

哺乳豚における C 群ロタウイルスが原因として 疑われた下痢の集団発生

新楽和孝^{1)†} 平野佳世¹⁾ 齋藤俊哉²⁾ 阿部祥次²⁾
半田真明¹⁾ 佐藤満雄²⁾ 長井 誠³⁾

- 1) 栃木県南家畜保健衛生所 (〒 328-0002 栃木市惣社町 1439-20)
2) 栃木県中央家畜保健衛生所 (〒 321-0905 宇都宮市平出工業団地 6-8)
3) 東京農工大学農学部 (〒 183-8509 府中市幸町 3-5-8)

(2016 年 11 月 1 日受付・2017 年 2 月 8 日受理)

要 約

母豚 160 頭を飼養する一貫生産農場において、下痢の集団発生が周期的に認められた。発症豚は 1～3 日齢に限局しており、発生周期は 2～4 週間程度であった。すべての発症豚に対症療法を施したところ、3～5 日で全例が回復し、死亡率の上昇や出荷日齢の遅れは認められなかった。発症豚の剖検では小腸壁の菲薄化、病理組織学的検査では小腸絨毛の萎縮及び粘膜上皮細胞の空胞変性が観察された。また、病原の検索では C 群ロタウイルス (RVC) の特異遺伝子が発症豚のみから検出されたことから、本症例への RVC の関与が示唆された。

——キーワード：下痢症、ロタウイルス、哺乳豚。

-----日獣会誌 70, 308～312 (2017)

ロタウイルスは人と動物の消化器感染症の主要な原因の一つである [1-3]。ロタウイルスは、カプシドを構成する VP6 の抗原性と遺伝学的特徴に基づいて A から H 群の 8 血清群に分類され、近年は、新たな血清群の候補として I 群も報告されている [4-6]。

C 群ロタウイルス (RVC) は 1980 年に豚から初めて検出され [7]、その後の抗体調査により A 群ロタウイルス (RVA) や B 群ロタウイルス (RVB) と同様に日本国内に広く浸淫していることが示されている [4, 8, 9]。一方、哺乳豚の下痢便から検出されるロタウイルスの多くは RVA であり [10]、それ以外の血清群による下痢の発生事例に関する報告は少ない。

われわれは以前、管内の 1 養豚場において、下痢を呈する哺乳豚の糞便から RVC を検出し、その遺伝子のほぼ全長を解析した [11]。本報では、当該事例における下痢の発生状況や病性鑑定の概要を報告する。

材料及び方法

発生農場の概要：発生農場は母豚 160 頭を飼養する

一貫生産農場である。子豚は 21 日齢で離乳し、28 日齢で離乳舎へ、60 日齢で肥育舎に移動させる。また、分娩舎は棟ごと、離乳舎は部屋ごとのオールインオールアウト方式としている。

発生状況等の詳細な調査：農場での臨床検査や畜主からの聞き取りにより、発生状況、発症豚の臨床症状、経過及び生産成績への影響を調査した。

材料：2015 年 10 月 5 日に下痢を発症した 2～3 日齢の哺乳豚 6 頭 (発症豚) の糞便及び生体 3 頭 (発症豚)、並びに下痢の集団発生が認められた際に臨床的に健康であった同日齢の哺乳豚 3 頭 (非発症豚) の糞便を病性鑑定に供した。

細菌及び寄生虫学的検査：糞便と生体の剖検例から採取した肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳及び小腸内容物を 5% 綿羊血液加寒天培地及び DHL 寒天培地を用い、好気培養 (37℃, 24 時間) した。小腸内容物については、増菌培地としてハーナテトラチオン酸塩培地、選択分離培地として DHL 寒天培地を用いて定法によりサルモネラの検出を試みた。また、糞便については、ろ過浮遊集

† 連絡責任者：新楽和孝 (栃木県南家畜保健衛生所)

〒 328-0002 栃木市惣社町 1439-20

☎ 0282-27-3611 FAX 0282-27-4144

E-mail : niirak01@pref.tochigi.lg.jp

表1 各豚舎及び日齢における下痢の発生状況

豚舎	日齢	下痢の発生状況
分娩舎	0～3日齢	2～4週間おきに集団発生
	4～28日齢	発生なし
離乳舎	29～60日齢	発生なし
肥育舎	61日齢～出荷	発生なし

