わが国における *Lawsonia intracellularis* による 豚増殖性腸炎の確認と本病の 生前診断法の検討

高橋清人

岸本嘉夫

岩城秀治[†]

塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ (〒520-3423 甲賀郡甲賀町大字五反田1405)

(2002年1月15日受付・2002年9月12日受理)

要 約

豚増殖性腸炎の診断を依頼された回腸材料について組織学的検査を行い、粘膜上皮細胞の増殖性病変が13農場(65.0%)由来の22例(46.8%)に観察された。病変が認められた材料から*Lawsonia intracellularis* (Li)に対するモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法によりLi抗原が、またPCRによりLiのDNA断片が検出された。次いで、生前診断法としてのPCRおよび蛍光抗体法による抗体測定の有用性について、発症豚の病変部乳剤を用いた感染試験により評価した。直腸便のPCR検査では接種豚15頭中7頭が陽性を示し、出血性下痢便を検査した3回はいずれも陽性であった。しかし、陽性の持続は短期間であった。Nested PCRおよび抗体測定では、発症に関係なく接種豚すべてが陽性となった。PCRは出血性下痢便の検査に、Nested PCRおよび抗体測定は豚群でのLi潜在感染と浸潤状況の調査に適していると考えられた。

——キーワード：感染試験，免疫蛍光抗体法，*Lawsonia intracellularis*，PCR，豚増殖性腸炎。

-----日獣会誌 56, 73～77 (2003)

豚増殖性腸炎 (Porcine Proliferative Enteropathy : PPE) は、回腸末端部の肥厚を特徴とし、離乳後から肥育前期の豚には慢性の下痢や発育不良を起こし、肥育後期以降には出血性下痢や突然死を引き起こす。増殖した回腸粘膜上皮細胞内には、PPEの起因菌である*Lawsonia intracellularis* (Li) が多数観察される [8, 12, 13]。Liは偏性細胞寄生性 [10] であり、多数の細菌が存在する糞便や腸管からの分離は容易でなく、Liの分離はPPEの診断法として実用的ではない。診断は回腸の組織学的な増殖性病変の観察、細胞内細菌の確認およびモノクローナル抗体 [9] を用いた免疫蛍光抗体法により行われている。これらは死後の診断法であり、分布調査および予防対策を講じるために必要な生前診断法としては、糞便中のLiの特異DNAを検出するPCR [1, 3-5, 11] および蛍光抗体法による血清中抗体の測定 [6] がある。Li感染の検出率では、後者の方が高いと報告されている [6]。今回は、わが国におけるLi感染によるPPEの確認を行い、PCR、感度と特異性を向上させたNested PCRおよび血清中抗体測定法の生前診断法とし

ての有用性を感染実験により評価した。

材 料 お よ び 方 法

供試材料：1996～2000年に、全国20農場からPPE検査を依頼された47例の回腸材料を用いた。

病理組織学的検査：常法に従い回腸のパラフィン薄切切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施した。増殖性病変が観察された標本はWarthin-Starry銀染色を行い、上皮細胞内の細菌を確認した。さらに、Liの25～27KdのOuter membraneに特異的なモノクローナル抗体 (Dr. McOristより分与) [9] を用いた間接免疫蛍光抗体法により、特異蛍光を確認した。感染試験では、組織学的に回腸粘膜上皮の増殖性病変が観察された場合、PPE病変陽性と判断した。

PCR：回腸からのDNA抽出材料は、粘膜部分の乳剤を750×g 10分遠心し、上清を8μm, 1.2μmおよび0.8μmフィルターを通過させ、8,000×g 10分遠心した沈渣の浮遊液を用いた [4]。また、直腸便および回腸内容物では浮遊液を材料として、InVisorb DNA

[†] 連絡責任者：岩城秀治 (塩野義製薬(株)油日ラボラトリーズ)

〒520-3423 甲賀郡甲賀町大字五反田1405

☎0748-88-3281 FAX 0748-88-6535

図1 回腸の組織検査, A: 粘膜上皮細胞の増殖像 (HE 染色 ×200); B: 粘膜上皮細胞質内の細菌 (Warthin-Starry 銀染色 ×400); C: 粘膜上皮細胞質内の特異蛍光 (間接蛍光抗体法染色 ×400)

