virus.

要 約

1982 年末から 1983 年初めにかけて日本の各地で、すべての年齢の豚に水様性下痢を主徴とする疾病が発生した。2 発生農場から採取した 2 発病子豚の感染材料に対する蛍光抗体法および血清学的試験は伝染性胃腸炎 (TGE) およびロタウイルスの関与を否定した。感染子豚由来の小腸乳剤にトリプシンを加え、子豚に経口接種したところ、野外例と同様の水様性下痢が再現され、豚での継代が可能であった。また、実験感染子豚の小腸乳剤を用いた豚での接種試験では、接種材料へのトリプシン添加、無添加にかかわらず、水様性下痢が再現されたが、水様性下痢が起こるまでの潜伏期は、トリプシンを加えた場合の方が若干短かった。これら実験感染子豚の下痢便および腸内容のネガティブ染色ならびに小腸粘膜の切片法による電子顕微鏡観察により多数のコロナウイルス様粒子が証明された。これらの観察から、今回流行した豚の急性下痢症は、TGE ウイルスとは異なる新しいコロナウイルスを原因とする豚流行性下痢症 porcine epidemic diarrhea (PED) と診断すべきであると結論された。

豚のウイルス性下痢症としては伝染性胃腸炎 (TGE) とロタウイルス感染症が知られていた。1970 年代以後、外国では TGE ウイルス (TGEV) とは抗原性の異なるコロナウイルスによる下痢症が豚流行性下痢症 porcine epidemic diarrhea の病名のもとに報告されている^{1,8,9)}。電子顕微鏡 (電顕) 検索によってコロナウイルス粒子が証明されるが、感染性因子の細胞培養への分離は不成功に終わっている。したがって、中和抗体の検出も現在は不可能な状況にある。しかし、豚への伝達は行われ感染子豚の下痢便からも同様のウイルス粒子が検出されている¹⁻³⁾。

わが国においても水様下痢を起こした子豚の小腸材料

から TGEV とは異なるコロナウイルス様粒子が検出された^{11,13)}。しかし、豚の実験感染の報告は見当たらない。1982 年末から 1983 年初めまでを発生の頂点として、日本の各地で食欲不振と水様下痢を主徴とする豚の急性下痢が集団発生した。この下痢はすべての日齢の豚に発生したが、死亡率は 7 日齢以内の発病豚では 0~40% であり、10 日齢以上の豚では水様下痢が 3~4 日間続いたのち、耐過生残する場合が多かった。このような下痢の発生した 30 養豚場での下痢便ならびに頻死期および死亡直後の子豚計 130 例を病性鑑定材料として供試した。これらのうち、菌分離陰性で、TGEV および豚ロタウイルス (PRV) 蛍光抗原陰性の 2 例の小腸を材料として子豚での継代試験を行った。本報告には臨床観察、血清学的試験および電顕的観察の成績の概要を記載する。

* (財)日本生物科学研究所(東京都青梅市新町2221-1)

1. 材料と方法

1) 供試豚

実験室内で飼育し、分娩させたパークシャー種の3日齢豚4頭、9日齢豚3頭と、パークシャー種とヨークシャー種の1代雑種の3日齢豚6頭を継代試験に用いた。また、長野県下の養豚場で生産された6および7日齢のヨークシャー種とランドレース種の1代雑種10頭を接種材料へのトリブシン添加が下痢の発生に及ぼす影響の試験に用いた。これらの豚は試験開始の前日または導入直後から無菌人工乳で飼育した。

2) 接種材料

鹿児島県下のJ農場および香川県下のY農場で、それぞれ1983年3月および10月に採取された下痢発症子豚の小腸材料(JおよびY材料)を用いた。次代への継代には前代発症子豚の小腸を用いた。小腸は腸内容とともにリン酸緩衝食塩液(PBS⁻)で10%乳剤とし、1,100×g, 20分間遠心、その上清をさらに7,600×g, 20分間遠心し、その上清を孔径450nmのメンブランフィルターで濾過後、接種材料とした。