卵法によりコクシジウムオーシストの有無を確認した。

ウイルス学的検査：糞便と生体の剖検例から採取した腸管組織をPBSで20% (w/v) の懸濁液とし、10,000gで10分間遠心して上清を0.45 μ mのフィルターでろ過した。それらから市販のキット (MagExtractor Viral RNA, 東洋紡株, 大阪) を用いてRNAを抽出し、豚流行性下痢ウイルス (PEDV) 及び伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV) のS蛋白質遺伝子 [12, 13], 豚デルタコロナウイルス (PDCoV) のM及びN蛋白質遺伝子 [14], 並びにRVA, RVB及びRVCのVP7遺伝子 [15-17] を標的とするRT-PCRに供した。なお、RT-PCRは市販のキット (PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2, タカラバイオ株, 滋賀) を用いて実施した。また、発症豚の糞便と腸管組織の懸濁液上清については、同様にろ過したうえでウイルス分離に供した。ウイルス分離にはCPK細胞を用い、37 $^{\circ}$ Cの静置培養で3代継代してCPEの有無を観察した。

病理組織学的検査：生体の剖検例から採取した肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳、胃及び腸管等を常法に従い20%中性緩衝ホルマリン液で固定後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施し、腸管については同日齢の正常標本と比較した。また、抗PEDV及びTGEV血清 (国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門, 茨城), 市販の免疫組織化学的染色用キット (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) 及びシンプルステイン AEC 溶液, 株ニチレイバイオサイエンス, 東京) を用い免疫組織化学的染色を実施した。

浸淫状況及び感染源の調査：農場内におけるRVCの浸淫状況や哺乳豚への感染源を把握することを目的に、2015年10～11月の下痢の発生時に、発症中の哺乳豚11頭 (1～3日齢) の下痢便並びに臨床症状が認められなかった離乳舎の豚35頭 (28～60日齢), 肥育舎の豚38頭 (60～150日齢), ストールの妊娠豚18頭及び発症豚に授乳する母豚8頭の糞便を採取し、RVCのVP7遺伝子を標的とするRT-nested PCRを実施した。RT-PCR (1st) は前述の病性鑑定と同様の方法で、2nd PCRは濱野ら (胃腸炎ウイルスの研究 (平成15年度), 岡山県環境保健センター年報, 28, 79-92 (2004)) が設定したプライマーPCRVP7NS (5'-TCTTTTAAATGGTTT



図1 腹腔
小腸壁が軽度で菲薄化している (矢頭)。

GTAC-3'), PCRVP7NA (5'-GGATATATGGCCCGATGTCT-3'), と市販のキット (REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl₂, Sigma Aldrich, U.S.A.) を用いて実施した。

成 績

発生状況等の詳細な調査：2015年10月4日、分娩舎において哺乳豚1腹5頭が下痢を呈した。翌日には同豚舎で新たに哺乳豚6腹約60頭が下痢を呈し、それらの一部は嘔吐も呈していた。便の性状は一樣に黄色水様性であり、発症日齢が2または3日齢であった点と母豚に異常な症状がまったく認められなかった点はすべての発生に共通していた。発症豚の母豚の産歴や発症豚房の位置には明確な偏りは認められなかった。

発症豚の腹腔内に生理食塩水20mlを連日投与したところ、3～5日間で全頭回復した。しかし、それ以降も1～3日齢の哺乳豚に限局して、同様な下痢の集団発生が2～4週間程度の間隔で周期的に認められたため (表1), その都度すべての発症豚に同様の治療を施した。この下痢の集団発生は2016年3月までの約6カ月間にわたって繰り返されたが、その間、死亡率の増加は認められなかった。また、発症豚のなかには離乳時に若干発育が遅れる個体が見受けられたが、離乳後は順調に発育しておおむね本農場の平均的な出荷日齢で出荷された。

剖検所見：生体3頭はいずれも胃に黄色または白色の凝固したミルクが貯留して膨満し、小腸壁が軽度で菲薄化していた (図1)。そのほかには異常な所見は観察されなかった。