表1 豚増殖性腸炎発症豚の回腸乳剤接種試験における糞便性状, PCR 結果および回腸の組織検査

試験	個体 No.	接 種 後 日 数											
		0	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28
I	1	- [-]	h	h [●]	h	d	d	d	d	d	d	d [-] P	
	2	- [-]	d	d [●]	h	h	h	h	h	d	d	d [-] P	
	3	- [-]	-	d [●]	d	d	d	h	d	d	d	d [○] P	
II	1	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [-] P		
	2	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [-] N		
	3	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [-]	-	- [○] N
	4	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [○]	-	- [-] N
	5	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	-	-	- [-] N	-	
	6	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	-	-	- [-]	-	- [-] N
III	1	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	h	h [●] P			
	2	- [-]	-	- [●]	-	-	d	d	d	d	d [●]	-	- [○] P
	3	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [○]	-	- [○] P
	4	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [○]	-	- [○] P
	5	- [-]	-	- [○]	-	-	-	d	h	h [●] P			
	6	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	d	- [○]	-	- [●] N
	7	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	d	-	- [○]	-	- [○] P
	8	- [-]	-	- [○]	-	-	-	-	-	-	- [○]	-	- [○] N
	9	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	-	-	- [-]	d	- [-] N
	10	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	-	-	- [-]	-	- [-] N
	11	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	-	-	- [-]	-	- [-] N
	12	- [-]	-	- [-]	-	-	-	-	-	-	- [-]	-	- [-] N

試験 I: コンベンショナル豚 (約 37 日齢), 発症豚回腸乳剤を経口接種

試験 II: コンベンショナル豚 (約 37 日齢), 試験 I No. 3 回腸乳剤を経口接種, No. 5, 6 は無接種対照

試験 III: SPF 豚 (約 37 日齢) No. 1~4 試験 I と同じ材料, No. 5~8 試験 II と同じ材料を経口接種, No. 9~12 は無接種対照

糞便性状は, h: 出血性下痢, d: 下痢, -: 正常, PCR 結果は [●]: 陽性, [○]: Nested PCR のみ陽性, [-]: 陰性, 回腸組織検査は P: 上皮細胞の増殖性変化, N: 正常で示した.

Extraction Kit^{a)} により抽出を行った. PCR は 1mM MgCl₂, 250μM dNTP, 各プライマー 250pM, 2.5U rTaq DNA ポリメラーゼ^{b)} およびサンプル 5μl の 50μl の反応系で行った. DNA の増幅は 93℃, 55℃ および 72℃ 各 45 秒間の 40 サイクルで行い, プライマーは Jones ら [4] の報告に従い, 5'-TATGGCTGTCAAA-CACTCCG-3' と 5'-TGAAGGTATTGGTATTCTCC-3'

を用い, Nested PCR にはさらに 5'-TACAGGTGA-AGTTATTGGG-3' と 5'-CTTTCTCATGTCCCATAAG-C-3' を用いた. 増幅された DNA は 2% アガーローズゲルで電気泳動後, エチジウムブロマイドで染色し紫外線下にて観察した.

a) MASTech Associates, England. b) 東洋紡績(株), 大阪.

血清中の抗体測定法：Knittelら [6] が報告した蛍光抗体法による血清中の抗体測定キット (Ileitest) を、Dr. McOrist より分与を受け使用した。スライドグラス上に固着させた培養 Li 菌体に、30 倍希釈の検査血清 5 μ l を 4℃、一晚反応させ、洗浄後 FITC ラベル抗豚 IgG 血清 5 μ l を 37℃、30 分反応させ、洗浄、グリセリン封入後、蛍光顕微鏡にて観察した。Li の菌形に特異蛍光が認められた場合、抗体陽性と判定した。

