

豚のゲタウイルス感染症に関する研究

矢 後 啓 司

1991

# 豚のゲタウイルス感染症に関する研究

矢 後 啓 司

1991



# 目 次

I. 緒 言	1
II. 材料と方法	3
1、臨床病理学的検査の方法	3
2、細菌学的検査の方法	3
3、ウイルス学的検査の方法	4
1) 細胞培養法	4
2) ウイルスの培養法	5
(1) ウイルス分離法	5
(2) ウイルス増殖試験法	7
3) 感染価の測定法	7
4) 供試ウイルス株	7
5) 分離ウイルスの物理化学的試験法	8
(1) 熱に対する安定性試験	8
(2) 滷過試験	8
(3) エーテルおよびクロロホルムに対する感受性	9
(4) 水素イオン濃度(pH 3.0)の影響試験	9
(5) 5-iodo-2deoxyuridine(IUDR)の影響試験	9
6) 血清学的性状試験法	10
(1) 野外血清	10
(2) 免疫血清	10

(3) 赤血球凝集抑制(HI)試験	10
(4) 中和試験	14
(5) 蛍光抗体法	15
(6) ウイルス粒子の電子顕微鏡観察	16
7) 分離ウイルスの赤血球凝集試験法	16
8) 分離ウイルスのマウス接種試験法	17
(1) 供試ウイルス	18
(2) 供試マウス	18
(3) 接種方法	18
(4) ウイルスの回収	18
9) 分離ウイルスの子豚接種試験法	19
(1) 供試子豚	19
(2) 接種方法	19
(3) ウイルスの回収	19
Ⅲ. 成績	21
1、病性鑑定成績よりみた神奈川県下の豚疾病発生動向	
(1983-1987)	21
1) 豚飼養状況	21
2) 病性鑑定成績(とくに異常産関連を中心として)	22
2、豚のゲタウイルス(GTV)感染症の発生の確認	23
1) 発生状況	24
2) 臨床病理学的検査成績	24

(1) 血液学的検査	24
(2) 解剖学的検査	25
(3) 組織学的検査	28
3) 細菌学的検査成績	30
(1) 細菌分離	30
(2) エンテロトキシンの検出	31
4) ウイルス学的検査成績	31
(1) ウイルス分離	32
3、分離ウイルスの性状	32
1) 分離ウイルスの物理化学的性状	32
(1) 熱に対する安定性	33
(2) 滷過試験	33
(3) エーテル、クロロホルムにたいする感受性	33
(4) pH 3.0の影響試験	34
(5) 5-iodo-2deoxyuridine(IUDR)の ウイルス増殖に及ぼす影響	34
2) 分離ウイルスの血清及び生物学的性状	34
(1) 交差中和試験	34
(2) 分離ウイルスの血球凝集性(HA)	34
(3) 分離ウイルスに対する各種培養細胞の感受性	35
(4) HmLu-1細胞における分離ウイルスの増殖態度	35
(5) 分離ウイルス株と GTVハルナ株とのHI抗体価 における相関	36

(6) 分離ウイルスの乳のみマウス及び親マウスに 与える影響 . . . . .	36
(7) 子豚への接種試験 . . . . .	40
4、GTV 感染の血清疫学 . . . . .	40
1) 発症豚群の抗体調査 . . . . .	40
2) 神奈川県下での抗体調査 . . . . .	41
IV. 考 察 . . . . .	43
V. 総括および結論 . . . . .	51
VI. 謝 辞 . . . . .	54
VII. 参 考 . . . . .	55

ゲタウイルス (GTV)は Togaviridae の Alphavirusに分類される一本鎖のR-NAを有するウイルスであり〔 5, 31, 52〕、これらのウイルスには、Eastern equine encephalomyelitisウイルス、Mayaroウイルス、Middleburgウイルス、Mucambo ウイルス、Ndumu ウイルス、O'Nyong nyong ウイルス、Pixunaウイルス、Ross riverウイルス、Venezuelan equine encephalomyelitis ウイルス、Western equine encephalomyelitisウイルス、Semliki forestウイルス、Una ウイルス、Wataroa ウイルス等がある〔 5, 31, 52〕。Alphavirusの感染は蚊によって媒介されると言われ〔 8, 10, 31, 32, 40, 52, 54, 58〕、この中の一部のウイルスはヒトの脳炎、関節炎、出血熱、発疹性熱性疾患などを起すことが知られている〔53〕。Eastern equine encephalomyelitisウイルス、Venezuelan equine encephalomyelitisウイルスおよびWestern equine encephalomyelitisウイルスは、いずれも人畜共通の病原ウイルスとして重要である。

我が国における GTVの研究は1955年頃から、ヒトの日本脳炎の生態学的研究にもとづいて始まり、蚊からのウイルス分離が盛んに行われ、埼玉県下でサギヤマウイルスがキンイロヤブカ (Aedes vexans) およびコガタアカイエカ (Culex tritaeniorhynchus) から分離された〔55〕。続いて、1959年に群馬県下でイタクラウイルスが分離された〔40〕。

家畜由来の GTVは、1965年に群馬県下で生産されて、食肉処理場へ出荷された健康豚の血液からハルナウイルス〔38〕が分離された。さらに、1978年には茨城県下で馬に流行する感染症が発生して、罹患馬からサカイウイルスが分離された〔57〕。

その他の動物では血清の疫学的抗体調査によると、ヒト〔11, 43〕、ウシ〔11, 39, 43, 60〕、ニワトリ〔43〕、家兎〔11, 43〕、ヤギ〔43〕、イヌ〔43〕、一部の野鳥〔11〕、カンガルー〔 8〕などにHI抗体または中和抗体を保有しているものが、ソ連〔 8〕、日本〔19, 43, 〕、マレーシア、オーストラリア〔 9〕などで検出されている。

家畜に対する GTVの病原性は、ウマの GTV感染症の発生によって初めて実証された〔57, 62〕。豚については健康豚から GTVが分離されたり〔38〕、全国各地で行われた抗体調査で GTV陰性豚が夏を越すと、抗体の陽転が認められてきたが〔19, 43〕、野外における発病は全く知られていなかった。

著者らは、育成豚の損耗の一つとして問題となっている流産、早産、死産、虚弱および哺乳中の子豚の死亡について、病因検索を継続して実施した結果、同腹の初生豚に、顔面の腫脹と神経症状を主とした疾病が集中的に発生し、死亡する症例に遭遇して、その原因が GTV感染によることを初めて明らかにした。

本論文は1983年から1987年までの 5年間に、神奈川県下で発生した豚の異常産と哺乳育成中に死亡した子豚の病性鑑定を通して、野外で確認された子豚の GTV感染症について臨床病理組織学、細菌学、ウイルス学的検査および疫学的調査を行って、本症の実態を明らかにするとともに、その発生要因につきも考察したものである。



## Ⅱ．材料と方法

### 1、臨床病理学的検査の方法

豚群85-109の新生子豚 5頭および豚群87-96 の哺乳中の子豚 2頭について病理解剖を行い、大脳、間脳、小脳、延髄、脊髄、扁桃、心臓、肺、肝臓、脾、腎臓、腸管およびリンパ節などの主要臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定してからパラフィン包埋を行い、ミクロトームで薄切してからヘマトキシリン・エオジン二重染色および PAS染色を行った。また、中枢神経系組織にはルクソール・ファースト・ブルー (LFB)染色〔23〕を行い、鏡検した。豚群87-96 については、病性鑑定材料として搬入された 2頭の哺乳中の子豚のうち 1頭がひん死の状態であったため、血液を採取した。また、顎下部の腫脹を伴い哺乳意欲を欠くなどの臨床症状を呈したが、症状の軽い子豚 4頭についても採血して、白血球数、赤血球数および白血球像について比較検討した〔37, 48, 49; 50〕。

### 2、細菌学的検査の方法

豚群85-109および87-96 とも脳（大脳、間脳、小脳、延髄）、脊髄、肺、肝臓、脾臓、腎臓および腸管の主要臓器を採材して DHL寒天培地、5% CW寒天培地および血液寒天培地に材料を接種して、好気、微好気（ローソク培養）および嫌気（ガスパック：BBL）状況下で、37℃、24～48時間培養を実施した。分離菌はグラム染色を施し、菌形等を確認してから生化学的性状試験を行って同定した〔1, 6, 36, 42, 51〕。また、分離された大腸菌については耐熱性および易熱性のエンテロトキシンおよびベロトキシンの検出を常法に従

って実施した〔27, 36〕。即ち、耐熱性エンテロトキシン(ST)の検出については Dean, A. g〔2〕らの方法により、培養上清を乳のみマウスに経口投与して検査した。易熱性のエンテロトキシン(LT)の検出については、供試菌をリンコマイシン(100 $\mu$ g/ml) 加ブレイン・ハートインフュージョン斜面培地に接種してから、37 $^{\circ}$ C、24時間培養した。その後、培養菌をポリミキシンB(10,000 iu/ml) 加生理食塩水1.0 mlに浮遊させ、37 $^{\circ}$ C、30分間振盪した。振盪後 3,000 rpm, 120分間の遠心沈殿を行い、その上清についてコレラ大腸菌エンテロトキシン検出用キット(デンカ生研)を使用して、逆受身ラテックス凝集反応を実施し、24時間後の沈降像により判定した。ベロトキシン(VT)の検出については、Konowalchuk, J.ら〔27〕の方法に従い、250 mlのメスフラスコに 20 mlのトリプトソイ・ブロスを作成してから、分離した大腸菌を接種し、37 $^{\circ}$ C、24時間培養後、10,000 rpm、30分間遠心した。続いて、遠心上清を0.45 $\mu$ m のメンブラン・フィルターで濾過して、濾液を 4 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫に保存した。Vero細胞の培養には直径16 mm で24穴のプラスチック・トレイを用いて1.0 ml中の細胞数を25万個に調整し、イーグル増殖用および維持用培養液で培養した。培養 2日後の単層の培養細胞にPBS(phosphate buffered saline)で濾液を 2倍段階希釈して、培養液 0.5 ml に対して50 $\mu$ l を接種し、37 $^{\circ}$ Cで 7日間培養して細胞の状態を観察した。

### 3、ウイルス学的検査の方法

#### 1) 細胞培養法

ESK 細胞および HmLu-1 細胞等、継代細胞の増殖にはイーグル MEM(Eagle

minimum essential medium) にTPB(tryptose phosphate broth)0.3%,子牛血清 5.0 %, 抗生物質 (ペニシリン100 u/ml, カナマイシン100  $\mu$ g/ml, フェンギゾン2  $\mu$ g/ml) を加え、7.0 % の重炭酸ナトリウムで pH 7.0 に調整したものをを用いた。培養細胞は0.1 % のトリプシン液へ 0.001 %の割合にED-TA(etylen diamine tetraacetic acid) を加えた消化液により、200 mlの培養角瓶に対して1.0 mlを加えて、37°Cのふ卵器で10~15分間作用させた。消化処理の済んだ細胞は、25万個/ml になるように培養液へ浮遊させた。続いて、この細胞浮遊液1.0 mlを直径16 mm で24穴のプラスチック・トレイへ分注して、37°Cの5.0 % 炭酸ガスふ卵器で静置培養を行った。単層の培養細胞が形成された培養 2日後に増殖用培養液を除き、血清を含まないアール〔29〕の塩類溶液で 2回洗浄した後、ウイルス分離材料またはウイルス液を接種した。細胞の維持培養液にはイーグル MEMに TPB 0.3 %、ウシの胎子血清1.0 %, 抗生物質 (ペニシリン100 u/ml, カナマイシン100  $\mu$ g/ml, フェンギゾン 2  $\mu$ g/ml) を加え、7.0 % の重炭酸ナトリウムで pH 7.2 に調整したものをを用いた。

## 2) ウイルスの培養法

### (1) ウイルス分離法

豚群85-109では神経症状を示して死亡した新生豚 5頭のうち、死亡後の経過時間が比較的短く、また、肉眼的にも変質の少ないと思われる 4頭を選んで、検査材料とした。豚群87-96 ではひん死期の子豚 1頭および輸送中に死亡した子豚 1頭についてウイルス分離を実施した。

ウイルス分離材料としては、脳、扁桃、肺、肝臓、脾臓、腎臓および腸管の各臓器を約 1グラム採材して $-80^{\circ}\text{C}$ の超低温槽に保存した。ウイルス分離時には保存していた材料を流水中で速やかに溶解してから、ウシ血清を除いたイーグルの細胞維持液 (TPB, 0.3 %, ペニシリン 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , カナマイシン 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , フェンギゾン 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 7.0 % 重炭酸ナトリウム 1.0 % 添加) を 4 ml 加えてから、ガラスホモジナイザーで乳剤を作成した。続いて、この乳剤を  $4^{\circ}\text{C}$  に調節した遠心機で 3,000 rpm、20 分間、遠心沈殿してから上清を 1.0 ml 採取し、これを 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター (東洋濾紙) で濾過した。この濾液をウイルスの分離材料とした。

ウイルス分離に用いた培養細胞は HmLu-1、ESK および CPK 培養細胞の 3 種類とした。単層の細胞層が形成されてから、アール液に 7.0 % 重炭酸ナトリウムを 0.5 % 加えた細胞洗浄液で 3 回洗浄した後、ウイルス分離材料を直径 16 mm、24 穴のプラスチック・トレイに培養された各々の細胞へ 0.1 ml ずつ 2 穴に接種した。このうち、肝臓および腸管の乳剤については、濾液を終末 100 倍に希釈したものを同様に接種した。接種後  $37^{\circ}\text{C}$ 、1 時間、ウイルスの吸着処理を行ってから、接種材料をアスピレーターで吸引除去した。続いて、アールの塩類溶液を各穴へ 1.0 ml を加えてからトレイを静かに振って、細胞表面を 2 回洗浄した。

細胞の維持にはイーグルの維持液を用い、各穴に 1.0 ml を加えてから  $37^{\circ}\text{C}$  の 5 % 炭酸ガスふ卵器で静置培養した。以後、細胞変性効果 (CPE) を指標に 10 日間観察した。CPE の出現を見なかった接種穴および対照穴細胞については 5 日目に培養液の交換を行い、さらに 5 日間の観察を継続した。また、接種後 10 日目までにウイルスの増殖所見のない場合には、この培養液を新しい Hm-

Lu-1、ESK およびCPK 培養細胞へ接種して継代した。継代培養は 2代まで実施し、この時点でウイルスの増殖所見が観察されない時は、ウイルス分離陰性とした。

## (2) ウイルス増殖試験法

50 ml の培養角瓶にHmLu-1細胞の単層が形成された後、アールの塩類溶液で2回洗浄し、ウイルス接種量を  $Moi=1$  で接種した。続いて、37°C、1時間ウイルスの吸着を行ってから、再び細胞を洗浄液で2回洗浄し、5.0mlの細胞維持液を加えた。細胞培養液の採取は接種直後と1, 3, 5, 7, 9, 12日目にそれぞれ0.5 mlを採り、0.5 mlの細胞維持液を補充する方法により採取して-80°Cの超低温槽に保存した。培養液の採取が完了してから、各々の培養液の感染価をHmLu-1細胞を使用して測定した。

## 3) 感染価の測定方法

感染価の測定にはHmLu-1細胞を用いて、96穴のマイクロトレイで実施した。ウイルス材料をHmLu-1細胞の細胞維持液で10倍階段希釈後、各希釈あたり4穴のHmLu-1培養細胞に接種し、37°C、1時間のウイルスの吸着を行ってから細胞維持液を加えて、37°Cの5%炭酸ガスふ卵器で7日間静置培養した。判定はCPEの出現状況を倒立顕微鏡下で観察してkärber〔29〕の方法により $TCID_{50}$ を算出した。

## 4) 供試ウイルス株

豚群85-109より分離した85-109-1株は発症して死亡した新生子豚の脳より分離されたウイルスで、このウイルスをESK細胞で2代継代してからSK-L細

胞へ接種し、ブラック法によるクローニングを行って得た。このクローン株を再度SK-L細胞へ接種して増殖したウイルス液を試験に用いた。

豚群87-96 より分離した87-96-1 株はひん死子豚の腎臓由来のウイルスをHmLu-1細胞へ接種して、ブラック法によるクローニングを 2回行った。得られたウイルスはさらにHmLu-1細胞に接種し、 5日目の培養上清をウイルス液とした。

GIV、ハルナ株、Aujeszky's disease virus(ADV)、YS-81 株およびアカバネ病ウイルス、JaG-39 株は各試験の対照ウイルスとして用いた。

## 5) 分離ウイルスの物理化学的性状試験法

### (1) 熱に対する安定性試験

感染培養液をイーグルの維持液および精製水で10倍になるように希釈し、また、感染培養液をイーグルの維持液で 5倍にしてから、2MのMgCl<sub>2</sub> 液を等量加えてゴム栓をし、良く混合した溶液を作った。このウイルス混合液を50℃に調整された恒温槽および-20℃のディープフリーザーに60分間放置してから、ウイルスの感染価を測定した〔29〕。

### (2) 濾過試験

感染培養液をイーグルの維持液で10倍になるよう希釈し、このウイルス混合液を孔径 200, 100, 50 および 25 nmのメンブランフィルターで濾過してから、ウイルス液の感染価を測定した。



### (3) エーテルおよびクロロホルムに対する感受性

感染培養液1.6 mlにエチルエーテル0.4 mlを加えて、エチルエーテルの20%液を作り、ゴム栓をしてから良く振盪した後、室温に1時間放置して、エチルエーテルにウイルスを感作させた。感作が終了すると、混合液を3,000 rpm, 10分間の遠心沈殿を行った。上層のエチルエーテルを減圧によって取除き、残ったウイルス液について感染価を測定した。また、クロロホルムに対する感受性については感染培養液1.6 mlにクロロホルム0.4 mlを加えてからゴム栓をし、良く振盪した後、37°Cのふ卵器で1時間放置してクロロホルムにウイルスを感作させた。感作後の処理はエチルエーテルに準じて行い、残ったウイルス液について感染価を測定した。

### (4) 水素イオン濃度 (pH 3.0) の影響試験

重炭酸ナトリウムを含まないイーグルMEMに0.1 Mのトリス塩酸緩衝液を加え、pH 3.0に調整した。この液を1.8 mlずつ小試験管9本へ移し、ウイルス液0.2 mlを加えて10倍階段希釈した。続いて、試験管にゴム栓をし、室温に3時間放置してpH 3.0にウイルスを感作させた。感作が終了したら各試験管へ0.01 Mのトリス塩酸緩衝液を加えて、再びpH 7.2に戻してから感染価を測定した。

### (5) 5-iodo-2-deoxyuridine (IUDR) の影響試験

イーグルの維持培養液にIUDRを50  $\mu$ g/mlの割合に加えた培養液と加えない培養液を用いて、HmLu-1細胞における分離ウイルスの増殖能を検討した。

## 6) 血清学的性状試験法

### (1) 野外血清

1985年に発生を認めた豚群85-109については、発生前の1頭の母豚血清および発症中の子豚1頭を前血清とし、発生後52日間経過して回復生存した子豚4頭と母豚の血清を後血清として採取した。