3) 豚継代試験

結晶トリブシン(牛由来, SIGMA社製, type III)を10μg/mlに含むPBS⁻を接種材料に等量に加え、37°で60分間保った後、その5mlまたは2.5mlを供試豚に経口接種した。接種材料へのトリブシン添加が下痢発症に及ぼす影響をみるための試験では同一材料を二分し、その一方には前述の方法でトリブシンを加えて2mlを、他方はそのまま1mlを経口接種した。臨床症状の観察は約4時間ごとに行った。下痢発症後、下痢便を採取するとともに供試豚を殺処分し、小腸を継代材料として採取した。また、同時に子豚の腸管各部位を含む諸器官を採取し、病理学的ならびに電顕的に検査した。

4) 電顕的検査

下痢便はPBS⁻で20%乳剤とし、3,700×g, 20分間遠心後、上清をさらに120,000×g, 60分間遠心した。沈渣を少量の蒸留水に浮遊して1%酢酸ウランでネガティブ染色し、電顕(日本電子社製, JEM-100B)で観察した。ホルマリン固定の腸管材料は1%オスミウム酸で再固定し、エポック812に包埋した後、超薄切片とし酢酸ウランと硝酸鉛で二重染色した。

5) 血清学的試験

J材料接種豚の10%小腸乳剤に前述の方法でトリブシンを添加し、その10mlを長野県下の養豚場で生産された抗TGEVおよび抗PRV中和抗体陰性の50~60kgの豚4頭に経口接種した。うち2頭には4週間後に、他の2頭には8週間後に、小腸乳剤にホルマリンを0.2%に加え、4°で7日間置いた後、1ml当たりに水酸化アルミニウムゲル10mgを加えて10mlを筋肉内注射し

た。これらの豚から経口接種前、筋肉注射時および注射後2および4週目にそれぞれ採血し、抗TGEVおよび抗PRV中和抗体の検出を行った。

2. 成績

1) JおよびY材料の豚継代試験

図1に示すように、感染材料接種豚は野外例と同様の症状を呈した。おもな症状は、灰白色の激しい水様下痢で悪臭はなく、下痢便中に固型物および剝離した粘膜は観察されず、TGEの症状とはほぼ同様であった。

(1) J材料の豚継代試験

初代: J材料5mlを経口接種した3日齢の豚No.3は、28時間の潜伏期ののち症状を示した。下痢症状は4時間後にはやや回復して水分に富む泥状となり、殺時の46時間目まで継続した。豚No.4は96時間目に灰白色水様便を排泄し、その症状は114時間目の殺時まで継続した。

2代: 豚No.3の小腸乳剤5mlを経口接種した9日齢の豚No.7は88時間目に軟便を、92時間目に水様便を排泄した。この症状は約12時間続いたのち、やや軽減して水分に富む泥状便に、124時間目には軟便となり、144時間目に回復した。いっぽう、同一材料5mlを経口接種した3日齢の豚No.12は接種後44時間目に軟便、56時間目に水様便を排泄した。この症状は69時間目の採材時まで継続した。No.13は接種後52時間目に軟便を排泄したが、その後症状に変化は認められず、69時間目に殺処分した。

これらの豚は、下痢の発現とともに元気・食欲が減退したが、嘔吐は認められなかった。

(2) Y材料の豚継代試験

初代: Y材料5mlを経口接種した3日齢の豚Nos.1および2は52および56時間目にそれぞれ発症し、66時間目の採材時まで同様の症状を呈した。

2代: 豚No.1の小腸材料5mlを経口接種した豚No.6は38時間目に発症した。No.5は48時間目に水分に富む泥状便を、52時間目から水様便を排泄した。その症状は採材時の69時間目までそれぞれ継続した。

3代: 豚No.5の小腸乳剤2.5mlを経口接種した3日齢の豚4頭のうちNos.9および11は22時間目に嘔吐を、No.10は嘔吐と水分に富む泥状の下痢を示した。Nos.10および11は23時間目に発症し、No.9は水分に富む泥状の下痢便を排泄した。No.8および同腹の無接種豚に異常は認められなかった。これら4頭の豚を23時間目に殺処分し採材した。