感染試験：試験 I および II では、コンベンショナル豚 (約 30 日齢) を、試験 III では SPF 豚 (LW 種、去勢雄、住友商事より購入、約 30 日齢) を供試した。搬入後、ブタ試験用標準飼料人工乳後期用^{c)} を給餌し、1 週間後に接種を行った。検査材料中 PPE の病変が確認された 1 例の回腸乳剤を豚に接種し、発症豚の回腸を 5 倍乳剤として、試験 I および III の 4 頭 (No. 1～4) に経口接種した。試験 II (No. 1～4) および試験 III (No. 5～8) の各 4 頭は、試験 I の発症豚 No. 3 の回腸乳剤を接種した。接種はカテーテルを用い、胃内に 10ml を注入した。試験 II の 2 頭 (No. 5, 6) および III の 4 頭 (No. 9～12) は無接種対照とした。臨床症状と糞便の状態は毎日観察し、接種前および接種 14 日後から毎週直腸便を採取し、PCR 検査を実施した。体重測定は接種後毎週行い、採血は抗体測定のために試験 I では接種前、接種 14 日および 22 日後、試験 II では接種前、接種 7 日および 14 日後、試験 III では接種 20 および 28 日後の剖検時に行った。異常便は、サルモネラの分離 (セレナイト培地で増菌、DHL 寒天培地で分離培養)、豚赤痢スピロヘータの分離 (スペクチノマイシン加トリプチケースソイ寒天培地で分離培養) および寄生虫卵検査 (浮遊法による顕微鏡観察) を行った。

成 績

PPE の診断を依頼された 20 農場由来 47 例の回腸について組織学的検査を行い、粘膜上皮細胞の増殖性病変が 13 農場 (65.0%) 由来の 22 例 (46.8%) に観察された (図 1)。病変が認められた材料では、Warthin-Starry 銀染色により多数の湾曲した菌体が上皮細胞内に観察され、モノクローナル抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法により特異蛍光が認められた (図 1)。さらに、これらの粘膜あるいは腸内容を用いた PCR により、319bp の DNA 断片が増幅された。

感染実験において、下痢は接種 2 週から 3 週後に、接種豚 15 頭中 8 頭に観察され、そのうち出血性下痢は 5 頭に認められた (表 1)。出血性下痢の期間は、1 日のみの例から 5 日間続いて観察される例があった。試験 II では、接種豚の糞便に異常はまったく認められなかった。

表 2 豚増殖性腸炎発症豚の回腸乳剤接種試験における間接免疫蛍光抗体法による血清中抗体の検出

試験	個体 No.	接 種 後 日 数				
		0	7	14	22	28
I	1	—	・	+	+	・
	2	—	・	+	+	・
	3	—	・	+	+	・
II	1	—	—	+	・	・
	2	—	—	+	・	・
	3	—	—	+	・	・
	4	—	—	+	・	・
	5	—	—	—	・	・
	6	—	—	—	・	・
III	1	・	・	・	+	(20)
	2	・	・	・	・	+
	3	・	・	・	・	+
	4	・	・	・	・	+
	5	・	・	・	+	(20)
	6	・	・	・	・	+
	7	・	・	・	・	+
	8	・	・	・	・	+
	9	・	・	・	・	—
	10	・	・	・	・	—
	11	・	・	・	・	—
	12	・	・	・	・	—

+: 抗体陽性 -: 抗体陰性
(): 検査日齢 ・: 検査せず

なお、非接種豚の糞便異常は、6 頭中 1 頭に 1 日のみ観察された。

出血性下痢が観察された 5 頭の回腸組織すべてに増殖性の変化が認められ、出血性下痢発症時に剖検した 2 頭 (試験 III, No. 1, 5) には、強い組織変化が観察された (表 1)。下痢のみあるいはまったく発症のない接種豚 10 頭では、5 頭に回腸の増殖性病変が観察されたが、残り 5 頭は組織学的にも病変は認められなかった。

直腸便を用いた PCR 検査の結果、接種豚 15 頭中 7 頭が陽性を示し (表 1)、出血性下痢便を検査した 3 回はいずれも陽性であった。また、PCR が 7 日後まで続けて陽性となったのはわずか 1 例であった。

260bp の DNA が増幅される Nested PCR では、PCR 陽性例を含めて接種 14 日後では 15 頭中 14 頭、20 から 22 日後には 10 頭、28 日後には 8 頭中 7 頭が陽性で、PCR より陽性が長く続いた。試験 II では接種豚に臨床症状の異常は観察されなかったが、全例 Nested PCR 陽性を示した。Nested PCR が陰性となる例は、試験 I では 22 日後に、試験 II では 21 日あるいは 28 日後にみられた。なお、接種前および非接種対照豚 6 頭の直腸便は、Nested PCR においても陰性であった。