1987年に発生を認めた豚群87-96については、発生時に1頭の母豚血清および2頭の哺乳中の子豚血清を前血清とし、発生後42日間経過して得た母豚血清および4頭の子豚血清を後血清として採取した。

神奈川県下で飼育されている肉豚および繁殖豚の抗体調査用血清は、GTV感染症の発生があった地域を含む3市を対象に、未経産豚および初産から8産以上までの経産豚について1986年と1987年の2カ年調査した。

肉豚については3市1町から食肉処理場へ出荷された生後約6カ月齢の豚を無作為に抽出して採血し、1986年に400頭を調査した。

### (2) 免疫血清

ADV(YS-81株)の免疫血清は農林水産省家畜衛生試験場から分与されたものを使用した。GTV(ハルナ株)の免疫血清は農林水産省家畜衛生試験場および微生物化学研究所(京都)より分与を受けた。85-109-1株と87-96-1株の分離株についてはモルモット免疫血清を作成して使用した。

### (3) 赤血球凝集抑制(HI)試験

HI試験の術式は日本脳炎HI検査法〔30〕に準じて行ったが、次のとおり

とした。

## 1 抗原

豚ゲタウイルス分離株（85-109-1株および 87-96-1株）を HmLu-1 細胞へ  $100 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$  接種し、 $37^\circ\text{C}$ で 4日間培養してから培養液を回収した。培養液は 2回凍結融解を行ってから、 $2,500 \text{ rpm}$ , 10分間の遠心沈殿を実施して、その上清を凝集（HA）抗原として用いた。

## 2 試薬液類

### 1) pH 9.0 BBS(borate buffered saline)

#### (1) 1.5 M NaCl(stock solution)

NaCl(特級)	87.67 g
精製水にて全量	1,000 ml

#### (2) 0.5M $\text{H}_3\text{Bo}_3$ (stock solution)

$\text{H}_3\text{Bo}_3$ (特級)	30.92 g
精製水にて全量	1,000 ml

$\text{H}_3\text{Bo}_3$  は常温では溶解しにくいので、まず、暖めた精製水700-800 ml で溶かし、一度、常温にもどしてから精製水を加えて1,000 mlとした。

#### (3) NaOH(stock solution)

NaOH 32.0 ml

炭酸ガスを除去した精製水で全量500 mlとする。

pH 9.0 BBS(working solution)

1.5 M	NaCl	80.0 ml
0.5 "	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100.0 "
1.0 "	NaOH	24.0 "

精製水で全量 1,000 ml にし、ウシ血清アルブミン 0.2% およびゲラチン 0.001 %を加える。pHメーターで pH 9.0 を確める。

2) VAD 6.0(virus adjusting diluent)

1.5 M	NaCl(又は, 0.35 M)	100 ml
0.5 "	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32 "
1.0 "	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	184 "

精製水を加えて総量 1,000 ml とする。

作成後、その一部をとり、等量のpH 9.0 BBSと混合した後 pH メーターで pH を確める。

(1) 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (stock solution)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (特級)	70.99 g
(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	(88.99 g)
精製水で全量	1,000 ml

15℃以下になると結晶が析出することがあるが、このようなときには

温湯中で静かに振って溶かし、室温にもどしてから使用する。

(2) 1.0 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (stock solution)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (特級)	156.03 g
精製水で全量	1,000 ml

3 被検血清の処理

- 1) 各血清の原液 0.2 ml にアセトン4.0 mlを加え、ゴム栓をして約 5分間振盪する。
- 2) 1,500 rpm, 5 分間遠心し、上清を捨てる。
- 3) 沈渣に 4.0 ml の冷アセトンを加え、ゴム栓をして均一になるまで振盪する。
- 4) 1,500 rpm, 5分間遠心し、上清をすてる。
- 5) 沈渣を試験管内に広げ、デシケーターに入れ、約 1時間 30 分間減圧乾燥する。
- 6) 1.0 mlのpH 9.0 BBSを加え、ゴム栓をして良く振盪後 4°Cに一夜放置する。
- 7) 翌朝、2,500 rpm, 10分間遠心し、上清を採取する。
- 8) この上清にガチョウ血球(packed cell) 25 $\mu$ l を加え、1 時間振盪後、2,500 rpm, 10分間遠心し、上清を採取する。この上清を HI 試験に用いる。

4 処理血清のHI試験

抗原の凝集価(HA)測定結果から、抗原が 8単位になるようにBBS 9.0で稀釈する。

## 2) HI試験

Well No	1	2	3	4	~ 8
血清稀釈倍数	1:5	1:10	1:20	1:40	血清対照
処理血清(ml)	0.025	0.025	→0.025	→0.025	0.025
稀釈液 (ml)		0.025	0.025	0.025	0.025
抗原 (ml)	0.025	0.025	0.025	0.025	

良く振盪して室温 1時間静置

血 球 (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
----------	------	------	------	------	------

良く振盪して室温 1時間静置後判定

## 3) 判 定

判定は血球の凝集を完全に抑制した血清の最高稀釈倍数をその血清のHI価とし、10倍以上を抗体陽性とする。

使用抗原の二次検定を実施し、使用した抗原が 8単位であることを再確認する。

## (4) 中和試験

中和試験はブラックによる血清稀釈法とウイルス稀釈法〔12, 22〕により



実施した。血清稀釈法は56℃、30分間加熱非働化した血清を10倍にしてから4倍階段稀釈を行い、この稀釈血清にウイルス液(50 PFU/0.1ml)を等量加えた。このウイルス血清混合液を37℃のふ卵器で1時間放置、感作してから直径5.0 cm Cell-Wellにあらかじめ用意してあったHmLu-1細胞培養へ各稀釈とも0.4 mlずつ2枚接種した。続いて、37℃の5%炭酸ガスふ卵器に1時間放置してウイルスの細胞への吸着を行った。吸着終了後は接種ウイルス血清混合液をアスピレーターで除去し、直ちに0.8%の寒天を含むイーグル MEM細胞維持液(一次寒天)をCell-Wellあたり5.0 ml分注してから室温に30分間放置した。寒天が固まってからは炭酸ガスふ卵器へ再び戻した。続いて、4日後1,000倍のニウトラルレッドを5%含む二次寒天を重層して翌日判定した。

ウイルス稀釈による中和試験は既知ゲタウイルスとの交差試験について実施した。即ち、免疫血清を10倍に稀釈し、56℃、30分間非働化してから、10倍階段稀釈したウイルス液に非働化の済んだ免疫血清を等量ずつ加え、このウイルス血清混合液を5%炭酸ガスふ卵器で37℃、1時間放置して感作した。続いて、各稀釈あたりHmLu-1細胞培養のCell-well(96穴用)4穴に0.1 mlずつ接種した。細胞への吸着を1時間行ってからウイルス血清混合液を除き、細胞維持液0.1 mlを加えて5%炭酸ガスふ卵器で培養した。接種後7日目に供試ウイルスのCPE出現の有無によりTCID<sub>50</sub>を求めたのち供試血清の中和指数を求めた。

#### (5) 蛍光抗体法

無菌豚およびモルモットに GTV分離株を接種して得られた抗血清から蛍光

標識抗体を常法〔29〕により作製し、直接法による抗原検出を行った。即ち、 $12 \times 32$  mmのカバーグラスを入れた直径5.5 cmのペトリー皿にHmLu-1細胞(25万/ml)を培養し、単細胞層の形成された2日後に $10^{4.0}$  PFU/0.1 mlのウイルス液0.1 mlを接種し、ウイルスの細胞への吸着を $37^{\circ}\text{C}$  1時間行ってから、接種ウイルス液の除去に続いてアールの塩類溶液で2回洗浄後、細胞維持液を加え $37^{\circ}\text{C}$ の5%炭酸ガスふ卵器で静置培養した。ウイルスを接種された細胞(カバーグラス)を経時的に取出し、PBSで2回浸漬し、洗浄してから、濾紙で水分を除去し、アセトン固定後、標本は室温に放置してアセトンを蒸散させ、蛍光標識抗体25  $\mu\text{l}$ を乗せて温室に入れ、 $37^{\circ}\text{C}$ 、1時間反応させてから蛍光顕微鏡(EFD 2.日本光学工業)で観察した。

#### (6) ウイルス粒子の電子顕微鏡観察

ペトリー皿に培養されたESK培養細胞に、 $10^{5.1}$  PFU/mlの分離ウイルス株を0.4 ml接種した。続いて、 $37^{\circ}\text{C}$ 、12時間培養後、感染ESK細胞をラバーポリスマンで剥がし、1.0%のグルタルアルデヒドで24時間固定した。固定後pH 7.0のPBSで洗浄し、標本は再び1%酸化オスミウムで1時間固定し、アルコールで脱水してから $60^{\circ}\text{C}$ 、48時間重合させたエポン812で封入した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸の二重染色を行い、JEL-100 CX電子顕微鏡(日本電子)で観察した。

#### 7) 分離ウイルスの赤血球凝集(HA)試験法

分離ウイルスの赤血球凝集素産生能については、ウマ、ウシ、ヒツジ、ガチョウ、ニワトリ(成鶏、初生雛)、モルモットおよびマウスの赤血球を用

いて比較検討した。血液凝固防止剤（ノボヘパリン：ノボインダストリー-A/S）を加えた注射器で採取した血液は、採血量の約 10 倍量の生理食塩水を加え 1,500 rpm, 10分間の遠心沈殿を 2回行い、第 3回目の遠心沈殿を 2,500 rpm, 10 分間実施してから上清を除去した。この沈渣(Packed cell) 1 容量に対して 9容量の DGV液を加え 10 %血球浮遊液を作り、試験に際して 0.5 % VAD 血球浮遊液になるよう調整して使用した。分離ウイルスの HA 抗原に使用する稀釈液には BBS 9.0 [30] を用いた。HA価の測定方法は次のとおりとして実施した。

Well No	1	2	3	4	5	～血球対照
稀釈倍数	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	
稀釈液 (ml)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
HA抗原 (ml)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
稀釈液 (ml)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
血球液 (ml)	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050

良く振盪してから室温に1 時間静置後判定

### 8) 分離ウイルス(85-109-1 株) のマウス接種試験法

### (1) 供試ウイルス

供試分離ウイルスはESK細胞を用いてプラック法によるクローニングで得られたものを2代継代増殖した。感染培養液は接種後4日目に細胞相および液相とも凍結融解を2回実施してから、3,000 rpm, 20分間遠心沈殿し、その上清を供試ウイルス液とした。

### (2) 供試マウス

ICR系の乳のみマウスおよび妊娠マウスを用いた。乳のみマウスの接種試験では各試験ごとに妊娠マウスを用意し、一腹の乳のみマウス数を10~12匹ずつに調整して、接種区に10匹を割当て、残りを無接種対照とした。接種日齢は生後24時間以内を1日齢として設定し、奇数日ごとに15日齢まで、8区分して、接種日齢および接種経路別乳のみマウスへの病原性と乳のみマウス間および母子間の水平感染について検討した。妊娠マウスについては妊娠日齢の異なった19匹の親マウスを用いて、ウイルスの親マウスから胎子への垂直感染について検討した。

### (3) 接種方法

ウイルスの接種方法および接種量は乳のみマウスにおいて脳内、腹腔内、点鼻および点眼接種ともに10  $\mu$ lとし、親マウスに対する皮下接種は100  $\mu$ lとした。

### (4) ウイルスの回収

発症して死亡した乳のみマウスの脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腸管およ

び筋肉（臀部）を採材し、重量を測定した。続いて、イーグルの細胞維持液を10～100 倍の割合に加えてガラスホモジナイザーにより乳剤を作成した。HmLu-1培養細胞への接種には、この乳剤を3,000 rpm, 20分間遠心沈殿し、上清を 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過したものを原液とし、細胞維持液で10倍階段希釈して接種した。ウイルスの細胞への吸着は37°Cの恒温下で1 時間行い、吸着の済んだものはアールの塩類溶液で 2回洗浄後、細胞維持液を加えてから37°Cの 5 %炭酸ガスふ卵器に静置して、CPE の出現を観察した。

## 9) 分離ウイルス（85-109-1株）の子豚接種試験法

### (1) 供試子豚

生後 5日齢の無菌子豚 8頭と18日齢の無菌子豚 1頭を用いた。

### (2) 接種方法

$10^{5.5}$  PFU/ml を含んだウイルス液各1.0 mlを 3頭の子豚へ経口接種および6 頭の子豚へ筋肉内接種した。

### (3) ウイルスの回収

発症して死亡した子豚及びひん死期の子豚の脳、扁桃、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓および小腸を採取し、イーグルMEM で10%乳剤を作成して-70°Cに保存した。ESK 培養細胞への接種時には凍結融解とともに良く振盪してから3,000 rpm, 10分間遠心沈殿した。遠心上清はイーグルMEM で10倍階段希釈し

て、あらかじめ用意してあったペトリ皿の ESK培養細胞に接種した。ウイルスの細胞への吸着は37°Cの 5 %炭酸ガス恒温下で1 時間行い、吸着の済んだものはアールの塩類溶液で 2回洗浄後細胞維持液をくわえて37°Cの炭酸ガスふ卵機に静置して、CPE の出現を 7日間観察した。



### Ⅲ . 成 績

#### 1、病性鑑定成績より見た神奈川県下の豚疾病発生動向

##### 1) 豚飼養状況

1987年 2月現在の豚飼養頭数は 166,255頭であり、飼養戸数は 604戸、1戸あたり平均 275.3頭となっている。豚飼養頭数の推移は1980年の 211,200頭を最高に年々減少傾向にある。農家戸数は1981年から1984年までの間、毎年 10 %前後の減少を示したが、1985年に至ってから5 % とやや緩慢な減少傾向を示してきた。今までは副業的養豚経営者が減少して、專業化が一層すすむ傾向にあったものの、1984年県下に侵入した豚オーエスキー病が養豚経営に大打撃を与え、また、畜産物の輸入自由化への懸念および畜産の環境問題が養豚経営者を圧迫して、1986年から1987年の 2ヶ年とも前年比10 %以上もの戸数減少を認めている。しかしながら、1戸当りの飼養頭数は1987年に至って275.3 頭となり、1970年の約10倍、1980年の約 2倍にまで増加して、養豚経営は依然として多頭化の状況にある。飼養頭数の地域別分布は県下全頭数の33.5 %が県央地区（厚木、綾瀬市、清川村）に集中し、企業養豚の中心地となっている。続いて、横浜地区（横浜、川崎市）18.9 %、中地区（平塚、秦野、伊勢原市）18.1 %、湘南地区（横須賀、藤沢、茅ヶ崎、三浦市）17.3 %、北相地区（相模原市、津久井郡）10.5 %、足柄地区（小田原、南足柄市、中井町）1.7 %の割合となっている。市町村別では横浜市 27,598 頭（16.6 %）、綾瀬市 24,007 頭（14.4 %）、藤沢市 19,772 頭（11.9 %）、清川村 14,418 頭（8.7 %）、平塚市 13,487 頭（8.1 %）、伊勢原市 12,369 頭（7.4 %）、相

模原市 12,229 頭 (7.4 %), 厚木市 10,461 頭 (6.3 %)の順に10,000頭以上が飼われている。このような状況下での経営形態は、一貫経営を主軸にして生産と販売が行われ、その大部分の農場で購入飼料を利用しているが、一部の地域では都市部の特性を活かした残飯や残菜を、上手に併用利用する小規模の養豚農場も散在する。特に、人口密度の高い横浜、川崎地域では、残飯を中心とする養豚経営が今でも盛んに行われており、1985年の調査によると、養豚農場の51.6 %に利用されている。また、この地域での残飯の利用は単に肥育用の代替飼料のみならず、繁殖豚にも給与されている(表-1)。

繁殖豚の品種別飼育状況ではランドレース種、大ヨークシャー種、デュロック種、ハンプシャー種、中ヨークシャー種の順に飼われており、中でもランドレース種が最も多い。従来、神奈川の高座豚として、全国に知られた中ヨークシャー種は今や全県下で 25 頭飼われているに過ぎない。また、少頭数ではあるがバークシャー種、チェスターホワイ特種、サドルバック種および中国原産豚の桃園種も飼われている(表-2)。

## 2) 病性鑑定成績

1983年から1987年までの病性鑑定実施状況では異常産に関連する検査10~32.7 %, 哺乳中の子豚に関連する検査17.3~38.3 %となっている。

異常産胎子および哺乳中の子豚の病性鑑定内容を見ると、豚オーエスキー病、肺炎、大腸菌症および髄膜脳炎が多く鑑定され、日本脳炎、豚パルボウイルス感染症およびトキソプラズマ病等の疾病も確認している。このうち、1983年に発生の見られたトキソプラズマ病による流産は養豚経営に大打撃を与えた。また、1984年には、豚パルボウイルスと日本脳炎ウイルス混合感染症が

予防注射未実施の農場で発生して、長期に渡る流産および不受胎から経営不振を招き、やむなく廃業に至る事例でもあった。(表-3,4,5)

異常産胎子および哺乳中の子豚からのウイルス分離状況は1983年生後間もない哺乳中の子豚に水様性の下痢が次々と発生し、死亡子豚の腸管材料から Transmissible gastroenteritis virus(TGEV) が分離された。1984年には妊娠豚の異常産と哺乳中の子豚の死亡が継続発生し、病性鑑定として搬入された発症子豚 4頭の脳、扁桃、肺の検査材料から ADVが分離された。また、この年の 9月下旬に連続して流産の発生を認めた農場で、神経症状を示した 2頭の新生豚の脳から Japanese encephalitis virus(JEV)が分離された。1985年には検査頭数81頭を病性鑑定し、19頭から ADVが分離された。また、この年には生後間もない新生豚に神経症状を伴って短時間につぎつぎに死亡する奇病の発生があり、検査材料として持込まれた新生豚の各臓器から GTVが分離された。1986年には検査頭数60頭を病性鑑定し、19頭から ADVが分離された。また、3戸の農場でつぎつぎに流行した哺乳中の子豚および離乳した子豚の下痢症の発生に伴い、搬入された検査材料(下痢便)から TGEVおよび Porcine enterovirus(PEV)が分離された。1987年には37頭の検査材料が持込まれ、その大部分は細菌感染症であった。しかし、この年の10月初め頃、間もなく離乳する予定の哺乳中の子豚 1腹 9頭に顔面の腫れと歩行困難を認め、短時間のうちに死亡する奇病の発生があり、検査材料として持込まれた子豚の各臓器から GTVが分離された(表-6)。

## 2、豚のゲタウイルス感染症の発生の確認

## 1) 発生状況

1985年10月、藤沢市の兼業養豚場において、正常分娩された子豚 1腹12頭が生後間もなく元気消失、受乳意欲を欠き、ふるえ等の神経症状および黄褐色下痢便の臨床症状を呈して、生後 3日目までに 8頭が死亡した。ひん死の状態にあった残りの 4頭は、その後次第に回復して生残したが、発育不良となった。この豚群(85-109)の母豚には、この間、何等の異常を認めなかった。また、本症の発生に伴い、近隣の養豚場へ立入り検査を実施したが、同一症状を示す哺乳中の子豚、離乳した子豚、肉豚及び繁殖豚は検出されなかった。