2) 接種材料へのトリブシン添加が発症に及ぼす影響

Y材料の豚継代3代、豚No.8のトリブシン添加10%小腸乳剤2mlを経口接種した豚No.15は、12時間目に軟便、16時間目に嘔吐を示し、同時に水様便を排泄

接種材料	継代数	供試豚		症状 ¹⁾ の推移(時間)														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	
J 材料	1	3	3	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														+
			4	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														+
	9	7	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														生残 NT	
		13	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														-(+) NT	
Y 材料	1	3	1	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														NT
			2	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														NT
	2	9	5	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														+(+)
			6	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														+
	3	3	8	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														#
			9	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														#
			10	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														#
			11	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														#
			15	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														NT
	4	6	16	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														NT
			17	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														生残 NT
18			[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														生残 NT	
19			[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														生残 NT	
Y 材料 (トリプシン 無添加)	4	6	20	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														7日目死 NT
			21	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														生残 NT
			22	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														7日目死 NT
			23	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														8日目死 NT
			24	[Normal] [Diarrhea] [Mucous] [Greyish] [Death]														7日目死 NT

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) †：殺 4) +：死亡

図1. 豚コロナウイルスJおよびY材料の豚継代試験成績

した。他の4頭は20時間目にそれぞれ発症した。そのうち、3頭の水様便は52時間続いたのち泥状となり、144時間目に回復した。豚Nos. 15および16は44および72時間目にそれぞれ死亡した。

いっぽう、トリプシン無添加の同一乳剤1mlを経口接種した豚No. 20は、12時間目に軟便、16時間目に泥状便、24時間目から水様便を排泄した。他の4頭は32~36時間目から水様便を排泄し始め、36~48時間継続した。72時間目からは全例が泥状便に変化した。以後の回復は遅く、5頭中4頭は7あるいは8日目に死亡した。No. 21は生残したが、以後の発育は不良であった。

3) 病理学的所見

全例に共通して小腸壁は中等度に菲薄となり、内容物が容易に透視し得た。腸間膜リンパ節および鼠径リンパ節は軽度に腫大した。他の諸器官に著変は認められなかった。

組織学的病変は小腸に限局し、他の器官に著変は認められなかった。小腸の主要病変は絨毛の萎縮であった。豚No. 5(Y材料2代目)の感染後69時間目の小腸絨毛の長さは十二指腸で185±58μm、空腸で225±21μm、回腸で129±53μmであり、無接種対照豚のそれぞれの部位の絨毛の長さと比較してほぼ1/4、1/2および1/3にすぎなかった。

4) 電顕的観察

感染豚の下痢便あるいは腸内容の部分精製試料のネガティブ染色標本ならびに十二指腸、空腸および回腸の切片には、コロナウイルスの特徴的形態をもつ粒子が観察された。水様下痢を起こす直前の材料では多数のウイルス粒子が観察されたが、下痢を起こしてから時間が経過した材料ではウイルス粒子が検出されないか、またはごく少数が観察されたのみであった。下痢便あるいは腸内

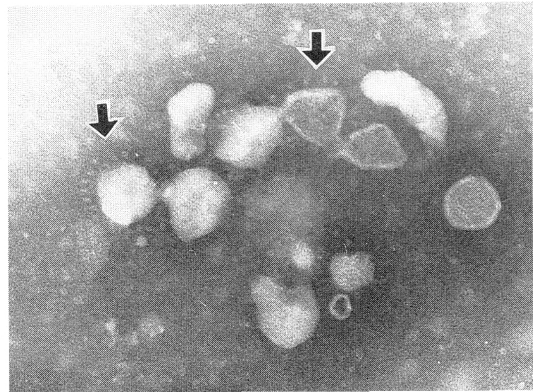


写真1 感染豚の下痢便の部分精製試料のネガティブ染色：花卉型の特徴的な表面突起をもつウイルス粒子を示す(矢印 ×160,000)



写真2 継代2代目材料を経口接種後23時間目で殺した子豚の空腸粘膜上皮細胞：細胞質の空胞および細管内に無数に、左上の微絨毛の間に少数のウイルス粒子を認める（×13,000）