Li に対する抗体は、試験 I および II では接種 14 日後に、試験 III では接種 20 および 28 日後に陽性を示し、接

c) 日本配合飼料㈱, 神奈川。

種豚全例が陽性となった(表2)。非接種豚6頭は全例陰性であった。

試験豚の体重の推移は、下痢症状を示した接種豚に増体重の低下がみられたが、試験Ⅲにおいて対照群と接種群とに有意な差は認められなかった。また、異常便からサルモネラおよび豚赤痢スピロヘータは分離されず、寄生虫卵も観察されなかった。

考 察

豚回腸の組織学的検査により増殖性変化が13農場由来22例に認められ、増殖した上皮細胞内には湾曲した菌体が多数観察され、免疫蛍光抗体法によりLiの抗原が、またPCRによりLiのDNA断片が検出された。わが国では、回腸の肥厚したPPE様疾病は1979年に報告[7]されているが、病変部から血清学的に、またPCR法によりわが国で初めてLiの感染が確認された。血便、斃死などPPEが疑われた検査材料ではあったが、高い率でLiの感染が認められ、本菌は広く分布していると考えられた。

Li感染による子豚期の下痢は、体重の減少やヒネ豚の原因となり、生産コストへの影響[2]から本症への関心は高い[14]。また、子豚の感染では特徴的な症状がなく、分布調査や予防対策に正確な生前診断法が求められている。

そこで、感染実験によりPCRおよび抗体測定の生前診断法としての評価を行った。発症豚の回腸を接種材料とし試験を行い、接種15頭中8頭の糞便に異常が観察された。サルモネラ、豚赤痢スピロヘータおよび寄生虫の感染は否定され、回腸の組織学的検査により増殖性変化が10頭に観察された。下痢のみあるいはまったく発症のない接種豚の半数に増殖性病変が観察され、感染の確認には病理組織学的検査が必要であった。

糞便のPCRは試験期間を通じて7頭が陽性であり、出血性下痢便を検査した3回はすべて陽性であった。PCR陽性の期間は短く、PCRが陽性となるのに必要な菌量は粘膜剝離を伴う出血便に含まれ、短期間のみ排泄されると考えられた。これまでの報告[15]に比べ今回の成績でのPCR陽性率は低く、また検出期間も短い。これは感染段階およびPCR手法の違いによると考えられた。

Nested PCRはPCRに比べ100倍感度が高く[4]、接種豚全例が陽性を示した。接種14日から28日後に陽性を示す例があり、PCRより長い期間陽性であった。しかし陽性期間と症状の程度とに関連は認められなかつ

た。これらの結果から、出血性下痢からのLi検出にはPCRが、Liの潜在感染や分布の調査にはNested PCRが適していると思われた。

蛍光抗体法による抗体測定では、試験ⅠおよびⅡで接種14日後には全例陽性となった。PCRと比較してLi感染検出感度が高く、これまでの報告[6]と同様の結果であった。出血性下痢あるいは下痢を発症した豚は発症1日ないし2日後にはすでに抗体陽性であり、抗体測定は発症を確認するには不適当な方法であった。抗体持続期間は不明であったが、接種28日後まで抗体が検出され、Nested PCRに比べ感染経歴を長い期間検出可能であり、分布および疫学調査に適した方法であった。検査キットが市販されるようになれば、PPEの実態解明および予防に大いに役立つと思われる。

以上の結果、Li感染による豚増殖性腸炎がわが国で初めて確認され、PCRは出血性下痢の検査に、Nested PCRおよび抗体測定は豚群でのLi潜在感染と浸潤状況の調査に適していると考えられた。