1987年10月、秦野市の兼業養豚場において、生後 23 日齢の哺乳中の子豚 9 頭に顎下部の腫脹とふるえおよび麻痺等の神経症状を現して、急性経過で死亡する疾病が発生した。発生農場は 2頭の繁殖豚を飼育しており、該当の母豚は 9月11日に11頭の子豚を分娩し、このうちの 2頭は死亡胎子であった。正産された 9頭の子豚はその後順調に成長した。ところが、10月 4日頃から 1 腹全頭に元気消失と起立不能を認め(写真-1)、さらに、顔面および頸部の腫脹も伴っていた(写真-1, 2)。翌日の10月 5日にいたって午前中に 2頭死亡し、午後には 1頭の死亡と 1頭のひん死状態の子豚を確認した。残りの 5頭については顔面の腫脹などの異常な所見を観察出来たが、数日後には受乳意欲も回復するようになり、死亡するものはなかった。この間、豚群(87-96)の母豚は何等の異常を認めなかった(表-7)。

## 2) 臨床病理学的検査成績

### (1) 血液学的検査

豚群87-96 において発熱および顔面の腫脹の見られた発症中の子豚 4頭について血液検査を実施した。赤血球数については 534万、720 万、 528万、660 万 / $\mu$ l であり、平均611 万 / $\mu$ l となった。白血球数において 6,600, 3,400, 7,800, 7,400/ $\mu$ l であり、標準値7,800/ $\mu$ l より低値を示したものが 2頭検出された。白血球の百分率では、好酸球が 1頭にのみ検出され、その割合は 1.5 %となった。好塩基球は全頭とも検出されなかった。前骨髄球および骨髄球は 3頭に検出され、それぞれ 8.5, 33.5, 16.5 %を示した。好中球においては 4頭に好中球の左方移動を認め、桿状核 11.0, 18.5, 54.0, 5.0 %, II分葉核 4.5, 6.5, 12.5, 10.5 %, III分葉核 1.0, 0.5, 0.4, 4.5 %, IV分葉核 0.0, 0.0, 0.0, 0.5 % であり、桿状核の標準値 4.7 %を越えるとともに、分葉核においては標準値 54.5 % をそれぞれ 5.5, 6.5, 12.5, 15.5 % 少ない値を示した。リンパ球については 72.5, 38.0, 14.5, 72.5%であり、このうち、リンパ芽球 1.5, 2.5, 2.5 %および異形リンパ球 0, 0, 0, 1.5 % も検出された。単球は 1.0, 1.0, 0, 4.0 % 検出された。

## (2) 解剖学的検査

生後 3日目で死亡した新生子豚 (豚群85-109) 5頭の病理解剖所見は次のとおりであった。

### 新生子豚 - I

検体の状況 : 死 体

体 重 : 1,185 g

所 見 : 空腸および回腸壁の菲薄化と黄色水様物の貯留が見られた。

新生子豚 - II

検体の状況：死 体

体 重：1,085 g

所 見：顎下部皮下の膠様浸潤、両肺の前、中葉辺縁の肝変化および腎臓表面に針尖大点状出血が認められた。

新生子豚 - III

検体の状況：死 体

体 重：965 g

所 見：空腸および回腸壁の菲薄化と黄色水様物の貯留が見られた。

新生子豚 - IV

検体の状況：死 体

体 重：835 g

所 見：顎下部皮下の膠様浸潤と右肺前、中葉辺縁の肝変化および腎臓表面の針尖大点状出血が見られた。

新生子豚 - V

検体の状況：死 体

体 重：980 g

所 見：右肺前葉および左肺後葉の肝変化、空腸および回腸の菲薄化と黄色水様物の貯留が見られた。

生後23日目で死亡した子豚（豚群87-96）2頭の病理解剖所見は次のとおりであった。

#### 子豚 - I

検体の状況：死 体

体 重：9,000 g

所 見：耳翼および腹部下方にわたるチアノーゼ、眼瞼の周囲の浮腫および下顎部の冷性浮腫を認めた。また、下顎部、腰部および下腹部の皮下織には顕著な膠様浸潤を認めた（写真-3）。下顎リンパ節および全身の体表リンパ節は水腫性であった（写真-4）。脳は大脳表面に分布する血管の充血を認め、心臓では軽度の心嚢水の増量を認めた。肺はうっ血と水腫により腫脹しており、腎臓は全体的に暗紫色を呈していた。

#### 子豚 - II

検体の状況：ひん死

体 重：7,900 g

所 見：元氣消失して歩行不安定であり、横臥を好んだ。触診では皮温の低下を認めた。眼瞼の周囲には浮腫が見られ、頬部から下顎部にわたって腫脹していた。剖検的には頬部、下顎部および下腹部の皮下織に顕著な膠様浸潤を認めた。下顎リンパ節および全身の体表リンパ節は水腫状だった。脳は大脳表面の血管に充血を認め、心臓には軽度の心嚢水の増量を認めた。

肺の一部はうっ血を伴って水腫状になっていた。肝臓は全体的に退色していた。腎臓は著しく退色して、包膜剥離は困難であった。腸管においては小腸部の粘膜が菲薄となっていた（表-9）。

### （3）組織学的検査

豚群85-109で検索した新生子豚の病理組織学的所見は次のとおりであった。

新生子豚-Iでは、肺において細気管支周囲に好中球の浸潤が見られた。肝臓においては一部の肝細胞に空胞を形成していた（写真-5）。腎臓の間質に小出血巣が散見された（写真-6）。各リンパ節には水腫性の変化が中程度に認められ、好中球や好酸球の軽度な浸潤もあった。また、リンパ母細胞は萎縮し、胚中心は殆ど認められなかった（写真-7）。

新生子豚-IIでは、扁桃の陰窩腔内に壊死物を貯留していた。肝臓では一部の肝細胞内に小空胞を形成していた。腎臓の間質に小出血巣があって、尿細管の管腔内にエオジン好性の物質を貯留していた。各リンパ節の共通所見としては好中球や好酸球の軽度な浸潤を伴い、リンパ母細胞の胚中心も不明瞭であり、リンパ球の核濃縮および核崩壊が見られ、リンパ球は減少していた（写真-8）。

新生子豚-IIIでは、扁桃の陰窩腔内に壊死物を貯留していた。肺においては肺胞壁が水腫状に肥厚しており、肺胞腔内に漿液を貯留している像とともに、好中球の軽度な浸潤も見られた。肝臓では一部の肝細胞内に小空胞を形成していた。腎臓の間質には小出血像が僅かに認められた。尿細管の管腔内にエオジン好性の物質を貯留していた。また、集合管腔内に剥離した細胞も



含まれていた。腸管では空腸および結腸の粘膜上皮細胞の一部に変性、壊死および剥離を認めた。

各リンパ節には好中球や好酸球の軽度な浸潤があり、水腫性の変化を認めるとともにリンパ球の核濃縮および核崩壊を伴ってした。

新生子豚-Ⅳでは扁桃の陰窩腔内に壊死物を貯留していた。肝臓の肝細胞内に小空胞を形成していた。腎臓の間質には小出血像を認め、尿細管の管腔内にエオジン好性の物質があり、集合管腔内には剥離した細胞も貯留していた。腸管では結腸の粘膜細胞に壊死を認めた。

各リンパ節には好中球や好酸球の軽度な浸潤があり、このうち、腸骨リンパ節にリンパ球の核濃縮および核崩壊が見られた。

新生子豚-Ⅴでは扁桃の陰窩腔内に壊死物を貯留していた。肝臓では肝細胞内に小空胞の形成と小葉間胆管や毛細胆管に胆汁のうっ滞を認めた。腎臓では間質に小出血像を認め、尿細管の管腔内にエオジン好性の物質および剥離細胞を貯留していた。また、集合管にも剥離細胞の貯留があった。

リンパ節では腸骨下リンパ節のリンパ細胞に不明瞭な胚中心を認め、リンパ球が減少していた。

豚群 87-96の病理組織学的所見は次のとおりであった。

子豚-Ⅰについては大脳表面の血管に充血があり、軟膜は若干肥厚していた。心臓の心外膜に中程度の肥厚を認めた。肺においては細気管支の粘膜にリンパ球の浸潤があり、肺胞壁には軽度の好中球浸潤が認められ、肝臓にはグリソン鞘の血管周囲にリンパ球および好酸球の軽度な浸潤があり、胆汁のうっ滞を認めた。腎臓では腎乳頭の一部に出血があり、間質の一部に水腫性変化も認められた。尿細管においては集合管腔が拡張しており、管腔内に

硝子円柱が認められた。ボウマン嚢の外壁は結合組織の増生による肥厚も見られた。小腸の一部の絨毛に水腫性の腫大も認められた。

リンパ節においてはリンパ球の減少とともに、リンパ球の崩壊および壊死も認められた。

子豚Ⅱについては大脳軟膜の肥厚とともに脳内血管の充血を認めた。心臓では心筋の一部に硝子化および塊状崩壊（写真-9）を伴っていた。肺は肺胞壁に肥厚（写真-10）を認め、一部に水腫性の肥厚も見られた。また、肺胞腔内には少数の剥離細胞や好中球が見出された。さらに、間質に軽度な好中球の浸潤を伴っていた。脾ではリンパ球の崩壊、壊死（写真-11）およびリンパ球の減少が見られた。また、血管壁は水腫性に膨化していた。腎臓は間質に結合組織の増生があり、血管壁や乳頭部に水腫性（写真-12）の変化を認めた。尿細管および集合管は拡張しており、尿細管腔内に硝子様円柱および剥離細胞が見られた。腸管においては粘膜下織に好中球、好酸球およびリンパ球の軽度な浸潤があった。

リンパ節においてはリンパ球の崩壊および壊死を伴い、リンパ球は減少していた。

### 3) 細菌学的検査成績

#### (1) 細菌分離

豚群85-109の新生子豚 5頭についての細菌検索では、新生子豚Ⅰにおいて大腸菌が肝臓で $10^3 \sim 10^4$  個/g、空腸および回腸 $10^8$  個/gとクロストリジウム菌が空腸および回腸で少数分離された。新生子豚Ⅱでは大腸菌が空腸およ

び回腸で $10^8$ 個/gとクロストリジウム菌が少数分離された。新生子豚Ⅲでは大腸菌が肺で $10^2$ 個/g、肝臓 $10^3$ 個/g、腎臓 $10^1$ 個/g、空腸および回腸 $10^8$ 個/gとクロストリジウム菌が回腸で少数分離された。新生子豚Ⅳでは大腸菌が脳 $10^3$ 個/g、肺 $10^8$ 個/g、肝臓 $10^3$ 個/g、腎臓 $10^8$ 個/g、空腸および回腸 $10^8$ 個/gと回腸よりクロストリジウム菌が少数分離された。

新生子豚Ⅴにおいては、大腸菌が空腸および回腸で $10^8$ 個/g分離された。

豚群87-96の子豚2頭についての細菌検索では、子豚Ⅰにおいて大腸菌が胃 $10^4$ 個/g、十二指腸 $10^5$ 個/g、空腸 $10^7$ 個/g、回腸 $10^8$ 個/g、分離され、その他の細菌は分離されなかった。

子豚Ⅱでは大腸菌が脳 $10^4$ 個/g、腎臓 $10^5$ 個/g、胃 $10^5$ 個/g、十二指腸 $10^6$ 個/g、空腸 $10^6$ 個/gおよび回腸 $10^8$ 個/g分離され、その他の細菌は分離されなかった(表-10)。

## (2) エンテロトキシンの検出

豚群85-109の死亡新生子豚5頭の空腸および回腸から分離した5株の大腸菌の易熱性および耐熱性エンテロトキシンを検査したところ、全て陰性であった。

豚群87-96の子豚2頭については、空腸から分離した大腸菌9株を用いて、易熱性、耐熱性エンテロトキシンおよびベロトキシンを検査したが、全て陰性であった。

## 4) ウイルス学的検査成績

### (1) ウイルス分離

豚群85-109において死亡した新生子豚 4頭の脳、扁桃、肺、腎臓および腸管の10倍と100倍乳剤を作り、ESKおよびHmLu-1培養細胞へ接種したところ、接種後2日目頃から明瞭な円形の細胞変性効果(CPE)をともなって増殖し、容易に継代できるウイルスが脳 $10^{4.25} \sim 10^{5.25}$ 、扁桃 $10^{4.50} \sim 10^{4.75}$ 、肺 $10^{2.75} \sim 10^{6.25}$ 、腎臓 $10^{3.75} \sim 10^{5.25}$ 、腸管 $10^{0.5} \sim 10^{3.25}$  TCID<sub>50</sub>/g 分離された(写真-13,14)。また、死亡した新生子豚 4頭の脳乳剤を生後2日齢の乳のみマウスへ脳内接種したところ、接種後4日目に死亡した。生後4日齢では接種後6日目頃から片側および両側の後肢に麻痺が現れて、歩行困難となり、さらに、受乳も出来なくなって脱水し、ついには死亡した(写真-21,22)。

死亡した乳のみマウスの臓器乳剤(脳、肺、肝臓および腎臓)を培養3日目のHmLu-1培養細胞へ接種してウイルスの回収を試みたところ、全ての接種材料からウイルスを回収できた。

豚群87-96においては子豚2頭の臓器乳剤をCPKおよびHmLu-1培養細胞へ接種したところ、死亡子豚については脳 $10^{2.5}$ 、扁桃 $10^{3.0}$ 、肺 $10^{2.0}$ 、肝臓 $10^{3.0}$ 、脾臓 $10^{3.0}$ 、腎臓 $10^{3.0}$ と、ひん死子豚では脳 $10^{3.5}$ 、扁桃 $10^{4.0}$ 、肺 $10^{3.0}$ 、肝臓 $10^{4.5}$ 、脾臓 $10^{4.0}$ 、腎臓 $10^{2.5}$  TCID<sub>50</sub>/gのウイルスが分離された(表-12)。

## 3、分離ウイルスの性状

### 1) 分離ウイルスの物理化学的性状

分離されたウイルス 5株は、子豚の回復血清を指標として、中和試験により抗原性を調べたところ、すべて同一の抗原性を示したので、85-109-1株を代表株として物理化学的性状を検討した。

### (1) 熱に対する安定性

85-109-1株は 1M  $MgCl_2$  の存在下で、50°C、60分間の感作により、完全に不活化された。しかし、イーグル維持培養液および精製水を媒体とした場合には不活化されず、それぞれの感染価が  $\log 3.0$  および  $\log 3.25$  の低下に止まった。また、-20°C、60分間の感作では 1M  $MgCl_2$ 、イーグル維持培養液および精製水で、それぞれ感染価が  $\log 1.0$ , 0.5, 0.5低下したに過ぎなかった(表-13)。

### (2) 濾過試験

85-109-1株の感染培養液を用いて、孔径 200, 100, 50 および 25 nmのメンブランフィルターの通過性を検討した。その結果、85-109-1株は孔径 200 および 100 nmを極めて良く通過したが、50および25 nmは通過しなかった(表-14)。

### (3) エーテルおよびクロロホルムに対する感受性

感染培養液にエチルエーテル液を20%の割合に加え、1時間後に測定した感染価は  $\log 0.5/0.1$  ml 以下となった。また、感染培養液へクロロホルム液を20%の割合に加え、1時間後の感染性は証明できなかった(表-15)。

#### (4) pHの影響試験

分離ウイルス 2株 (85-109-1~2 株) を用いて pH 3.0の条件下に放置した影響試験では、感染価が  $\log 3.5 \sim 4.0 / 0.1 \text{ ml}$  低下した (表-16)。

#### (5) 5-iodo-2-deoxyuridine(IUDR) のウイルス増殖に及ぼす影響

分離ウイルス 85-109-1 株を用いて IUDR (50  $\mu\text{g/ml}$ ) の影響を検討したところ、接種後 2日目頃から CPEを認め、接種後 5日目の感染価は  $\log 7.0 / 0.1 \text{ ml}$  を示し、無処理対照の 85-109-1 株の感染価  $\log 7.0 / 0.1 \text{ ml}$  と同値であった (表-17)。

### 2) 分離ウイルス 85-109-1 株の血清および生物学的性状

#### (1) 交差中和試験

これまでの物理化学的性状の検査の結果、分離ウイルスはゲタウイルスの疑いが強かったので、標準株とされているハルナ株との間でウイルス稀釈法による交差中和試験を行った。

85-109-1株の免疫血清はホモの間で中和対数3.4, ヘテロで2.9, ハルナ株の免疫血清はホモとの間で中和対数2.7, ヘテロで2.1 であった (表-18)。

#### (2) 分離ウイルスの血球凝集 (HA) 性

分離ウイルス 85-109-1 株および 87-96-1株の各種動物赤血球に対する凝集性はガチヨウ血球に限定して凝集した (表-19)。

ガチヨウ血球に対するHA性を pHおよび反応温度について検討すると、pHにつ

いては両株とも pH 6.0 ~ 6.2の範囲で凝集した。反応温度については85-109-1株において 4°Cで最高64倍を示したのに対し、25°Cでは最高32倍となった。また、87-96-1株においては 4°Cで最高 128倍を示したのに対し、25°Cでは最高64倍だった。pHおよび反応温度との相互関係ではpH 6.0の場合に限り、温度差に影響されずに凝集像を認めたが、さらに 4°Cの低温反応で、より高いHA価を示した(表-20)。

### (3) 分離ウイルス85-109-1株に対する各種培養細胞の感受性

85-109-1株に対する各種培養細胞の感受性を同一条件で行った結果、3日目の感染価は MA104細胞では  $\log 7.16/0.1 \text{ ml}$ , HmLu-1細胞では 7.07, ESK細胞では 6.16, BT細胞では 6.41, Vero細胞では 6.32, MDBK細胞では 6.16, また、BT-c1細胞では 5.25だった(表-21)。また ESK感染細胞の電子顕微鏡写真では、細胞の表面より出芽して成熟するウイルス粒子が検出された(写真-15)。

### (4) HmLu-1細胞における分離ウイルス85-109-1株の増殖態度

HmLu-1細胞における85-109-1株ウイルスは接種 4時間後に至って初めて液相に現れるようになり、 $\log 2.25 \text{ TCID}_{50}/0.1 \text{ ml}$ の感染価を示した。続いて、6時間後 3.75, 18時間後 6.75、24時間後 6.75、48時間後 7.0、72時間後 6.5となり、接種後48時間後に最高の感染価を示した。HmLu-1細胞中に出現する蛍光抗原は、ウイルス接種後 6時間目頃(写真-18)から単細胞の細胞質に認められるようになり、24時間後(写真-20)ではブラック状に広がり、特に、細胞質のゴルジ小体と思われる部位で、星状に発光する蛍光抗原が検出された(写真-18)。

HA抗原の出現は蛍光抗原より遅く検出され、ウイルス接種後24時間目にHA価 4倍となり、48時間目では最高の64倍となった(表-22)。

HmLu-1細胞に形成されるプラックは、ウイルス接種後 5日目で直径 3-4 mmと大きかった(写真-16, 17)。

#### (5) 分離ウイルス85-109-1株とハルナ株とのHI抗体価における相関性

85-109-1株とハルナ株を用いて野外血清 200例について比較検討した。その結果、未經産豚の 107頭中 7頭(6.5%)に抗体が検出され、陽性豚の平均抗体価はハルナ株49倍であったのに対し、分離株44倍であった。また、経産豚93頭中では47頭(50.5%)に抗体を検出でき、陽性豚の平均抗体価はハルナ株 720倍であったのに対し、分離株 810倍であった。未經産豚および経産豚を合せた 200頭の検査成績にもとづく両株の関係を相関係数でみると、 $r = 0.95$  となり、1%の危険率で  $y = 0.81 + 1.08x$  の直線回帰式が成立した(表-24)。