容の部分精製試料中の表面突起を除いたウイルス粒子は、直径90~100nmであり、長さ10~20nmの特徴的な表面突起をもっていた(写真1)。十二指腸、空腸および回腸の切片では上皮細胞の細胞質の空胞内、管状構造内あるいは細胞外の微絨毛の間隙に直径70~90nmの無数の粒子が観察され、これらの粒子にも特徴的な表面突起が認められた(写真2)。また、細胞質封入体もしばしば認められた。

なお、本試験での観察材料中には他のウイルス粒子はまったく認められなかった。

5) 血清学的試験

JおよびY材料を大量に接種した豚の血清には、抗TGEVおよび抗PRV抗体はいずれの時点でも検出されなかった。

3. 考 察

1982年から1983年にかけて、日本の各地でTGEに類似した豚の伝染性急性下痢症が多発した。本病による子豚の死亡率は0~40%と低率であること、下痢症状の持続が2~4日間とやや短かいこと、嘔吐を示す症例が少ないことなどから、TGEV以外の病原の関与が疑われた。その想定を裏づけるように蛍光抗体法によって感染組織にTGE抗原は証明されず、また、野外発生例から得た2種類の感染材料を大量に接種した豚の血清に、中和試験により抗TGEVおよび抗PRV抗体の産生も認められなかった。さらにそのうえ、実験感染豚材料の電顕的観察により多数のコロナウイルス様粒子が証明された。また、罹患豚の小腸乳剤の経口接種により病気は容易に伝達され、かつ4代にわたって子豚に継代された。これらの観察から本症はコロナウイルスによる新しい豚の下痢症であると確認された。

豚継代試験において、下痢発現後18時間以上を経過

した感染豚の小腸乳剤を子豚に経口接種した場合には、下痢の発現までに52~92時間を要したが、下痢発現の直前または直後の材料を経口接種した場合には、大部分が20~30時間で下痢を発現した。このことは、下痢便あるいは小腸内容中に電顕的に証明されるウイルス粒子数を勘案して、たぶん接種材料中のウイルス量に関係あるものと考えられた。

COUSSEMENT²⁾は、子豚におけるコロナウイルスCV777株の感染実験において、潜伏期間を22~36時間であるとしている。本試験における潜伏期間は、接種材料にトリプシンを添加した場合には16~20時間、トリプシン無添加の場合には24~36時間であって、COUSSEMENTらの成績とはほぼ一致した。トリプシン処理のウイルスあるいはウイルス感染に及ぼす影響について、STORZ¹²⁾は牛コロナウイルスL9株のブランクサイズが増大すること、OTSUKI⁷⁾は鶏伝染性気管支炎ウイルスのブランクが出現しやすいこと、KOMANIWA⁸⁾はTGEV野外株のST培養細胞での分離が容易になることを述べている。SAIFとBOHL¹⁰⁾は、TGEVがST培養細胞でCPEまたはブランクを起こす能力は、培養液にパンクレアチンまたはトリプシンを加えることにより高められると述べている。さらに、ESTES⁴⁾はサルタウイルスSA11の構造タンパクに及ぼすトリプシンの影響を調べ、外層カプシッドのVP3がトリプシン処理によってVP5とVP8に開裂し、産生されたVP5がウイルスの感染性の発現に必要であると述べている。本試験におけるコロナウイルスに対するトリプシンの作用機序は明らかでないが、接種材料にトリプシンを添加した場合と無添加の場合で潜伏期にわずかであったが差がみられたことは、接種前に本コロナウイルスがトリプシンによりなんらかの作用を受けたことを示唆している。しかし、この現象は5頭の豚についての成績であるので、さらに例数を重ねて確認したい。

肉眼的および組織学的に認められる感染豚の病変は腸管に限局し、その主要な変化は小腸絨毛の萎縮であった。水様下痢発症後18時間目で殺処分して計測した豚No.5の小腸各部の絨毛の長さは、無接種対照豚のその約1/2~1/4に萎縮していた。この成績はCOUSSEMENT²⁾およびDE BOUCK³⁾がCV777株の豚における実験感染豚で得た成績とはほぼ一致した。TGEVに感染した子豚の小腸絨毛と陰窩の長さの比は1:1になると報告されている⁵⁾。したがって、本試験におけるコロナウイルス感染豚の小腸絨毛の萎縮はTGEの場合よりも軽度なようである。