細菌及び寄生虫学的検査：すべての糞便、臓器及び小腸内容物から有意な病原細菌は検出されなかった。また、いずれの糞便にもコクシジウムオーシストは認められなかった。

ウイルス学的検査：RT-PCRではPEDV, TGEV,

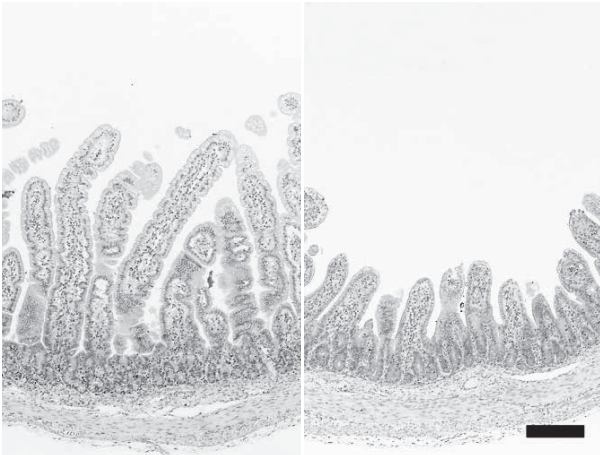


図2 正常標本及び発症豚の空腸
同日齢の正常標本(左)に比べて発症豚(右)は絨毛が中等度に萎縮している(HE染色 Bar=200 μm).

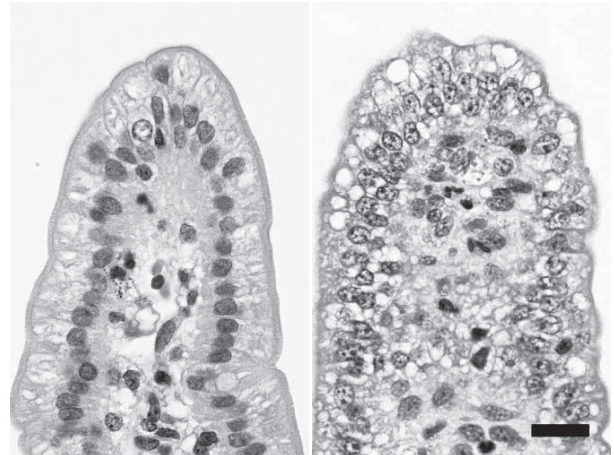


図3 正常標本及び発症豚の空腸
正常標本(左)に比べて発症豚(右)は粘膜上皮細胞に空胞変性が散見される(HE染色 Bar=20 μm).

表2 浸淫状況及び感染源の調査

調査対象豚	RVC*
発症豚(1~3日齢)	11/11
離乳舎の豚(28~60日齢)	6/35
肥育舎の豚(60~150日齢)	9/38
ストールの妊娠豚	0/16
発症豚に授乳する母豚	0/8

*陽性頭数/検査頭数

PDCoV, RVA及びRVBは発症豚, 非発症豚ともすべて陰性であった。一方, RVCは発症豚6頭すべての糞便及び生体3頭のうち1頭の腸管組織が陽性で, 非発症豚はすべて陰性であった。ウイルス分離では, 3代継代後もCPEは観察されなかった。

病理組織学的検査: 生体の剖検例3頭のいずれにも空腸から回腸の絨毛における軽度~中等度の萎縮と粘膜上皮細胞の空胞変性が認められた(図2, 3)。PEDV及びTGEVに対する免疫組織化学的染色では, いずれの抗原も検出されなかった。

浸淫状況及び感染源の調査: 発症中の哺乳豚11頭はすべて陽性, 離乳舎の豚35頭のうち6頭(17.1%), 肥育舎の豚38頭のうち9頭(23.7%)が陽性, ストールの妊娠豚16頭及び発症豚に授乳する母豚8頭はすべて陰性であった(表2)。

考 察

病性鑑定において, 病理組織学的検査により発症豚に小腸絨毛の萎縮と粘膜上皮細胞の空胞変性といったウイルス性腸炎を疑う所見が観察された。また, 病原の検索ではRVCの特異遺伝子のみが発症豚6頭すべての糞便及び生体3頭のうち1頭の腸管組織から検出された。一