#### (6) 分離ウイルス85-109-1株の乳のみマウスおよび親マウスに与える影響

分離ウイルス85-109-1株を用いて、乳のみマウスおよび妊娠マウスを含む親マウスについて接種試験を行った。

分離ウイルス85-109-1株を 1日齢の乳のみマウス脳内へ接種すると、1~2日目頃から活力および受乳意欲を欠き、皮膚は乾燥するようになり、次第に脱水状態を呈して、まもなく死亡した(写真-21)。半数致死量(LD<sub>50</sub>)は0.1 ml当り  $10^{-7.0}$  であった。接種してから死亡するまでの平均死亡日数は3.7日



で、ウイルス量に比例して死亡日数も早くなって行った。 $10^{-7.0}$  接種区で生存した 5匹の20日齢時におけるHI抗体価は幾何平均 (Gm) 20倍となった。しかし、 $10^{-8.0}$  以下の接種区には抗体を検出できなかった。乳のみマウスが死亡した接種区の親マウスには40～ 160倍のHI抗体価を検出された (表-24)。

生後 1日齢から15日齢までの奇数日齢の乳のみマウスに100 TCID<sub>50</sub> ウイルスを接種すると、発症死する接種時の最終日齢は13日齢で1/10匹死亡し、15日齢に至ると全ての乳のみマウスが生存した。接種後の死亡までの平均日数は4.2 ～10.9日で平均 8.2日となった。各接種日齢と死亡数との関連をみると、1日齢時で平均 4.2日、3日齢時 4.5日、5日齢時 7.1日、7日齢時10日、9日齢時 10.9日、11日齢時 10.8日および13日齢時 10日であった。ウイルスを接種して生残った乳のみマウスの平均HI抗体価は9日齢時の接種で平均20倍、11日齢時の接種で平均 26.4倍、13日齢時の接種で平均 21.6倍、および15日齢時の接種で平均 18.6倍を示した (表-25)。

ウイルスの接種経路をそれぞれ脳内(IC)、腹腔内(IP)、点鼻(IN)および点眼(OL)に分け、ウイルスの接種量を10および100 TCID<sub>50</sub> /0.1mlに調整して、0.01 ml を1日齢の乳のみマウスに接種すると、IC区において90%(9/10)、100%(10/10)、IP区 70%(7/10)、100%(10/10)、IN区 0%(0/10)、20%(2/10)およびOL区 0%(0/10)、70%(7/10)となった。平均死亡日数はIC区 4.1日、2.9日、IP区 4.9日、3.9日、IN区 生存、4.0日、OL区 生存、5.0日であった。ウイルス接種後生存した乳のみマウスの平均HI抗体価はIC区10倍以下、死亡、IP区 15.9倍、死亡、IN区 10倍以下、11.2倍、OL区 10倍以下、12.6倍であった。また、親マウスの抗体保有状況は IC区 10倍以下、IP区 160倍、INおよびOLとも10倍以下となった (表-26)。

ウイルス接種後発症して死亡した乳のみマウスについてウイルスの検索を行ったところ、IC、IP、OL区死亡の乳のみマウス（脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、腸管、筋肉）から  $\log 7.1 \sim 9.0$  TCID<sub>50</sub> /gのウイルスが回収された。IN接種区で死亡した乳のみマウスについては、臓器の損失があつて検索できなかった。回収されたウイルスは、いずれも pH 6.0の反応液においてガチョウ血球を凝集した。また、回収されたウイルスをHmLu-1培養細胞へ接種して抗ゲタウイルス蛍光標識抗体で染色したところ、蛍光抗原が検出された（表-27）。

分離ウイルス85-109-1株を用いて、1日齢の乳のみマウスの脳内へ100 TCID<sub>50</sub> /0.1ml接種し、無接種乳のみマウスへの接触感染について検討したところ、接種群は2試験区とも全頭死亡したのに対し、無接種群には発症や死亡を認めなかった。無接種群の生存した乳のみマウスのHI抗体保有状況は親マウス No.18区で40%(2/5)、No.20区で75%(3/4)となり、平均抗体価は両区とも10倍であった。なお、親マウスのHI抗体価はNo.18区において10倍以下であったが、No.20区では40倍を示した（表-28）。

親マウスの腹腔内へ分離ウイルス85-109-1株を  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> /0.1ml 接種して1日齢の乳のみマウスへの水平感染を検討したところ、親マウス No.22では乳のみマウスに臨床的な異常を認めず、死亡するものは無かった。親マウス No.24では、接種後の親マウスに異常を認めなかったが、乳のみマウスにおいて、2日目頃から元気を消失して明らかに歩行できないもの2匹観察された。この2匹は3日目になると、皮膚に緊張感もなくなり脱水状態を示して死亡した。死亡した乳のみマウスについてウイルスの回収を実施したところ、HmLu-1培養細胞にCPEが現れ、培養上清にガチョウ血球を凝集するHA抗

原を確認した。また、感染培養細胞には抗ゲタウイルスの蛍光標識抗体に反応する蛍光抗原を検出した。接種後 2週間経過した時点で、生存した乳のみマウスの GTVに対する抗体陽性率は両区とも 100 % であった。HI抗体の保有状況は No.22において、平均18.7倍、No.24 26.0倍となり、また、親マウスのHI抗体保有状況は両区とも40.0倍であった(表-29)。

妊娠日数の異なった親マウス 7匹を無作為に抽出して分離ウイルス85-109-1株を腹腔内へ $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml 接種したところ、総産子数は57匹であり、一腹平均 8.1匹となった。分娩された57匹の乳のみマウスのうち、13匹は生後まもなく死亡したり、あるいは 3日目までの間に発症して受乳ができなくなり、22.8 %の死亡率を示した。死亡した乳のみマウスからはいずれもウイルスが回収された(表-30)。

85-109-1株を妊娠している親マウスに接種すると、死産、分娩された新生マウスの死亡および生後 2～ 3日間のうちに発症して死亡する事例を観察したので、異なった妊娠日数の親マウス19匹に接種して検討した。その結果、接種時の妊娠日数が17日未満の場合に、10匹以下の産子数となる傾向があり、平均6.4 匹となった。このうち、妊娠10日未満の 2匹については 3および 6匹と著しく少なかった。妊娠日数が17日を過ぎると、産子数は増えて11.4匹となった。

生れて間もない乳のみマウスが発症して死亡する現象は、接種時の妊娠日数が11日を限度として見られるようになり、妊娠日数11日で33.0 %、13日で25.0 %、16日で64.3 %、17日で37.5 %、18日で8.3 %、19日で7.4 %、20日で7.1 % の死亡率を示し、妊娠16日に接種された場合に、最も高い死亡率となった。発症から死亡までの臨床所見は活力の消失とともに受乳できなくなり、

次第に衰弱して死亡する一連の経過を観察した(表-31)。

#### (7) 子豚への接種試験

分離ウイルス85-109-1株を 9頭のHPCD子豚に $10^{5.5}$  PFU/ml のウイルス量を接種したところ、筋肉内接種した 6頭の全てに食欲不振、元気消失、全身の震え、皮膚の紅潮、舌の震えおよび後肢の運動失調などを接種後24時間以内に認めた。経口接種した 3頭のうちの 1頭は、接種 2日後に軽度な臨床的異常が見られたものの、翌日には回復した。残りの 2頭については臨床的な異常を認めなかった(表-32)。

筋肉内接種した 6頭のうち、死亡した子豚 2頭およびひん死状態の子豚 3頭についての病理組織学的検査では異常所見を認めなかったが、ウイルスの回収を行ったところ、血清を含む全ての臓器から $\log 2.0 \sim 5.6$  PFU/mlのウイルスが回収された。ウイルスの感染価が $\log 4.0$  PFU/ml以上を示した臓器は扁桃、肺、肝臓、脾、副腎、腸管および血清であった。生後18日齢で筋肉内接種した子豚は、生後 5日齢で筋肉内接種したものより低い感染価で、 $\log 0.7 \sim 3.3$  PFU/ml だった(表-33)。

### 4、ゲタウイルス感染症の血清疫学

#### 1) 発生豚群の抗体調査

豚群85-109の分離ウイルス85-109-1株に対する抗体調査では、本症が発生する以前に採材保存してあった母豚血清および病性鑑定を実施した発症中の子豚血清で、中和抗体 1倍以下、HI抗体価10倍以下の陰性を示し、発生後53

日目では、母豚の中和抗体 490倍、HI抗体 320倍までに上昇した。また、新生子豚 4頭については、発生後53日目の経過血清で、320～490倍の中和抗体価 320～640 倍のHI抗体価を検出した。豚群87-96 については発生時の母豚と子豚血清中に抗体が検出されず、HI抗体価は10倍以下を示した。発生後44日目の経過血清の検査では、母豚に抗体の有意上昇を認めなかったが、生存子豚の 4頭に160 ～320 倍のHI抗体を検出した（表-34）。

## 2) 神奈川県下での抗体調査

神奈川県下での調査地域を海岸に接する地域、水田や畑の多い平野地域および山岳に接する地域の養豚場の中から、1986年 4月から10月まで59戸309頭と1987年には7月から10月まで、74戸 273頭の経産豚および未經産豚について調査した。その結果、調査地域全体の抗体陽性率は、1986年 57.6 %、1987年 54.1 % となり、2カ年間の平均値は55.9 %となった。市別では、平塚市 71.0 %、秦野市 35.0 %、伊勢原市 56.0 % であった。市別の前年対比では、平塚市 29.4 % 増加、秦野市 30.0 % 減少、伊勢原市 12.1 % 減少した（表-35）。

採血の時期を 7月から10月までとし、検出した陽性豚の分布状況を 2カ年間の調査成績から比較すると、平塚市 36.1 % から28.2 %へ減少、秦野市 53.9 %から7.5 % へ減少、伊勢原市 55.3 % から37.6 %へ減少した（表-36）。

陽性豚の保有するHI抗体価は10倍から10,240倍まで広く分散して検出された。1986年の平均抗体価 692倍は、1987年の 407倍より僅かに高かった。陽性率を産次ごとに分けてみると、1986年においては、産次が多くなるにつれて高くなって、8産以上で85.7 %を示した。調査地域の平均陽性率は1986年

50.5 %に対し、1987年は29.9 %と低かった（表-37）。

1986年に実施した陽転時期の把握調査では、調査に用いた GTV抗体陰性豚の全てに陽転を認めなかった。一方、食肉処理場へ運び込まれた県内産の肉豚には 9月の調査で、39頭中 3頭(7.7 %) および11月の調査で、18頭中 2頭(11.1 %) の陽性豚を検出した（表-38）。

#### IV. 考 察

ふるえ等の神経症状を現して、急性経過で死亡した豚群85-109の新生子豚（生後2日）5頭および顔面の腫脹と、運動失調により急性経過で死亡及びひん死状態にあった豚群87-96の子豚（生後23日）2頭について、臨床病理学、細菌およびウイルス学的検索を行い、病因の解明と疫学調査を実施した。

豚群85-109における新生子豚の解剖所見では、顔面および顎下部の皮下織に膠様浸潤、リンパ節の軽度な水腫と肺の一部に軽度の水腫が見られ、また、腸管（空腸、回腸）の菲薄化を認めるものが観察された。

一方、生後23日齢で発症した豚群87-96の子豚については、顎下部の腫脹と耳翼や皮下織にチアノーゼが明瞭に現れ、切開すると黄色の膠様浸潤と部位により軽い出血を伴っていた。また、大脳の血管充血、全身の体表リンパ節および各臓器リンパ節の水腫、心のう水の貯留、肺のうっ血水腫が見られ、2頭に共通した所見でもあった。

病理組織学的検査では、新生豚の扁桃の陰窩腔内に壊死物が貯留していた。リンパ節においてはリンパ球の崩壊、壊死によるリンパ球の減少が認められた。子豚においては大脳の軟膜や心外膜に軽度の肥厚があり、リンパ節ではリンパ球の崩壊、壊死によるリンパ球の減少を認め、各臓器の組織には部位により、水腫性の変化も見られた。

ウマのゲタウイルス人工感染例によると、筋肉および臓器の湿潤感が見られる程度で、実質臓器の出血や混濁が無く、全身のリンパ節は軟らかく水腫性となり、リンパ球のうっ滞を伴っていると言われる。また、組織学的には脳および脊髄軟膜血管に血液の充血、脳実質のVirchow robin腔に中等ないし軽微な出血を認め、グリア細胞が慢性に増えており、神経細胞内に好酸

性滴状物を認めるが、これらの程度は非常に軽いものと言われる〔3,62〕。新生子豚および子豚の症例を馬の発生例や人工感染例〔3,62〕と対比した場合の類似点は、病変が非常に軽度な点と水腫性変化を中心に一致しており、循環障害も伴っていることが強く疑われる所見であった。

発症している豚群87-96の子豚の血液所見では、赤血球数が正常値の範囲内の測定値(611万/ml)を示したのに対し、白血球数においては4例中の2例に標準値以下の値を示すものが検出され、この内の1頭は3,400/ $\mu$ l個で著しい白血球減少症となっていた。また、各白血球の占める割合ではリンパ球において4例中の2例に著しい減少を認め、さらに、4例に幼若なリンパ球と異形のリンパ球を検出した。好中球においては数量による変動を認めないが、桿状核および骨髄球などの幼若球を検出できて、好中球が左方転移していた。白血球数の減少は一般に好中球、好酸球、好塩基球、単球およびリンパ球など、いずれによっても起り得るが、日常の検査で注意されているのは好中球およびリンパ球の減少である〔25,28,34,49〕。このうち、リンパ球数の減少はウイルス性疾患の感染初期に認められる現象であり〔21,28,34,49〕、本症例は、ウイルス性の感染症が強く疑われるものであった。

幼若白血球の出現する疾病としては白血病および悪性腫瘍などが知られている。これらの疾病は骨髄などの造血組織の異常に起因するものであると言われる〔21,64〕。一方、ウシのピロプラズマ病のように赤血球の破壊を伴う疾病では、造血機能の亢進により幼若赤血球の赤芽球などが出現してくる。本症例では脾やリンパ節におけるリンパ球の著しい崩壊などによって、幼若な白血球が出現したものと考えられる。

細菌検査では、大腸菌が両豚群ともに各臓器より分離されており、とくに、



腸管系において $10^{8.0}$  個/gと多く、豚群87-96の子豚では胃および十二指腸まで上向していた。分離された大腸菌については、耐熱性および易熱性エンテロトキシンの産生能について検査し、豚群87-96の子豚から分離された大腸菌については、ペロトキシンも追加して検討したところ、いずれも陰性であった。

子豚は一般に下痢性病原体に感染し易いが、その要因として、消化管の生理機能および局所免疫能の未発達と細菌叢の未形成などが挙げられる。また、種々の病原体は子豚の飼育環境に広く分布しているため、常に感染の危機にさらされている〔56〕。とくに、毒素原性大腸菌に起因する下痢は哺乳期に多く見られる〔1,20〕。原因となる大腸菌は付着因子とエンテロトキシンの二つの病原因子を保有しており、定着が感染成立の第一段階であり、菌の増殖によって産生されたエンテロトキシンの作用で、小腸における水分代謝機構が攪乱され、体内電解質の喪失、体液のアシドーシスによる下痢を発現する〔20,26,41〕。今回の症例では臨床的に著しい下痢を発現せず、エンテロトキシンも検出されなかったことから、大腸菌による下痢症とは思われなかった。

ウイルス検査では新生子豚および子豚の症例とも、脳、扁桃、肺、腎臓などの各臓器から、培養細胞にCPEを伴って増殖するウイルスが分離された。分離されたウイルスはウシ、ブタ、サル、およびハムスター由来の継代培養細胞に良く増殖するとともに、ガチョウの赤血球をpH 6.0~6.2の領域で凝集する性質を有していた。分離ウイルスの物理化学的性状はIUDRの存在下で、ウイルスの増殖が抑制されなかったことから、ウイルスの核酸はRNA型と考えられた。また、エーテル、クロロホルム、pH 3.0の水素イオン濃度及び

1M MgCl<sub>2</sub> 溶液のもとで行った50°C、60分の加熱により容易に不活化された。以上のウイルス諸性状はトガウイルス科のアルファウイルス属に良く一致しており〔5, 7, 31, 52〕、また、我が国の豚は高率に GTVの感染を受けている〔19〕ことから、分離株（85-109-1株）と豚由来の GTVハルナ株を用いて交差中和試験を行った。その結果、分離株とハルナ株との間に交差が認められたので、分離株は GTVと同定した。

発生豚群の疫学調査では、生存した哺乳中の子豚の血清中に高い中和およびHI抗体価を検出でき、しかも、母豚および子豚に陽転を確認したことにより、本症はゲタウイルス感染症と診断した。そこで、85-109-1株を代表株として、生後 5日齢および18日齢のHPCD子豚に経口および筋肉内接種したところ、筋肉内へ接種した 6頭の全てに食欲不振、活力を欠き、全身性の震え、体表の赤変および舌の震え等を観察した。また、ウイルス接種後の24時間以内には腰部の失調も見られ、野外で観察された所見と同様な症状が再現された。臨床症状を示した接種豚からのウイルス回収試験では、筋肉内接種豚において、全ての臓器からウイルスを回収できたのに対し、経口接種では扁桃、直腸および鼠径リンパ節に限られていた。

トガウイルス科のアルファウイルス属の感染形式は蚊などのベクターを介して行われるとされている〔8, 10, 31, 32〕。

HPCD豚の接種試験では、経口よりも筋肉内接種の方がより重度の臨床症状を現した。熊埜御堂〔33〕らはブタおよびウマ由来の GTVを生後 3週齢の子豚と 8カ月齢の豚に接種し、一過性の発熱および食欲減退をとともに認め、とくに子豚については元気消失および下痢を伴うとしており、このことから自然界における GTVの増幅動物としての役割りを示唆している。

今回実施した試験では生後 5日齢のHPCD豚にウイルスを接種すると、発熱および震えなどの神経症状を伴って、急性経過で死亡する事実が実証できた。このうち、神経症状は筋肉内接種に限定して軽度に現れ、短時間の内に死亡したが、病理組織上の所見ではこれらを証明する病変を認めなかった。このことから GTVの病原性は感染時のウイルス量と豚の年齢要因により、大きな影響を受けると思われた。

マウスに対する病原性について、乳のみマウスと妊娠マウスを用いて検討した。乳のみマウスへの病原性は、生後 1日齢から 3日齢まではウイルスを接種すると、2日目頃から元気、活力が無くなり、遅くとも 5日目までに脱水状態となって死亡した。3日齢以降は、接種後 4～5 日目頃から後肢を引きずるような歩行が現れ、ついには腰から後肢にかけて完全な麻痺に陥り、次第に衰弱して死亡する一連の病状を示した。後肢等の麻痺が片側性で、軽症の場合には、回復する例も観察された。また、生後15日齢を過ぎると死亡しなかった。