引 用 文 献

- [1] Gebhart CJ, Lin GF, McOrist S, Lawson GHK, Murtaugh MP : J Clin Microbiol, 29, 1011-1015 (1991)
- [2] Holyoake PK, Mullan BP, Cutler RS : Aust Vet J, 73, 89-92 (1996)
- [3] Jones GF, Davies PR, Rose R, Ward GE, Murtaugh MP : Am J Vet Res, 54, 1980-1985 (1993)
- [4] Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin GF, Gebhart CJ : J Clin Microbiol, 31, 2611-2615 (1993)
- [5] Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Rose R, Gebhart CJ : Infect Immun, 61, 5237-5244 (1993)
- [6] Knittel JP, Jordan DM, Schwartz KJ, Janke BH, Roof MB : Am J Vet Res, 59, 722-726 (1998)
- [7] Kubo M, Okuda K, Sugiyama T, Konno S : Natl Inst Anim Health Q, 19, 134-135 (1979)
- [8] Lawson GHK, McOrist S, Mackie RA : J Clin Microbiol, 31, 1136-1142 (1993)
- [9] McOrist S, Boid R, Lawson G H K, McConnell I : Vet Rec, 121, 421-422 (1987)
- [10] McOrist S, Gebhart CJ, Boid R, Barns SM : Int J System Bacteriol, 45, 820-825 (1995)
- [11] McOrist S, Gebhart CJ, Lawson GHK : Vet Microbiol, 41, 205-212 (1994)
- [12] McOrist S, Jasni S, Mackie RA, MacIntyre N, Neef N, Lawson GHK : Infect Immun, 61, 4286-4292 (1993)
- [13] McOrist S, Mackie RA, Neef N, Aitken I, Lawson GHK : Vet Rec, 26, 331-333 (1994)
- [14] 能勢泰宏 : 臨床獣医, 15, 71-77 (1997)
- [15] Smith SH, McOrist S : Res Vet Sci, 62, 6-10 (1997)

Confirmation in Japan of Porcine Proliferative Enteropathy Caused by *Lawsonia intracellularis* and an Examination of Its Antemortem Diagnostic Methods

Kiyohito TAKAHASHI*, Yoshio KISHIMOTO and Shuji IWAKI†

*Aburahi Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., 1405 Oaza-Gotanda, Koka-cho, Koka-gun 520-3423, Japan

SUMMARY

Proliferative epithelial changes in the ileum were observed in 22 pigs (46.8%) from 13 farms (65.0%) in Japan. Indirect immunofluorescence staining with a monoclonal antibody to *Lawsonia intracellularis* (Li) detected fluorescing bacteria on thin sections. PCR recognized Li DNA on the same materials. PCR on feces and immunofluorescence assays of pig serum for antibodies to Li have proved useful in antemortem diagnosis. This study examines the characteristics of these methods used on pigs infected with a suspension of homogenized ileal mucosa from hemorrhagic proliferative lesions. Seven of 15 experimentally infected pigs shed detectable amounts of Li DNA in their feces. Hemorrhagic diarrheal samples were positive for PCR but only for short periods. Nested PCR on feces and immunofluorescence serum assay for Li antibodies were positive in all inoculated pigs. These results indicate that PCR is useful in the detection of Li DNA in hemorrhagic feces and that nested PCR and immunofluorescence assay are useful in examining unapparent infections and in epidemiological studies. — Key words : experimental infection, immunofluorescence assay, *Lawsonia intracellularis*, PCR, porcine proliferative enteropathy.

† Correspondence to : Shuji IWAKI (Aburahi Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.)

1405 Oaza-Gotanda, Koka-cho, Koka-gun 520-3423, Japan

TEL 0748-88-3281 FAX 0748-88-6535

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 56, 73 ~ 77 (2003)

高単位総合ビタミン剤
リケビタン
高単位VA特殊調整 1000万IU 100ml
エクセレントA-1000 液
投与量 : 200cc
総合強壮・強肝内服液
パラゲンロ-ヤル®
投与量 : 〈分娩時〉500cc
高単位ビタミンAD3E内服薬 1ℓ
ビタオイル 第2液
投与量 : 〈分娩時〉200cc
マイシリン製剤20g
乾乳用 ホ-ミング®DC
〈乾乳時〉1 容器全量注入
マイシリン製剤20g
ホ-ミング®MC
〈泌乳時の乳房炎治療〉1 容器全量注入
ジクロキサシリン製剤20g
ホ-ミング®DX
〈泌乳時の乳房炎治療〉1 容器全量注入

理研畜産化学株式会社
本社／東京都杉並区高円寺南2-41-12
工場／埼玉県川口市元郷4-1-8
TEL (0482) 24-8451(代)
FAX (0482) 24-1079