本試験において、電顕により検出されたウイルス粒子の形態は、TGEVを含め各種動物から分離されているコロナウイルスのそれとまったく一致していた。しかしながら、今回の豚における急性下痢の発生例は蛍光抗体

法および血清学的試験により TGEV との関与はまったく否定された。

これらの成績から、今回流行した豚の急性下痢症は豚流行性下痢症 (PED) と診断すべきものと考えられ、豚で継代された鹿児島県下 J 農場由来のウイルスを豚コロナウイルス KS 株、香川県下 Y 農場由来のウイルスを豚コロナウイルス 83 P-5 株と名付けた。

なお、これら 2 株のコロナウイルスが外国で発生している PED の原因ウイルスと同一のものであるか否かは今後の研究によって決定されなければならない。

引用文献

- 1) CHASEY, D. and CARTWRIGHT, S. F.: *Res. Vet. Sci.*, 25, 255~259 (1978).
- 2) COUSSEMENT, W., DUCATELLE, R., DE BOUCK, P., et al.: *Vet. Pathol.*, 19, 46~56 (1982).
- 3) DE BOUCK, P. and PENSART, M.: *Am. J. Vet. Res.*, 41, 219~223 (1980).
- 4) ESTES, M. K., GRAHAM, D. Y. and MASON, B. B.: *J. Virol.* 39, 879~888 (1981).
- 5) HOOPER, B. E. and HAELTERMAN, E. O.: *J. A. V. M. A.*, 149, 1580~1586 (1966).
- 6) KOMANIWA, H., MAKABE, T., FUKUSHO, A., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 48, 1245~1248 (1986).
- 7) OTSUKI, K. and TSUBOKURA, M.: *Arch. Virol.*, 70, 315~320 (1981).
- 8) PENSART, M. B. and DE BOUCK, P.: *Arch. Virol.*, 58, 243~247 (1978).
- 9) PENSART, M. B.: *Disease of Swine*, 6th ed., 402~406, LEMAN, A. D., STRAW, B., and GLOCK, R. D. eds. Ames, Iowa State University Press, Iowa (1986).
- 10) SAIF, L. J. and BOHL, E. H.: *Disease of Swine*, 6th ed., 255~274, LEMAN, A. D., STRAW, B. and GLOCK, R. D. eds., Ames, Iowa State University Press, Iowa (1986).
- 11) SHIRAI, J., SHIMIZU, M. and FUKUSHO, A.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47, 1023~1026 (1985).
- 12) STORZ, J., ROTT, R. and KALUZA, G.: *Infect. Immun.*, 31, 1214~1222 (1981).
- 13) TAKAHASHI, K., OKADA, K. and OHSHIMA, K.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45, 829~832 (1983).

明治の 動物用医薬品

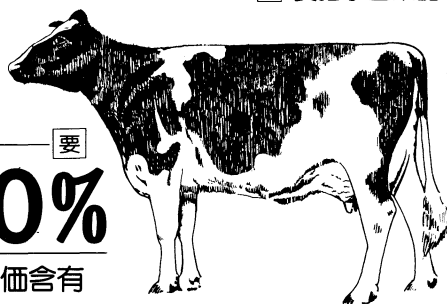
要:要指示医薬品

牛の大腸菌性下痢・サルモネラ症に!
新系統の抗生物質 ホスホマイシン製剤

抗生物質経口投与剤

ホスミン細粒40%

●本剤1g中にホスホマイシンカルシウム400mg力価含有



特 長

1. 特異な構造と抗菌作用。
2. 広い抗菌力と殺菌的作用。
3. 他剤耐性菌にも有効。
4. 高い安全性と低い毒性。
5. 臓器・組織への高い移行。

★包装 1g×100分包



明治製薬株式会社

104東京都中央区京橋2-4-16