ウマから分離されたサカイ株は ddy系の乳のみマウスを生後11日齢まで死亡させると言われる〔58〕。今回、ICR系の乳のみマウスに分離株（85-109-1株）を接種すると、11日齢で50 %、13日齢で10 %の死亡率を示し、乳のみマウスの死亡する接種日齢が若干高い傾向を示した。しかし、供試マウスの系統に違いがあった関係も考慮すると、乳のみマウスに対する病原性には差の無いものと思われた。

異なった接種経路による乳のみマウスの死亡は脳内、腹腔内、経口および経鼻接種の順となり、全ての経路からも感染が成立した。この場合、接種ウイルス量が少なくなると、経口および経鼻接種より、脳内および腹腔内接種で

より高い感染性を認め、吸血昆虫による感染の優位性を示唆するものであった。組織内でのウイルスの出現と残存では、肺において最も早く検出され、脳では 9日間も残存しており、神経症状の出現に一致していた。

妊娠マウスに対する影響調査では、妊娠17日頃までにウイルスを接種すると、産子数の減少や生後まもなく発症して死亡する新生の乳のみマウスが現れ、母体内での胎子感染を強く疑われるものであった。

親マウスから乳のみマウスへの接触感染の調査では、親マウスにウイルスを接種してから、10%の乳のみマウスが発症して死亡した。しかも、生存したすべての乳のみマウスはHI抗体を保有しており、親マウスから乳のみマウスへの水平感染があったものとも考えられた。

泉対ら〔68〕によると、サカイ株は親マウスの授乳を介して乳のみマウスへ感染するとしており、今回の死亡した乳のみマウスも授乳を介して感染し、発症したものと思われた。

神奈川県下の GTV汚染状況について、本症の発生の見られた秦野市の養豚場と平塚市および伊勢原市の養豚場を対象に1986年および1987年の 2カ年抗体調査を実施した。調査地域の飼育頭数は約30,000頭で、全県下の約18%を占めており、小規模の子とり農場から中規模の一貫経営農場が、海岸線、水田、畑地、山間地に分散している。GTVに対する調査を行った対象地域全体の陽性農場は1986年の調査で57.6%, 1987年の調査では54.1%となり、いずれも半数以上の農場に陽性豚が検出された。陽性農場の地域別による割合では平塚市56.3%, 85.7%, 秦野市50.0%, 20.0%, 伊勢原市62.1%, 50.0%となり、1986年には3市とも50%以上の陽性農場があったのに対し、1987年には秦野市(20.0%)が低く、平塚市(85.7%)で高い傾向となった。藤崎ら

〔19〕が行った豚における日本脳炎、ゲタ、パルボウイルスに対するHI抗体保有状況調査によると、福島、栃木、茨城、千葉、東京の調査地では、豚日本脳炎の流行に先がけ、GTVの流行する傾向が見られるのに対し、愛知、広島、宮崎の調査地には流行を認めなかった。このことは、GTVの流行が地域によって異なることを示しており、今回の調査からは本県もGTVの感染を受ける地域であることが分った。また、2カ年間の調査総頭数373頭中のうち、127頭(34.1%)に抗体陽性豚を検出したが、1986年48.0%、1987年28.9%の成績を示し、GTVの流行は年度によって異なることが確められた。過去に実施されたブタ〔19,43,59〕、ウマ〔3〕のGTV抗体保有状況調査でも、調査した地域および年度により異なることが示唆されている。

1987年には陽性頭数の減少傾向を示した調査農場の中に、前年陰性であった農場の繁殖豚が陽転した例もあり、GTVは県下全域に流行しているものと想定される。1971年関東近県の初産豚および肉豚についての抗体調査では、80%以上の陽性率を示す地域が多いとされている〔19〕。今回の調査結果では、1986年に48.0%と1987年に29.3%となって予想外に低い陽性率であった。この差については年ごとの気象条件や自然環境および畜舎環境の変遷により、大きく左右されていると思われるが、他県で実施された近年の抗体調査〔59,61〕でも、同様に低い陽性率となっており、このことはGTVに対する抗体陰性豚が増加しているものと思われる。従ってGTV抗体陰性の妊娠豚から生れた子豚はあらゆる日齢の時期にGTVにさらされる機会が多くなって、新生豚を中心に病原性が明瞭に現れてきたものと考えられる。

本県におけるGTVの陽転の時期を把握するために、同一の未越夏豚を対象として追跡調査を行ったところ、1986年の検査では全て陰性であったが、同年

食肉処理場へ出荷した約 6カ月齢の肉豚についての調査では、9月に7.7%と11月に11.1%の陽性豚を検出した。

GTV の流行は媒介昆虫である蚊〔 8, 10, 54〕の活動期に一致して感染抗体も検出されており〔 19, 43 〕、媒介はキンイロヤブカが主体で、コガタアカイエカは従の関係にあると考えられ、キンイロヤブカの発生動向とも関係すると思われるが、今回は調査してないので不明である。しかし、著者らが病性鑑定した GTVによる発症事例や肉豚の追跡調査からは、感染の機会が過去の成績よりさらに遅くまで続いていることも推察された。したがって GTV に原因する子豚感染症の発生は、GTVの宿主域がウマ、ウシ、ニワトリなど幅広いために、常に感染源を抱えている実状と不顕性感染豚の減少による抗体陰性妊娠豚の増加を招くと、これらの母豚から生れた新生豚には GTV 感染の機会が多くなって、散発して発症することも十分推察でき、子豚の損耗防止のためにも油断できない疾病と考える。しかも最近、GTVは子豚ばかりでなく、妊娠豚における垂直感染による死・流産をおこすことも立証されており、抗体陰性豚の増加はその発生の増加も懸念される。

## V. 総括および結論

### 1、神奈川県下で発生した哺乳中の子豚のウイルス性疾患

1983年から1987年の5年間に、神奈川県下で確認した子豚のウイルス性疾患は豚オースキー病 16 件、豚日本脳炎 1件、GTV 感染症 2件、TGE 4 件およびPEV 感染症 1件であった。これらの疾病で発症した哺乳中の子豚から分離されたウイルスはADV 42株、JEV 2 株、GTV 6 株、TGEV 7株及びPEV 3 株であった。

### 2、豚のGTV 感染症発生の確認

GTV 感染症の見られた症例では、発生の時期が10月で、いずれも飼養頭数の少ない農場に発生した。また、発症は哺乳中の子豚に限られており、母豚には異常を認めなかった。発症した子豚の臨床症状は発熱、顎下および腹部に限局した浮腫が見られ、振せんおよび麻痺等の神経症状を伴っていた。解剖所見では浮腫部皮下の膠様浸潤とリンパ節の水腫が見られ、組織学的にはリンパ球の崩壊および壊死によるリンパ球の減少をリンパ節や脾で認め、各臓器の組織には部位により、水腫性の変化も見られた。

これら子豚の病原検索では、脳、扁桃、肺、肝臓、脾臓、腎臓および腸管等の臓器から、培養細胞に円形で顆粒状のCPE を示して増殖するウイルスが高率に分離された。

### 3、GTV のウイルス学的性状

分離ウイルスはIUDRの存在下で、その増殖が抑制されなかった。また、エ

ーテル、クロロホルム等の有機溶媒に感受性を示し、pH 3.0の溶液や 1 Mの  $MgCl_2$  存在下では50°Cで60分の加熱により不活化された。ウイルス粒子の大きさは孔径50 nm以下のメンブランフィルターを通過しなかった。生物学的性状ではGTV ハルナ株の免疫血清により、中和された。分離ウイルスはMDBK、BTc1、Vero、MA104、ESK、HmLu-1培養細胞にCPEを伴って良く増殖し、培養液中のウイルスはpH 6.0～6.2の領域でガチョウの赤血球に対する凝集抗原を含んでいた。分離ウイルスの代表株(85-109-1株)を無菌子豚に接種すると、接種後2時間経過した頃から舌の震えが見られるようになり、引続いて元気消失、沈うつ、全身の震え及びチアノーゼを引起こし、ひん死状態となって3日後に死亡した。死亡した子豚の脳、扁桃、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、腸管および血清等からウイルスが回収された。また、代表株を3日齢以内の乳のみマウスに接種すると、接種後3～5日で脱水状態となって死亡した。3日齢以上の乳のみマウスに接種すると、接種後4～5日で後肢を引きずる典型的な麻痺が現れ、次第に歩行不可能となり、この間に発育も著しく遅延してしまい、殆どが死亡した。しかし、麻痺の程度が軽い場合には次第に回復して生存するものもあった。妊娠マウスに対する病原性はウイルス接種後何等の異常を観察できない中で、妊娠16日以内の接種で、産子数が減少する傾向を認めた。また、分娩された乳のみマウスは生後2～3日で発症して死亡する例も見られた。

#### 4、GTV感染の血清疫学

生れて2日齢の新生子豚(1985年)および生後23日齢の哺乳中の子豚(1987年)に急性経過の症状を示して死亡させる疾病が発生し、死亡およびひん



死子豚の臓器からGTV が容易に分離された。このGTV を用いて発生豚群の抗体検査を行ったところ、豚群85-109については母豚に抗体の上昇と生存した子豚には高力価の抗体を確認した。豚群87-96 については母豚に抗体の上昇を認めなかったが、生存した子豚の経過血清中には、有意に上昇した抗体を検出した。

子豚のGTV 感染症が発生した地区を含み、小・中規模の一貫経営農場を対象としたGTV 抗体調査を 3市において 2カ年行った。その結果、調査農場の55.9 % (平均) が陽性豚を飼育しており、抗体の保有率は平均38.5 %であった。抗体の陽転時期を食肉処理場へ出荷された肉豚について調べてみると、9月と11月の出荷豚に確認された。

本論文の結論として1985年および1987年に発生した新生豚および子豚の神経症状を伴った急性の感染症はGTV 感染症であった。臨床症状は発熱、発赤、ふるえおよび浮腫であり、2症例ともに哺乳育成中の子豚に限られていた。発症した子豚の各臓器から分離したGTV はブタ、ウシ、サルおよびハムスター由来の培養細胞に良く増殖し、ガチョウの赤血球を凝集した。この分離ウイルスは乳のみマウスに対して病原性を持つとともにHPCD子豚に接種すると、野外で発症したものと同一の臨床所見が現れて死亡した。GTV 感染症の発生した豚群のペアー血清の抗体検査により、GTV が本症に関与していることを確認した。神奈川県下の 3市地域の抗体調査では半数以上の養豚場でGTV の抗体保有豚を飼育しており、全調査頭数の38.9 %に陽性豚を検出した。このことから、本県はGTV の流行する地域であることを確認した。

## VI 謝 辞

稿を終了するに当り、本論文の作成に終始御指導を賜った麻布大学、獣医学部、微生物学第二講座教授、清水武彦博士、微生物学第二講座助教授、原元宣博士、同微生物学第一講座教授、田淵 清博士、病理第二講座教授、高橋令治博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、分離ウイルス同定の助言およびゲタウイルス感染症の再現試験にご協力いただき、本症の解明に御指導いただきました大阪府立大学農学部、獣医学科、獣医微生物学教授、川村 齊博士、並びに、本研究の機会と御援助を賜った神奈川県家畜保健衛生所および家畜病性鑑定所職員の方々に深甚なる謝意を表します。

## Ⅶ. 参 考 文 献

- [ 1 ] 阿部正八郎・二宮秀生・吉武 理(1988). 子豚下痢由来大腸菌の病原性および薬剤耐性調査. 獣医畜産新報 807, 31-34.
- [ 2 ] Andrew, G. D., Vi-Chuan, C., Ronald, G. W. and Levis, B. H. (1972). Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice. *J. Infect. Dis.* 125, 407-411.
- [ 3 ] 秋山 綽 (1980). ウマのゲタウイルス感染症. 日獣会誌 33, 567-581.
- [ 4 ] Cartwright, S. F., Huck, R. A. (1967). Virus isolated in association with herd infertility, Abortion and stillbirth in pigs. *Vet. Rec.* 81, 196-197.
- [ 5 ] Buxton, A. and Fraser, G. (1977). *Animal microbiology*. Blackwell scientific publication LTD. Oxford, 641-665.
- [ 6 ] Cowan, S. T. (1975). 医学細菌同定の手引き. 第二版. 近代出版, 東京, 143-148.
- [ 7 ] Chanas, A. C., Johnson, B. K. and Simpson, D. I. H. (1977). A comparative study of related alphaviruses. A naturally occurring model of antigenic variation in Getah subgroup. *J. Gen. Virol.* 35, 455-462.
- [ 8 ] Chumakov, M. P., Moshkin, A. V., Andreera, E. B. (1974). Isolation of five Getah virus strains from mosquitoes in the southern Amur region. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69, 35-38.
- [ 9 ] Doherty, R. L. (1972). Arboviruses of Australia. *Aust. Vet. J.* 48, 172-180.

- [ 1 0 ] Doherty, R. L., Caley, J. G., Makerras, M. J. and Marks, E. M. (1963). Studies of arthropod-borne virus infection in Queensland. III. Isolation and characterization of virus strains from wild caught mosquitoes in north Queensland. *Austral. J. exp. Biol.* 41, 17-40.
- [ 1 1 ] Doherty, R. L., Gorman, B. M., Whitehead, R. H. and Caley, J. D. (1966). Studies of arthropod-borne virus infections in man and other animals. *Aust. J. exp. Biol.* 125, 741-747.
- [ 1 2 ] Earley, E., Deralta, P. H. and Johnson, K. M. (1967). A plaque neutralization method for arboviruses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 125, 741-747.
- [ 1 3 ] 藤崎優次郎・池尾辰馬・三浦康男・林 重美・森脇 正(1981). 神経症状を示した初生豚からの豚エンテロウイルスの分離. 家畜衛試研究報告 82, 13-18.
- [ 1 4 ] 福所秋雄・清水実嗣・久保正法・難波功一・清水悠紀臣・紺野 悟・鈴木和枝・大滝俊彦(1981). わが国で初めて発生した豚のオーエスキー病. II. ウイルス分離. 家畜衛試研究報告. 82, 5-11.
- [ 1 5 ] 藤崎優次郎・豚の日本脳炎(1971). 家畜衛試研究報告 62, 16-24.
- [ 1 6 ] 藤崎優次郎(1975). 豚パルボウイルス感染と死流産. I. 死流産胎児からのウイルス分離. *ウイルス* 25, 25-32.
- [ 1 7 ] 藤崎優次郎・杉森 正・木村 功・根本和彦・小菅 清・羽生 章・浜田 洋(1975). 豚パルボウイルス感染と死流産. II. 血清疫学的調査. *ウイルス* 25, 33-41.

- [ 18 ] 藤崎優次郎・守本富昭・杉森 正・鈴木 博(1975). 豚パルボウイルス豚感染試験. 家畜衛試研究報告 71, 8-14.
- [ 19 ] 藤崎優次郎・守本富昭・寺崎セイ・他(1972). 豚のウイルス性死産に関する研究. 豚における日本脳炎, ゲタ, パルボウイルスに対するHI抗体保有状況. 日獣誌 34, 付録 32-33.
- [ 20 ] Hagan, W. A. (1976). 家畜感染症. 上巻. 医歯薬出版, 東京, 129-135.
- [ 21 ] Hagan, W. A. (1976). 家畜感染症. 下巻. 医歯薬出版, 東京, 1276-1293.
- [ 22 ] 堀内貞治・川村 齊・関 令二(1969). 鶏病図説. 日本畜産振興会, 東京, 396-398.
- [ 23 ] 今田喬土(1978). 染色法のすべて. 月刊 Medical technology 編. 医歯薬出版, 東京, 9-93.
- [ 24 ] 伊藤裕和・岡田正二・杉山弘行・近藤郁夫(1988). 流産および死亡を示した豚のClostridium novyi A型感染の集団発生例. 獣医畜産新報 805, 19-23.
- [ 25 ] 小宮正文(1962). 図説血球の見方. 南山堂, 東京, 101-181.
- [ 26 ] 小久江栄一(1988). 子豚の下痢の病態生理. 獣医畜産新報 807, 5-7.
- [ 27 ] Konowalchuk, J., Speirs, J. I. and Starvic, S. (1977). Veroreponse to a cytotoxin of Esherichia coli infection and immunity, Ame. Soc. Mic. 18(3), 775-779.
- [ 28 ] 熊谷哲夫・波岡茂郎・丹羽太左衛門・笹原二郎(1977). 豚病学. 近代出版, 東京, 113-115.
- [ 29 ] 国立予防研究所学友会 (1973). ウイルス実験学. 総論. 丸善, 東京.

135, 297-329, 480.

- [ 3 0 ] 国立予防研究所学友会 (1976). ウイルス実験学. 各論. 丸善, 東京.  
132-146.
- [ 3 1 ] Sashi, B. M., Sukanta, K. D. (1981). 獣医ウイルス学. 文永堂, 東京,  
1-39.
- [ 3 2 ] Kumanomido, T., Fukunaga, Y., Ando, Y., Kamada, M., Imagawa, H., Wada,  
R., Akiyama, Y., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Ogura, N. and Yamamoto, Y.  
(1986). Getah virus isolation from mosquitoes in an enzootic  
area in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49, 1135-1140.
- [ 3 3 ] Kumanomido, T., Wada, R., Kanemaru, T., Kamada, M., Hirasawa, K. and  
Akiyama, Y. (1988). Clinical and virological observation on sw-  
ine experimentally infected with Getah virus. *Vet. Mic. Biol.* 16,  
295-301.
- [ 3 4 ] Leman, A. D., Straw, B., Glog, R. D., Mengeling, W. L., Penny, R. H. C.,  
School, E. (1986). DISEASE OF SWINE . SIXTH EDITION. Iowa state  
university press. Ames, Iowa. U. S. A, 224-236, 274-289.
- [ 3 5 ] 守本富昭 (1971). 豚のエンテロウイルスとその感染. 家畜衛試研究  
報告 62, 25-39.
- [ 3 6 ] 三輪谷俊夫・神中 寛・竹田美文・工藤泰雄 (1981). コレラ菌と毒  
素原性大腸菌の検査法. 日本細菌学会教育委員会編. 菜根出版, 東  
京, 83-86.
- [ 3 7 ] 睦見 真・塚尾吉実 (1972). 浮腫病豚における好酸球数とヒスタミ  
ン量. 家畜衛試研究報告 65, 17-21.