方, 下痢の集団発生時に採取した非発症豚の糞便からはRVCは検出されなかった。以上のことから, 本農場における下痢の集団発生へのRVCの関与が示唆された。

RVCによる下痢の発生に関する海外の報告には, 8~9週齢の肥育豚の発症例もみられるが[18], 好発日齢は哺乳豚や離乳豚であると考えられる[7, 19-21]。特に, Morinら[21]はRVCによる下痢の発生状況を詳細に報告しており, 生後24~48時間で水様性の下痢を発症して数日で回復したことや, 6カ月間にわたり周期的な集団発生が認められたことを報告しており, 本農場における下痢の発生状況と類似している。一方, RVCによる死亡率については, 5~10%や20~25%であったとする報告がある[19, 21]。また, ノトパイオート豚を用いた感染実験においては, 生後72時間までにRVCに暴露された10頭のうち9頭が死亡したと報告されている[22]。しかし, 本農場では下痢による死亡率の増加は認められず, 加えて発症豚の出荷日齢の遅れもほとんどみられなかった。その理由として, 本農場ではすべての発症豚の腹腔内に生理食塩水を投与したことにより下痢に伴う重篤な脱水が避けられたため, 既報との死亡率の差が生じたと考えられた。

浸淫状況及び感染源の調査において, 離乳舎及び肥育舎の下痢を呈していない豚からRVCの特異遺伝子が検出されたことから, RVCは農場内に広く浸淫していたと考えられた。一方, 哺乳豚からはRVCの特異遺伝子が検出されたものの, 母豚から遺伝子は検出されず, 本調査では感染源としての母豚の役割について言及することはできなかった。しかし, 分娩前後の母豚の糞便からロタウイルスが検出された報告があることから[23], 母子感染の有無を明らかにするためにはさらに詳細な調査が必要である。

豚に下痢を引き起こす原因は多様であり、それによる経済被害を最小限に抑えるには迅速な鑑別診断とその結果に応じた適切な対応が望まれる。本事例から、RVCによる下痢の発生時においては、対症療法による脱水予防は生産性の維持に有効であると考えられた。その一方で、度重なる下痢の集団発生に際して実施された治療は、労力や費用の増加につながる。RVCに対する有効な対応策を示すために、より詳細かつ広範囲な調査を実施してRVCの感染源を明らかにする必要がある。