- [ 38 ] 松山達夫・中村忠義・砂盃圭子・大谷 明・小林正美(1968). ブタからのA群アルボウイルスの分離について. ウイルス 18(1), 11-14.
- [ 39 ] 両角吉三・泉対 博・甲野雄次(1980). ゲタウイルスの牛接種試験および野外牛の中和抗体保有状況. 家畜衛試研究報告 (80), 1-4.
- [ 40 ] Matsuyama, T., Oya, A., Ogata, T. (1960). Isolation of arboviruses from mosquitoes collected at line stock pens in 1959. Jap. J. M. Sc. Biol. 13, 191-198.
- [ 41 ] 中沢宗生(1988). 細菌による豚の下痢症. 獣医畜産新報 807, 8-11.
- [ 42 ] Nakazawa, M., Sugimoto, C., Isayama, Y., Kashiwazaki, M. (1986). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from piglets with neonatal and post-weaning diarrhea in Japan. Vet. Micro. Biol. 13, 291-300.
- [ 43 ] 中村忠義・砂盃圭子・松本陸子・松山達夫・大谷 明・奥野 剛(1967). A群節足動物媒介ウイルスゲタのブタにおける抗体の推移と各種動物の抗体保有状況. 日本公衛試 14(5), 569-574.
- [ 44 ] 小野寺正泰・鶴田 実・須藤信也・新関博夫・斉藤文夫・種市 淳(1981). わが国で初めて発生した豚のオーエスキー病. I. 発生状況. 家畜衛試研究報告 82, 1-4.
- [ 45 ] 小野 豊(1963). 家畜病理学総論. 朝倉書店, 東京, 26-28.
- [ 46 ] 清水武彦・川上善三・福原 進・松本 稔(1955). 妊娠豚の日本脳炎ウイルスによる実験的死産. 家畜衛試研究報告 30, 51-66.
- [ 47 ] 杉森 正・守本富昭・藤崎優次郎・菅原茂美・富島 静・緒方宗雄(1974). 豚の死流産実態調査. III. 日本脳炎流行期における妊娠開

始期と妊娠日数と死流産発生. 日獣会誌 27, 282-285.

- [ 48 ] Schalm, O. W., Jain, N. C., Carroll, E. T. (1975). 獣医血液学 (I). 医歯薬出版, 東京, 230-341.
- [ 49 ] Schalm, O. W., Jain, N. C., Carroll, E. T. (1975). 獣医血液学 (II). 医歯薬出版, 東京, 585-591.
- [ 50 ] Schalm, O. W., Jain, N. C., Carroll, E. T. (1975). 獣医血液学 (III). 医歯薬出版, 東京, 690-704.
- [ 51 ] 鈴木祥一郎・上野一恵(1979). 臨床嫌気性菌マニュアル. ニッスイライブラリー (6). 東京, 37-48.
- [ 52 ] 添川正夫・梁川 良・中瀬安清・松前昭廣・森田千春(1982). 獣医微生物免疫学. 養賢堂, 東京, 212-213.
- [ 53 ] Shope, R. E. and Anderson, S. G. (1972). The virus aetiology of epidemic exanthem and polyarthrits. *M. J. Aust.* 1, 156-158.
- [ 54 ] Simpson, D. I. H., Hilary, J. W., Platt, G. S., Bowen, E. T. W., Hill, M. N., Sumtra, Kamath, Bendell, P. J. E. and Heathcote, O. H. U. (1975). Arbovirus infection in Sarawak, october. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 69, 35-38.
- [ 55 ] Sherer, W. F., Funkenbusch, M., Buscher, E. L. and Izumi, T. (1962). Sagi-yama virus, a new group arthropod-bone virus from japan. I. Isolation, immunologic classification and ecologic observations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11, 255-268.
- [ 56 ] 清水実嗣(1988). 豚のウイルス性下痢. 獣医畜産新報 807, 12-16.
- [ 57 ] Sentsui, H. and Kono, Y. (1980). An epidemic of Getah virus inf-



ection among racehorses. Isolation of the virus. Res. Vet. Sci. 29, 157-161.

- [ 5 8 ] Sentsui, H. and Kono, Y. (1980). Pathogenicity of Getah virus for mice. Natl. Inst. Anim. Health Q(JPN). 21, 7-13.
- [ 5 9 ] 白砂 勇・田中義道・渡辺公一(1979). 豚パルボウイルスおよびゲタウイルスの抗体保有状況調査. 獣医畜産新報 693, 232-234.
- [ 6 0 ] Sanderson, C. J. (1969). A serologic survey of Queensland cattle for evidence of arbovirus infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18, 433-439.
- [ 6 1 ] 豊満義邦(1988). ゲタウイルス感染による新生子豚の死亡例. 家畜衛生週報 2010, 234.
- [ 6 2 ] Wada, R., Kamada, M., Fukunaga, Y., Ando, Y., Kumanomido, T., Imagawa, H. and Akiyama, Y. (1982). Equine Getah virus infection. Pathological study of horses experimentally infected with the MI-110 strain. Jpn. J. Vet. Sc. 44, 411-418.
- [ 6 3 ] Wallis, C. and Melnic, J. L. (1962). Discussion and preliminary reports. Virology 16, 504.
- [ 6 4 ] 山極三郎(1956). 獣医病理学総論. 文永堂, 東京, 123-125.

表-1 神奈川県下における豚の飼育頭数

地 域 \ 年	1983	1984	1985	1986	1987
横浜地区	35,664	35,425	38,245	33,533	31,486
中 "	35,136	34,906	29,818	30,532	30,046
湘南 "	30,503	29,759	26,346	27,784	28,719
北相 "	17,801	17,727	18,009	19,014	17,492
県央 "	66,131	64,240	66,510	58,527	55,653
足柄 "	2,993	2,792	3,762	3,043	2,859
県下頭数	188,228	184,849	182,690	172,433	166,255
飼育戸数	958	874	817	715	604
頭数/戸	196.5	211.5	223.6	241.2	275.3

表-2 繁殖豚の品種別飼育頭数

品種 \ 年	1983	1984	1985	1986	1987
ランドレース	1,931	2,021	2,056	1,973	1,710
ハンプシャー	222	164	193	161	133
大ヨークシャー	973	1,073	1,340	1,319	1,313
デュロック	1,058	925	727	653	440
中ヨークシャー	24	21	30	35	25
その他	155	128	94	49	78
雑 種	17,193	16,906	16,901	14,338	13,439
合 計	21,556	21,238	21,341	18,528	17,138

その他：パークシャー種，チェスターホワイト種，サドルバック種  
桃園種

表-3 豚病性鑑定依頼状況

年度 検査	1983		1984		1985		1986		1987	
	件	頭	件	頭	件	頭	件	頭	件	頭
哺乳子豚	9	78	12	32	23	123	13	53	8	23
離乳 "	14	140	11	39	28	323	16	93	28	172
繁殖母豚	29	98	15	50	9	48	11	31	6	29
臓器検査	52	316	38	121	60	494	40	177	42	224
血清検査	54	3,231	138	16,136	244	16,985	232	12,723	228	9,921
合計	106	3,547	176	16,257	304	17,479	272	12,900	270	10,145

表-4 豚病性鑑定症状別依頼状況

年度 症状	1983		1984		1985		1986		1987	
	件	頭	件	頭	件	頭	件	頭	件	頭
神経	1	2	6	16	4	39	2	20	-	-
呼吸器	4	25	3	5	13	252	4	56	9	90
消化器	18	199	7	33	15	92	8	32	7	56
急死	11	14	15	44	22	66	19	41	16	35
異常産	17	75	5	21	6	45	6	26	6	29
その他	1	1	2	2	-	-	1	2	4	14
合計	52	316	38	121	60	494	40	177	42	224

表-5 異常産胎子および哺乳中の子豚の病性鑑定結果(件)

病名 \ 年度	1983	1984	1985	1986	1987
大腸菌症	3	3	1	-	-
伝染性胃腸炎	1	-	2	1	-
パルボウイルス感染症	1	1	-	-	-
トキソプラズマ病	3	-	-	-	-
萎縮性鼻炎	1	-	-	-	-
オーエスキー病	-	1	8	7	-
髄膜脳炎	-	2	2	1	1
日本脳炎	-	1	-	-	-
壊死性腸炎	-	1	-	-	1
胸膜性肺炎	-	-	1	-	1
漿液性肺炎	-	-	2	2	-
エンテロウイルス感染	-	-	1	-	-
ゲタウイルス感染症	-	-	1	-	1
コクシジウム症	-	-	-	1	-
滲出性皮膚炎	-	-	-	-	1
脳脊髄血管症	-	-	-	-	1
不明	17	8	11	7	8
合計	26	17	29	19	14

表-6 異常産胎子および哺乳中の子豚からのウイルス分離状況

項目\年度	1983	1984	1985	1986	1987
発生頭数	1,202	106	402	445	341
検査頭数	59	38	81	60	37
分離ウイルス および頭数	TGEV. 5.	ADV. 4. JEV. 2.	ADV. 19. GTV. 4.	ADV. 19. TGEV. 2. PEV. 3.	GTV. 2.
分離陰性	54	32	58	36	35

TGE: Transmissible gastroenteritis virus. ADV: Aujeszky disease virus. JEV: Japanese encephalitis virus. GTV: Getah virus. PEV: Porcine enterovirus.

表-7 ゲタウイルスを分離した豚群の臨床症状、ウイルス分離  
および抗体調査

発生 豚群	発生 年度	飼育 頭数	発生 頭数	発生 日齢	発熱 鼻漏 発咳	呼吸 速迫 震え	浮腫 麻痺 下痢	採材 頭数	分離 株数	対血清で 抗体上昇 ウイルス
85- 109	1985	13	12	2	+ - +	+  +	+ + +	4	4	G T V
87- 96	1987	11	9	23	+ - +	+  +	+ + -	2	2	G T V

表-8 血液検査所見

血 球 / 発症子豚	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
赤血球数 (万 / $\mu$ l)	534	720	528	660
白血球数 (千 / $\mu$ l)	6.6	3.4	7.8	7.4
好酸球 (%)	—	—	—	1.5
好塩基球 (〃)	—	—	—	—
前骨髓, 骨髓球 (%)	8.5	33.5	16.5	—
〔好中球〕				
桿状核 (〃)	11.0	18.5	54.0	5.0
分葉核Ⅱ (〃)	4.5	6.5	12.5	10.5
〃Ⅲ (〃)	1.0	0.5	—	4.5
〃Ⅳ (〃)	—	—	—	0.5
リンパ球 (〃)	72.5	38.0	14.5	72.5
リンパ芽球 (〃)	1.5	2.5	2.5	—
異形リンパ球 (%)	—	—	—	1.5
単 球 (〃)	1.0	1.0	—	4.0

表-9 解剖検査所見

項目/豚群	85 - 109					87 - 96	
	1	2	3	4	5	1	2
子豚 No.							
日 齡	3	3	3	3	3	23	23
体 重 (g)	1,185	1,085	965	835	980	9,000	7,900
検体の状況	死 亡	死 亡	死 亡	死 亡	死 亡	死 亡	ひん死
外部の所見	-	顔面腫 脹	-	顔面腫 脹	-	顎下腫 脹	顎下腫 脹
皮 下 織	-	顎下膠 様浸潤	-	顎下膠 様浸潤	-	顎下, 腰部, 下腹部 膠様浸 潤	顎下, 腰部, 下腹部 膠様浸 潤
リンパ節	水 腫	-	水 腫	-	-	水 腫	水 腫
脳	-	-	-	-	-	血管の 充血	血管の 充血
心 臓	-	-	-	-	-	心のう 水の貯 留	心のう 水の貯 留
肺	-	辺縁部 の肝変 化	水 腫	辺縁部 の肝変 化	辺縁部 の肝変 化	うっ血 及び水 腫	うっ血 及び水 腫
肝 臓	-	-	-	-	-	-	退 色
脾 臓	-	-	-	-	-	-	-
腎 臓	-	点状出 血	点状出 血	点状出 血	-	暗紫色	退 色
胃	-	-	-	-	-	-	潰瘍形 成
腸 管	菲 薄	-	菲 薄	-	菲 薄	-	菲 薄

表-10 細菌検査成績 (大腸菌の分離成績)

豚 群	85-109					87-96	
	1	2	3	4	5	1	2
脳	—	—	—	$10^3$ *	—	—	$10^1$
肺	—	—	$10^2$	$10^8$	—	—	—
肝 臓	$10^3$	—	$10^3$	$10^3$	—	—	—
脾 臓	—	—	—	—	$10^1$	—	—
腎 臓	—	—	—	$10^8$	—	—	$10^5$
胃	—	—	—	—	—	$10^4$	$10^5$
十二指腸	—	—	—	—	—	$10^5$	$10^6$
空 腸	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^7$	$10^6$
回 腸	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$	$10^8$

\* CFU/g



表-11 分離大腸菌のエンテロトキシン産生能

大腸菌の 由来子豚	エンテロトキシン					
	S	T	L	T	V	T
85-109 - 1	-		-		.	
"    2	-		-		.	
"    3	-		-		.	
"    4	-		-		.	
"    5	-		-		.	
87- 96 - 1	-		-		-	
"    2	-		-		-	

S T ; Heat stable enterotoxin, L T ; Heat labile enterotoxin

V T ; Toxic to Vero cells

表-12 発症子豚からのウイルス分離 (log TCID<sub>50</sub>/g)

豚群\材料	脳	扁桃	肺	肝臓	脾臓	腎臓	腸管
85-109-1	5.0	4.5	4.7	.	.	3.7	2.0
” 2	4.2	4.7	2.7	.	.	4.5	2.5
” 3	5.0	4.7	6.2	.	.	4.7	<0.5
” 4	5.2	4.7	5.0	.	.	5.2	3.2
87-96-1	2.5	3.0	2.0	3.0	3.0	2.0	.
” 2	3.5	4.0	3.0	4.5	4.0	2.5	.

表-13 熱安定性試験 (log TCID<sub>50</sub>/0.1ml)

感作温度	時間	50°C 60分			-20°C 60分		
		I	II	III	I	II	III
ウイルス	対照						
JaG-39株*	5.50	<0.5	<0.5	<0.5	2.00	4.25	5.00
YS-81株**	6.75	<0.5	2.75	3.00	2.75	5.75	5.75
85-109-1株	7.00	<0.5	4.00	3.75	6.00	6.50	6.50

I : 1M MgCl<sub>2</sub> II : イーグル MEM III : 精製水

\* : アカバネ病ウイルス \*\* : オーエスキー病ウイルス

表-14 濾過試験 (log TCID<sub>50</sub> /0.1ml)

ウイルス	対 照	200nm	100nm	50nm	25nm
85-109-1株	6.50	6.50	6.50	<0.50	<0.50

表-15 エーテルおよびクロロホルムに対する感受性(log TCID<sub>50</sub> /0.1ml)

ウイルス	対 照	エーテル (20%)	クロロホルム (20%)
JaG-39株*	4.50	<0.50	<0.50
YS-81 株**	6.25	<0.50	<0.50
85-109-1株	6.50	<0.50	<0.50

\*: アカバネ病ウイルス \*\* : オーエスキー病ウイルス

表-16 pHの影響(log TCID<sub>50</sub> /0.1ml)

ウイルス	対照 (pH7.2)	pH 7.0	pH 3.0
85-109-1	5.5	5.5	2.0
85-109-2	6.0	5.5	1.5

表-17 5-iodo-2-deoxyuridine(IUDR) の影響

ウイルス	I U D R	感染価 (log TCID <sub>50</sub> /0.1ml)
JaG-39株*	+	6.00
	-	6.25
YS-81株**	+	2.50
	-	6.25
85-109-1株	+	7.00
	-	7.00

\*: アカバネ病ウイルス \*\* : オーエスキー病ウイルス

表-18 交差中和試験

血清	ウイルス	
	85-109-1株	ハルナ株
85-109-1株	前血清	0.2 a)
	後血清	3.4
ハルナ株	前血清	-0.1
	後血清	2.8

a) 中和指数

表-19 各種動物血球に対する凝集性

pH	ウイルス	動物					
		ウマ	ウシ	ガチョウ	ニワトリ	モルモット	マウス
6.0	85-109-1	<2.0	a) <2.0	16.0	<2.0	<2.0	<2.0
	87-96-1	"	"	64.0	"	"	"
6.2	85-109-1	"	"	2.0	"	"	"
	87-96-1	"	"	2.0	"	"	"
6.4	85-109-1	"	"	<2.0	"	"	"
	87-96-1	"	"	"	"	"	"
6.6	85-109-1	"	"	"	"	"	"
	87-96-1	"	"	"	"	"	"
6.8	85-109-1	"	"	"	"	"	"
	87-96-1	"	"	"	"	"	"
7.0	85-109-1	"	"	"	"	"	"
	87-96-1	"	"	"	"	"	"

a); H A 価 (倍)

表-20 分離ウイルスの血球凝集性に対するpHおよび反応温度の影響

pH	ハルナ 株		85-109-1株		87-96-1 株	
	4.0 °C	25.0°C	4.0 °C	25.0°C	4.0 °C	25.0°C
6.0	256.0	128.0	64.0	32.0	128.0	64.0
6.2	64.0	<2.0	32.0	<2.0	128.0	<2.0
6.4	<2.0	〃	<2.0	〃	<2.0	〃
6.6	〃	〃	〃	〃	〃	〃
6.8	〃	〃	〃	〃	〃	〃
7.0	〃	〃	〃	〃	〃	〃

\* : H A 価 (倍)

表 - 2 1 85-109-1株の各種培養細胞における増殖性

培 養 細 胞	ウイルス( 85-109-1株 )
M D B K	6 . 1 6*
B T c 1	5 . 2 5
V e r o	6 . 3 2
M A 104	7 . 1 6
E S K	6 . 4 1
Hm Lu-1	7 . 0 7

\* ; log TCID<sub>50</sub>/0.1ml

表-22 85-109-1株のHmLu-1細胞での増殖性

時 間	85-109-1株			ハルナ株*			YS-81株**		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	<0.50	<2.0	-	<0.50	<2.0	-	<0.50	.	-
2	"	"	-	"	"	-	"	.	-
4	2.25	"	-	2.75	"	-	"	.	-
6	3.75	"	+	3.75	"	+	"	.	-
18	6.75	"	+	7.25	"	+	1.75	.	+
24	6.75	4.0	+	8.00	2.0	+	2.75	.	+
48	7.00	64.0	+	8.00	32.0	+	5.00	.	+
72	6.50	64.0	+	6.75	32.0	+	5.50	.	+
96	5.75	32.0	+	5.75	8.0	+	6.75	.	+

I : log TCID<sub>50</sub> / 0.1ml    II : HA価 (倍)    III : 蛍光抗原

\* : ゲタウイルス    \*\* : オーエスキー病ウイルス



表-23 HI反応における85-109-1株とハルナ株との相関性

区分	ウイルス	調査数	H I 抗体価*															
			<1.0	1.0	1.3	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0				
未經産豚	85-109-1株	107	100	1	4			1					1					
	ハルナ株	107	100	1	3	1		1					1					
	85-109-1株	93	46					3	8	19	9	4	3	1				
經産豚	ハルナ株	93	46					3	11	20	7	2	2	2				
	85-109-1株	200	146	1	4			4	8	19	9	5	3	1				
	ハルナ株	200	146	1	3	1		4	11	20	7	3	2	2				
合計																		

\* :  $\log_{10}$

表-24 85-109-1株の1日齡乳のみマウスに対する病原性

ウイルス	死亡率	死亡日数	平均死亡日数	親マウスの H I 抗体価
$10^{-2}$ *	10/10	3 ~ 4	3.3	8 0
$10^{-3}$	10/10	2 ~ 3	2.6	1 6 0
$10^{-4}$	10/10	2 ~ 3	2.9	8 0
$10^{-5}$	10/10	3 ~ 6	4.0	1 6 0
$10^{-6}$	10/10	3 ~ 6	4.1	4 0
$10^{-7}$	5/10	3 ~ 7	5.0	2 0
$10^{-8}$	0/10	—	—	<1 0
$10^{-9}$	0/10	—	—	<1 0

\* : 脳内接種 10 $\mu$ l/匹

表-25 日齢の異なった乳のみマウスに対する病原性

日齢*	死亡率	平均死亡日数	抗体陽性率	平均HI抗体価
1	10/10	4.2	—	—
3	10/10	4.5	—	—
5	10/10	7.1	—	—
7	10/10	10.0	—	—
9	9/10	10.9	100(1/1)	20.0
11	5/10	10.8	100(5/5)	26.4
13	1/10	10.0	100(9/9)	21.6
15	0/10	—	100(10/10)	18.7

\* 脳内接種 : 100 TCID<sub>50</sub>/匹

表-26 接種経路別による乳のみマウスの病原性

接種経路	ウイルス量	死亡率	平均死亡日数	平均HI抗体価
I C	$10^1$ *	9 / 10	4.1	< 10.0
	$10^2$	10 / 10	2.9	—
I P	$10^1$	7 / 10	4.9	15.9
	$10^2$	10 / 10	3.9	—
I N	$10^1$	0 / 10	—	< 10.0
	$10^2$	2 / 10	4.0	11.2
O L	$10^1$	0 / 10	—	< 10.0
	$10^2$	7 / 10	5.0	12.6

\* : 接種ウイルス量 (力価)  $TCID_{50}$

表-27 死亡した乳のみマウスからのウイルス回収

臓器名	例数	ウイルス量(TCID <sub>50</sub> /g)
脳	3	$10^{7.4}$ ( $10^{6.6} \sim 10^{8.0}$ )
心臓	"	$10^{8.7}$ ( $10^{7.5} \sim 10^{9.8}$ )
肺	"	$10^{8.3}$ ( $10^{6.6} \sim 10^{9.6}$ )
肝臓	"	$10^{8.2}$ ( $10^{6.9} \sim 10^{9.7}$ )
脾臓	"	$10^{8.3}$ ( $10^{7.2} \sim 10^{9.0}$ )
腎臓	"	$10^{7.7}$ ( $10^{6.9} \sim 10^{8.7}$ )
腸管	"	$10^{7.1}$ ( $10^{6.2} \sim 10^{8.1}$ )
筋肉	"	$10^{9.0}$ ( $10^{7.3} \sim 10^{10.0}$ )

表-28 乳のみマウスの接触感染

親マウスNo.	1 8		2 0	
項目/区分	接 種	無接種	接 種	無接種
供 試 数	5	5	4	4
死 亡 率	5 / 5	0 / 5	4 / 4	0 / 4
平均死亡日 数	5.0	—	6.0	—
抗体陽性率	—	2/5	—	3/5
平均抗体価	—	1 0	—	1 0
親マウスの 抗体価	< 1 0		4 0	

表-29 親マウスから乳のみマウスへの感染

項目\親マウスNo.	2 2	2 4
接種経路	腹腔内	腹腔内
乳のみマウス数	1 0	1 0
死亡率	0(0/10)	20(2/10)
死亡日数	—	3.0
乳のみマウスの 抗体陽性率	100(10/10)	100(8/8)
平均H I 抗体価	18.7	26.0
親マウスのH I 抗体価	40.0	40.0

表-30 妊娠マウス接種試験 (I)

項目 \ ウイルス	85-109-1株	ハルナ株
接種数 (匹)	7.0	5.0
産子数 (〃)	57.0	53.0
平均産子数 (〃)	8.1	10.6
乳のみマウスの死亡数 (〃)	13.0	1.0
死亡率 (%)	22.8	1.9

表-31 妊娠マウス接種試験 (II)

妊娠日数	5	9	11	13	16	17	18	19	20
接種数	1	1	4	2	3	1	1	5	1
産子数	3	6	30	16	14	8	12	54	14
平均産子数	3.0	6.0	7.5	8.0	4.7	8.0	12.0	10.8	14.0
生後死亡数	0	0	1	4	9	3	1	4	1
死亡率	0.0	0.0	3.3	25.0	64.3	37.5	8.3	7.4	7.1



表-32 子豚への接種試験（臨床症状）

子豚 No. 日齢	* 接種経路	接種後日数				
		1	2	3	4	5
1 5	経口	-**	-	-	-	-
2 "	経口	-	-	-	-	-
3 "	筋肉	++	++	鑑定殺		
4 "	筋肉	++	+++	死亡		
5 "	筋肉	++	-	-	-	鑑定殺
6 "	経口	-	+	-	-	鑑定殺
7 "	筋肉	++	+++	死亡		
8 "	筋肉	+++	鑑定殺			
9 18	筋肉	+++	鑑定殺			

\* :  $10^{5.5}$  PFU/ml/頭

\*\* : 臨床症状, - ; 陰性, + ; 軽度, ++ ; 中度, +++ ; 重度

表-33 子豚への接種試験（ウイルスの回収）

子豚 No.		3	4	5	6	7	8	9
接種	経路	筋肉	筋肉	筋肉	経口	筋肉	筋肉	筋肉
大	脳	3.0*	3.0	—	—	3.3	3.1	1.8
小	脳	3.4	3.0	—	—	3.2	3.2	1.8
顎	下腺	3.2	2.0	—	—	2.2	2.5	1.0
扁	桃	4.1	4.4	1.7	2.2	3.7	4.0	1.2
	肺	2.7	3.3	—	—	4.0	3.2	1.5
心	臓	2.9	3.0	—	—	3.2	3.4	—
肝	臓	3.3	3.8	—	—	4.2	3.9	2.0
脾	臓	4.5	5.4	—	—	5.6	5.2	3.0
膵	臓	2.7	2.5	—	—	3.1	3.9	—
腎	臓	3.5	3.4	—	—	3.0	3.5	1.4
副	腎	4.3	4.9	—	—	4.4	3.9	2.3
小	腸	4.3	3.3	—	—	3.7	4.9	—
直	腸	3.0	2.7	2.7	—	3.2	4.5	0.7
鼠径	リンパ	3.1	3.2	—	2.2	4.3	3.7	3.0
血	清	4.5	/	—	—	/	5.0	3.4

\* : log PFU/ml

表-34 発生豚群の抗体調査

豚 群		85-109		87-96	
		中和抗体価	III抗体価	中和抗体価	III抗体価
母豚	前血清	<1 *	<10	.	<10
	後血清	490	320	.	<10
発症 子豚 血清	1	<1	<10	.	<10
	2	.	.	.	<10
回復 子豚 血清	1	407	320	.	160
	2	490	640	.	320
	3	490	640	.	160
	4	320	320	.	160

\* : 50% プラック減少価

表-35 G T V 抗体陽性農場の分布状況

調査年・ 調査市\項目	1986		1987		陽性率 (%)	
	調査戸数	陽性戸数	調査戸数	陽性戸数	1986	1987
平塚市	16	9	21	18	56.3	85.7
秦野市	14	7	15	3	50.0	20.0
伊勢原市	29	18	38	19	62.1	50.0
計	59	34	74	40	57.6	54.1

表-36 G T V 抗体陽性豚の分布状況

調査年・ 調査市\項目	1986		1987		陽性率 (%)	
	調査頭数	陽性頭数	調査頭数	陽性頭数	1986	1987
平塚市	36	13	124	35	36.1	28.2
秦野市	26	14	40	3	53.9	7.5
伊勢原市	38	21	109	41	55.3	37.6
計	100	48	273	79	48.0	28.9

表-37 G T V 抗体価の産次別分布状況

調査項目 ＼年 産次＼	検査頭数		陽性頭数		陽性率		平均抗体価	
	1986	1987	1986	1987	1986	1987	1986	1987
1	19	37	6	2	31.6	5.4	645	223
2	17	27	9	6	52.9	22.2	1,288	645
3	21	32	8	10	38.1	31.3	645	457
4	14	27	7	10	50.0	37.0	870	741
5	10	18	7	12	70.0	66.7	426	794
6	5	17	4	3	80.0	17.7	537	100
≧ 7	7	63	6	23	85.7	36.5	724	489
計	93	221	47	66	50.5	29.9	691	407

\* : %    \*\* : HI抗体価

表-38 未越夏豚の G T V-III 抗体陽転状況(1986)

採血時期 ＼ (月) 調査項目	5	6	7	8	9	10	11	12
自家育成 豚陽性率	* 0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
屠場出荷 豚陽性率	** —	—	0/47	0/44	3/39	0/26	2/18	0/17