引用文献

- [1] Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI : Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children, *Emerg Infect Dis*, 9, 565-572 (2003)
- [2] Matson DO, Estes MK : Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital, *J Infect Dis*, 162, 598-604 (1990)
- [3] Woode GN, Bridger JC, Jones JM, Flewett TH, Davies HA, Davis HA, White GB : Morphological and antigenic relationships between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice, and foals, *Infect Immun*, 14, 804-810 (1976)
- [4] 恒光 裕 : 豚ロタウイルス病, 豚病学, 柏崎 守, 久保正法, 小久江栄一, 清水実嗣, 出口栄三郎, 古谷 修, 山本孝史編, 第4版, 271-277, 近代出版, 東京 (1999)
- [5] Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T, Taniguchi K : Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses, *Emerg Infect Dis*, 17, 1491-1493 (2011)
- [6] Mihalov-Kovács E, Gellért Á, Marton S, Farkas SL, Fehér E, Oldal M, Jakab F, Martella V, Bányai K : Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary, *Emerg Infect Dis*, 21, 660-663 (2015)
- [7] Saif LJ, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA : Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs, *J Clin Microbiol*, 12, 105-111 (1980)
- [8] Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ : Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays, *J Clin Microbiol*, 30, 2129-2134 (1992)
- [9] Tsunemitsu H, Kamiyama M, Kawashima K, Katsuda K, Kohmoto M, Saif LJ, Shouji T, Onodera T : Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology, *J Gen Virol*, 86, 2569-2575 (2005)
- [10] Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu Y : Enteropathogens in suckling and weaned piglets with multi-etiological diarrhea in Japan, *Proceedings of Japan Pig Veterinary Society*, 48, 1-6 (2006)
- [11] Niira K, Ito M, Masuda T, Saitou T, Abe T, Komoto S, Sato M, Yamasato H, Kishimoto M, Naoi Y, Sano K, Tuchiaka S, Okada T, Omatsu T, Furuya T, Aoki H, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Taniguchi K, Mizutani T, Nagai M : Whole genome sequences of Japanese porcine species C rotaviruses reveal a high diversity of genotypes of individual genes and will contribute to a comprehensive, generally accepted classification system, *Infect Genet Evol*, 44, 106-113 (2016)
- [12] Paton D, Iбата G, Sands J, McGoldrick A : Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus, *J Virol Methods*, 66, 303-309 (1997)
- [13] Kim SY, Song DS, Park BK : Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR, *J Vet Diagn Invest*, 13, 516-520 (2001)
- [14] Wang L, Byrum B, Zhang Y : Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, U.S.A., 2014, *Emerg Infect Dis*, 20, 1227-1230 (2014)
- [15] Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens, *J Clin Microbiol*, 28, 276-282 (1990)
- [16] Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Takagi M, Hattori N, Katsuda K, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H : Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses, *Arch Virol*, 154, 1785-1795 (2009)
- [17] Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ : Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch Virol*, 141, 705-713 (1996)
- [18] Kim Y, Chang KO, Straw B, Saif LJ : Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs, *J Clin Microbiol*, 37, 1484-1488 (1999)
- [19] Elis L, Danilo TS, Flávia P, Joice ETC, Alice FA, Amauri AA : Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections, *Pesq Vet Bras*, 34, 391-397 (2014)
- [20] Martella V, Bányai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Camero M, Bozzo G, Moschidou P, Arista S, Pezzotti G, Lavazza A, Buonavoglia C : Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis, *Vet Microbiol*, 123, 26-33 (2007)
- [21] Morin M, Magar R, Robinson Y : Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd, *Can J Vet Res*, 54, 385-389 (1990)
- [22] Bohl EH, Saif LJ, Theil KW, Agnes AG, Cross RF : Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus, and pathogenesis in gnotobiotic pigs, *J Clin Microbiol*, 15, 312-319 (1982)
- [23] Benfield DA, Stotz I, Moore R, McAdaragh JP : Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing, *J Clin Microbiol*, 16, 186-190 (1982)

Outbreaks of Diarrhea Suspected to be Caused by Group C Rotavirus
in Suckling Piglets

Kazutaka NIIRA^{1)†}, Kayo HIRANO¹⁾, Toshiya SAITOU²⁾, Tadatsugu ABE²⁾,
Masaaki HANDA¹⁾, Mitsuo SATO²⁾ and Makoto NAGAI³⁾

- 1) *Tochigi Prefectural Kennan Livestock Hygiene Service Center, 1439-20 Soujya, Tochigi, 328-0002, Japan*
- 2) *Tochigi Prefectural Kenou Livestock Hygiene Service Center, 6-8 Hiraide-kogyodanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan*
- 3) *Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai, Fuchu, 183-8509, Japan*

SUMMARY

A farrow-to-finish operation with 160 sows had periodic outbreaks of diarrhea. During the outbreaks, which recurred every 2 to 4 weeks, only suckling piglets that were 1 to 3 days old developed diarrhea. All the piglets that developed diarrhea were treated symptomatically and recovered in 3 to 5 days. Barely any negative effects on mortality and daily gain were observed on the farm. Necropsies of the piglets revealed thinning of the small intestinal wall. Histopathological examinations revealed atrophy of the intestinal villi and vacuolization of the mucosal epithelial cells of the small intestine. Only the piglets that developed diarrhea were positive for group C rotavirus (RVC) by RT-PCR, which suggests that the outbreaks of diarrhea were associated with RVC infection. — Key words : diarrhea, rotavirus, suckling piglets.

† *Correspondence to : Kazutaka NIIRA (Tochigi Prefectural Kennan Livestock Hygiene Service Center)
1439-20 Soujya, Tochigi, 328-0002, Japan
TEL 0282-27-3611 FAX 0282-27-4144 E-mail : niirak01@pref.tochigi.lg.jp*

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 308 ~ 312 (2017)