\* : 離乳時より追跡調査    \*\* : 生後 6カ月齢の肉豚



写真 -1 豚群 87-96 発症子豚  
起立不能と顎下部の腫脹



写真 -2 豚群 87-96 発症子豚  
顎下部の腫脹



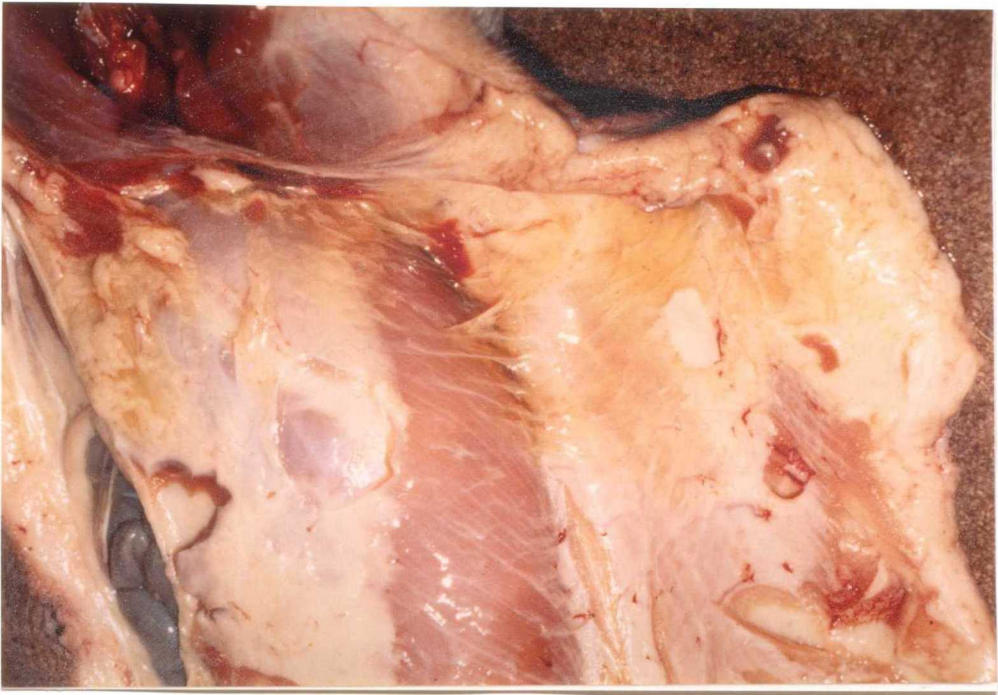


写真 -3 豚群 87-96 死亡子豚  
皮下織の膠様浸潤



写真 -4 豚群 87-96 死亡子豚  
下顎リンパ節の水腫



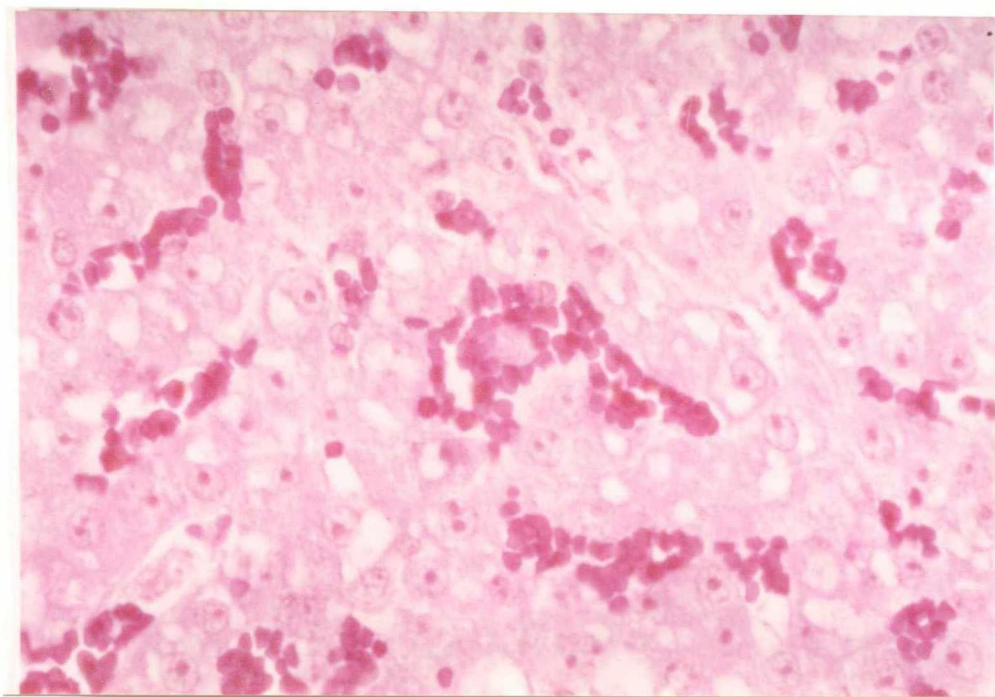


写真 -5 豚群 85-109 死亡新生子豚  
肝臓 空胞の形成 ×200

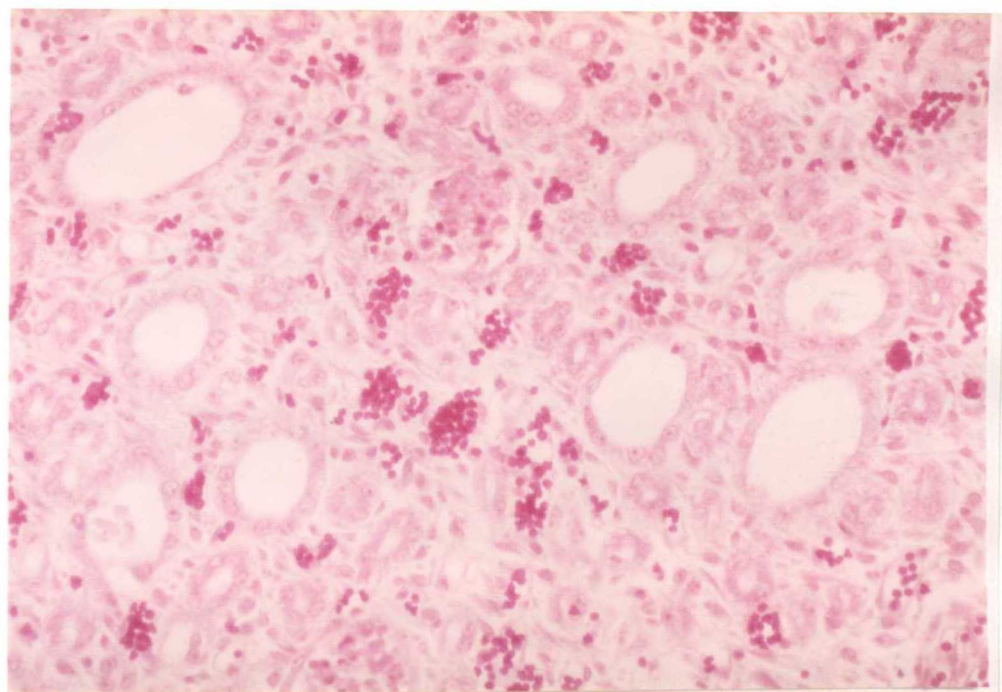


写真 -6 豚群 85-109 死亡新生子豚  
腎臓 間質の出血 ×100

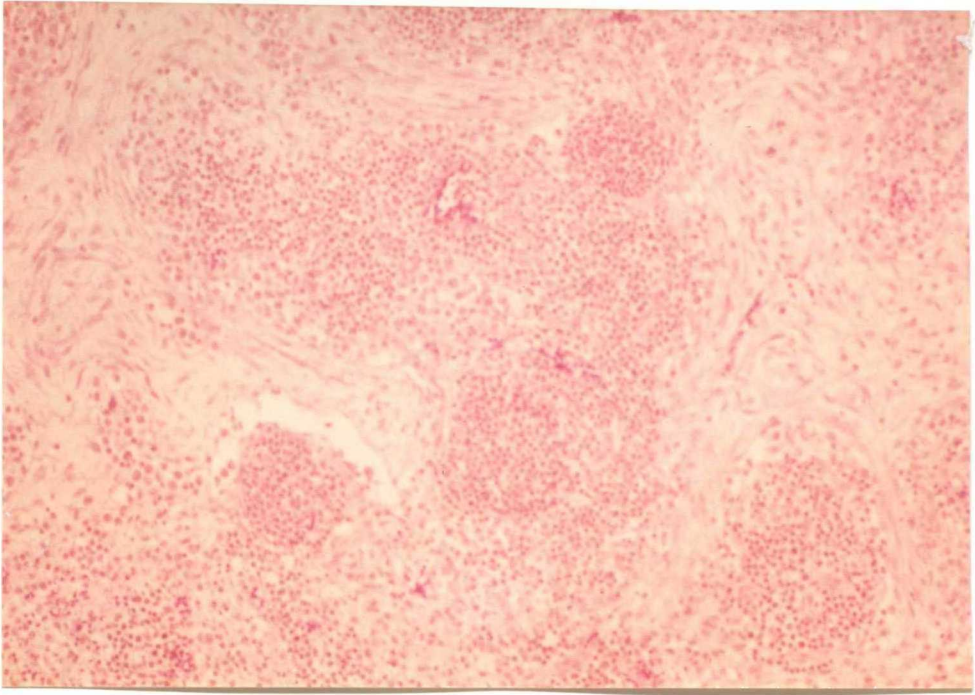


写真 -7 豚群 85-109 死亡新生子豚  
リンパ節 リンパ球の減少 ×40

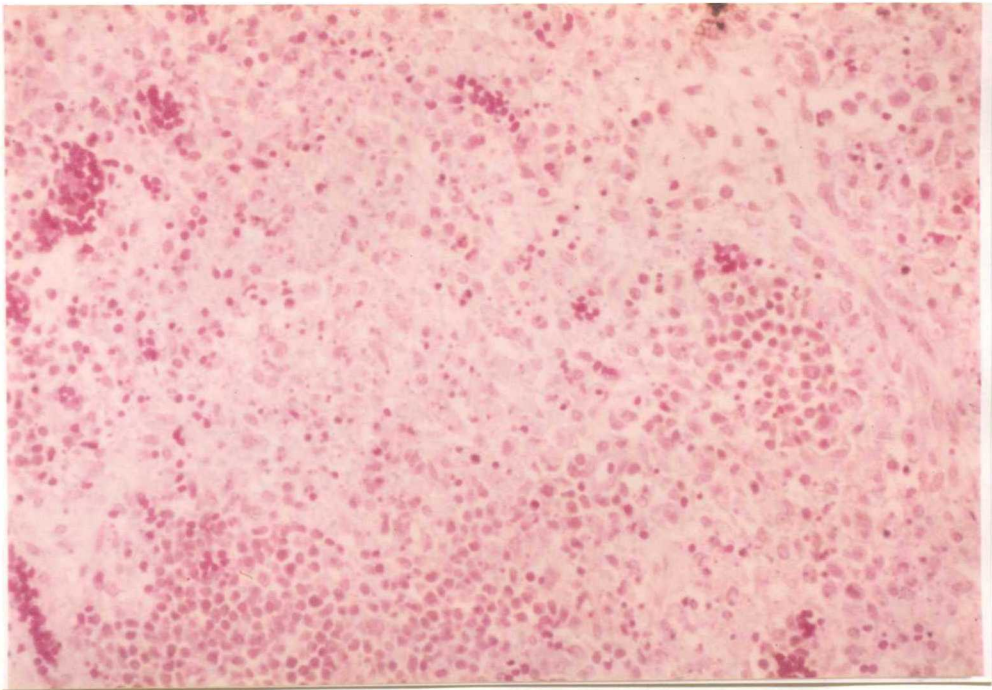


写真 -8 豚群 85-109 死亡新生子豚  
リンパ節 リンパ球の崩壊 ×400



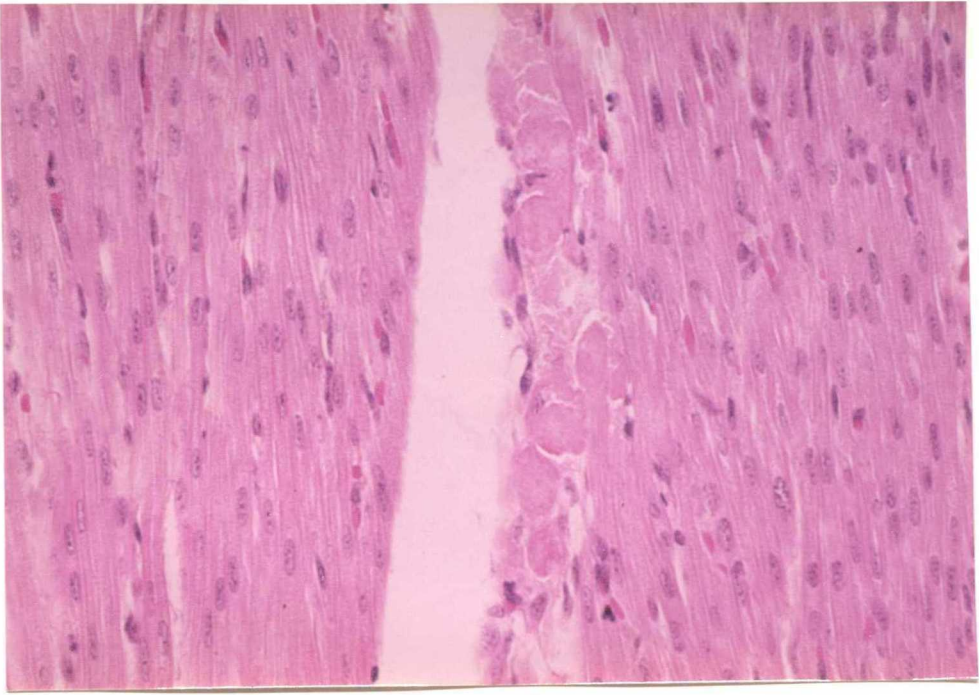


写真 -9 豚群 87-96 死亡子豚 心臓  
硝子化および塊状崩壊 ×200

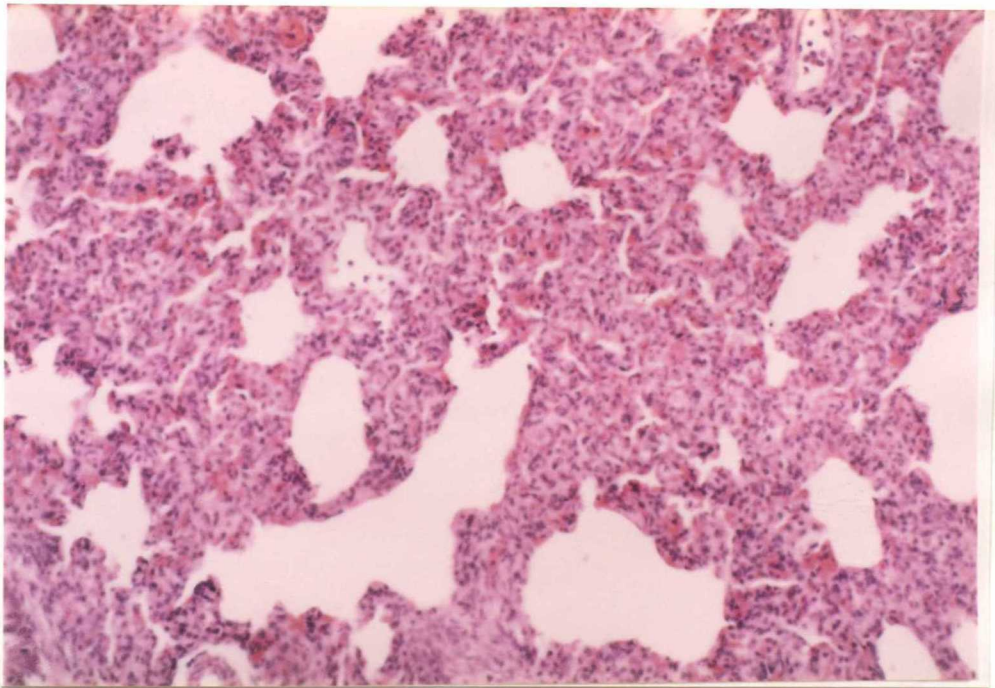


写真-10 豚群 87-96 死亡子豚  
肺 間質の肥厚 ×100

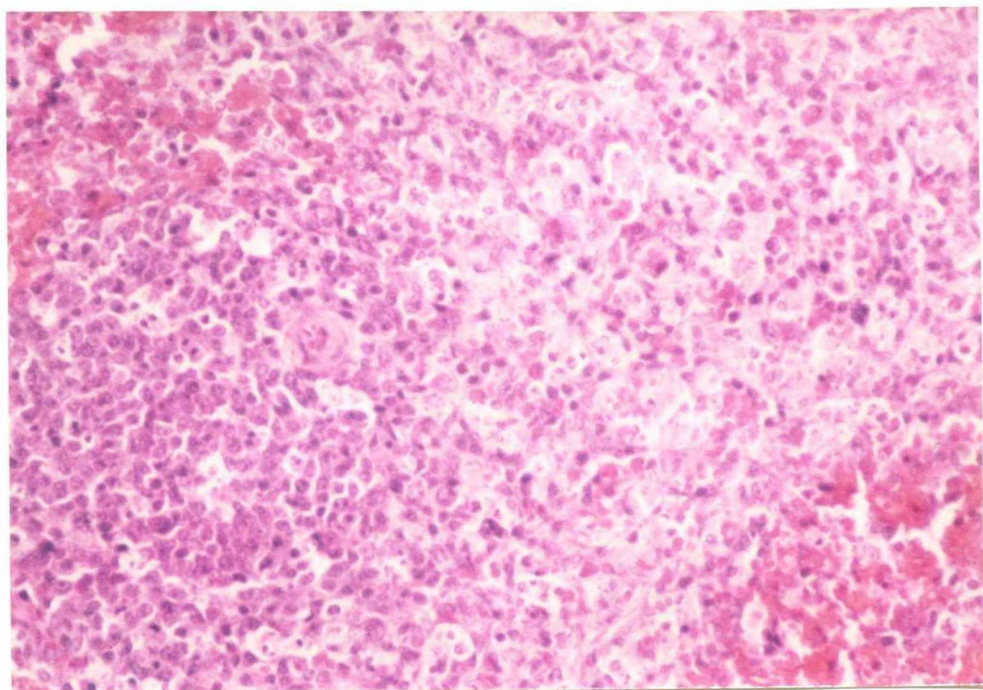


写真-11 豚群 87-96 死亡子豚  
脾臓白脾髄の細胞変性 ×100

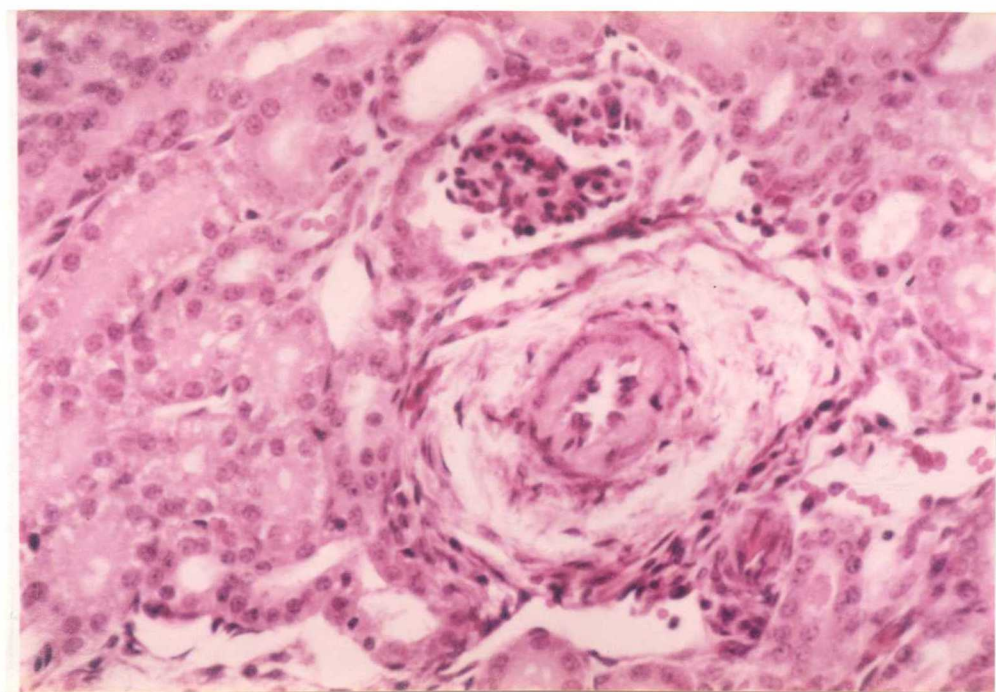


写真-12 豚群 87-96 死亡子豚  
腎臓 血管壁の水腫性粗しょう化



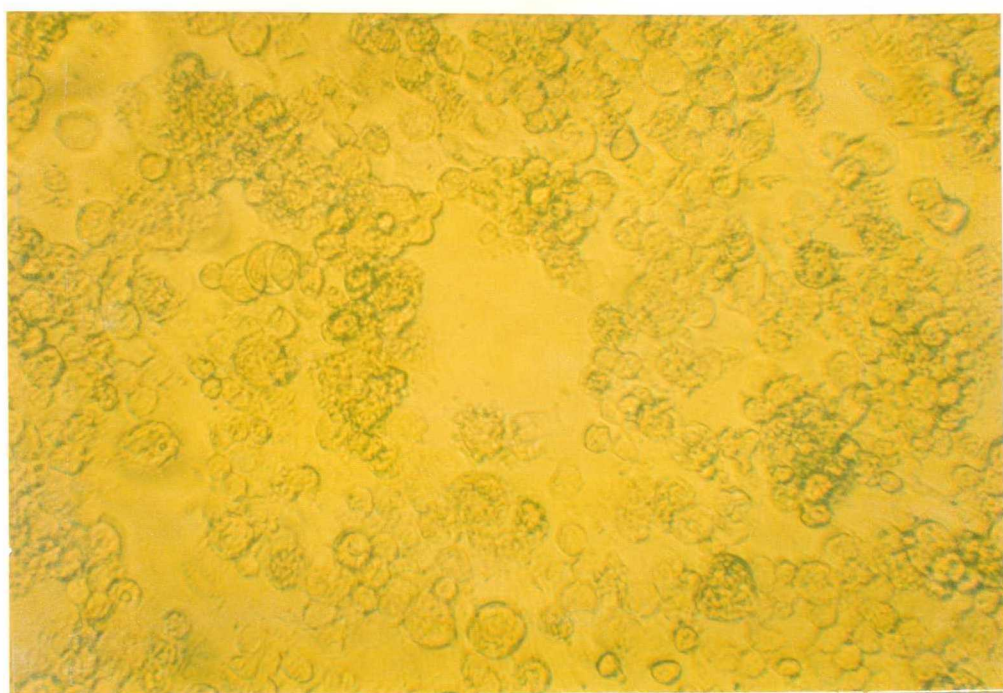


写真-13 GTV 85-109-1株  
接種後 3日目の CPE

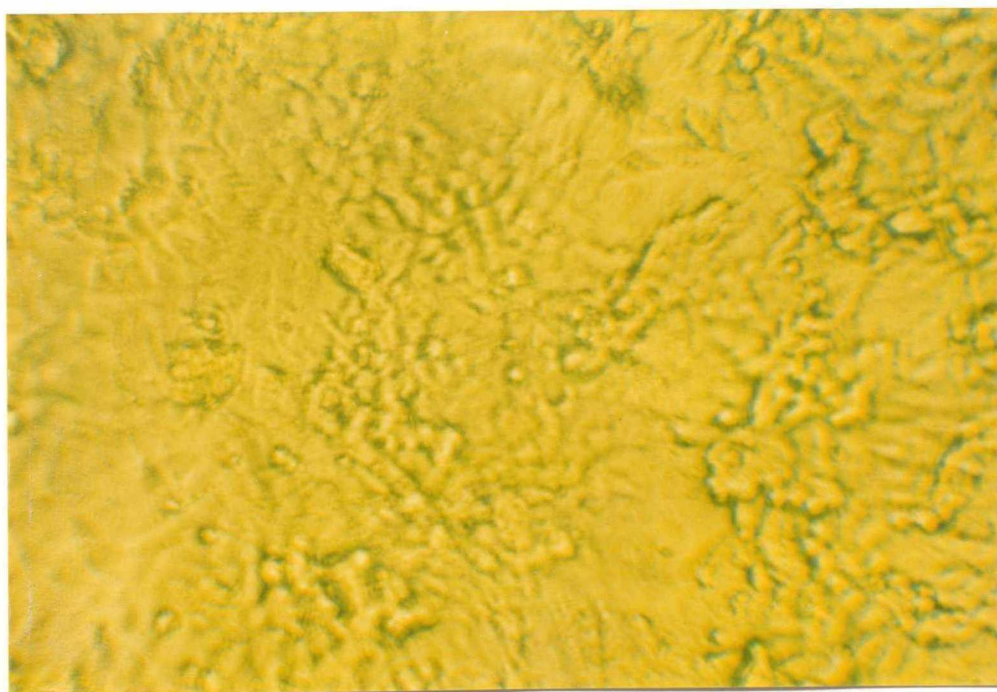


写真-14 HmLu-1細胞 (培養 4日目)

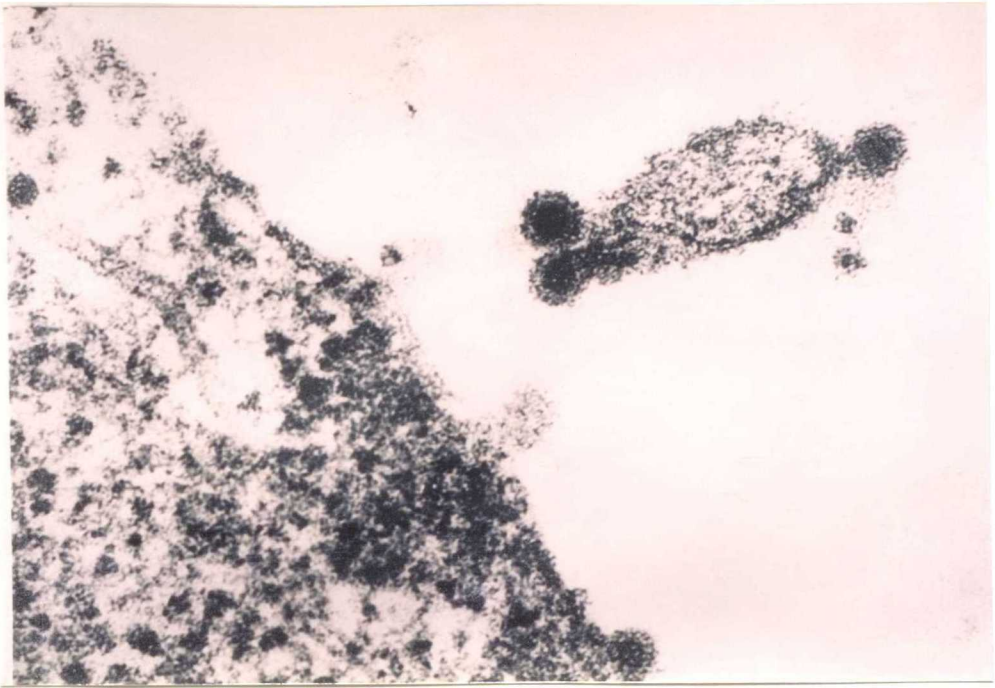


写真-15 GTV 85-109-1株  
ESK 細胞で出芽して成熟するウイルス

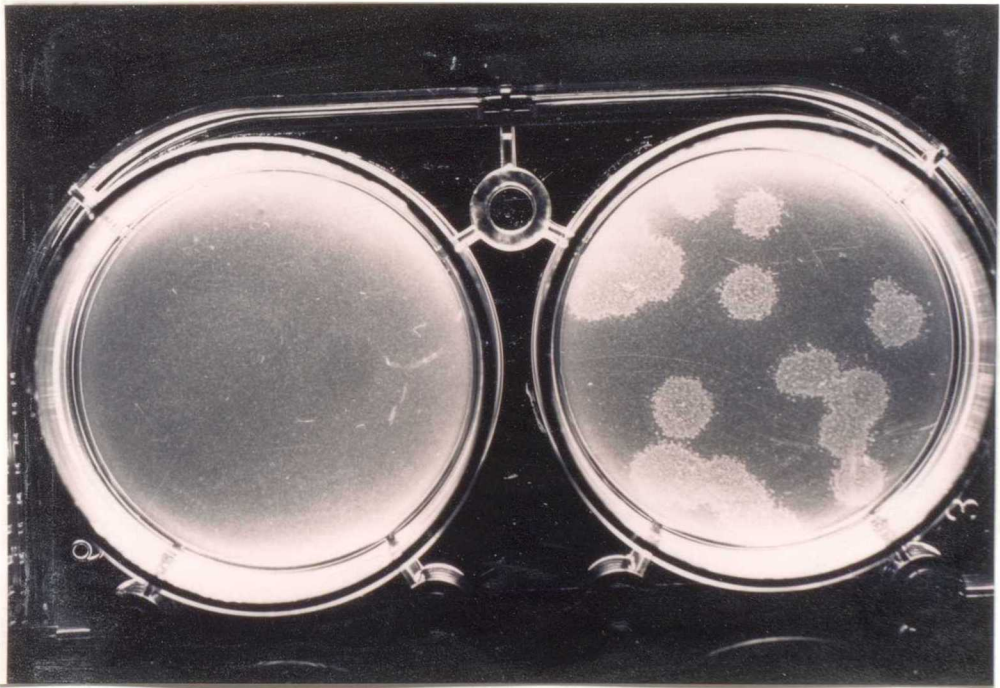


写真-16 GTV 85-109-1株  
ESK 細胞に接種 5日目のプラック



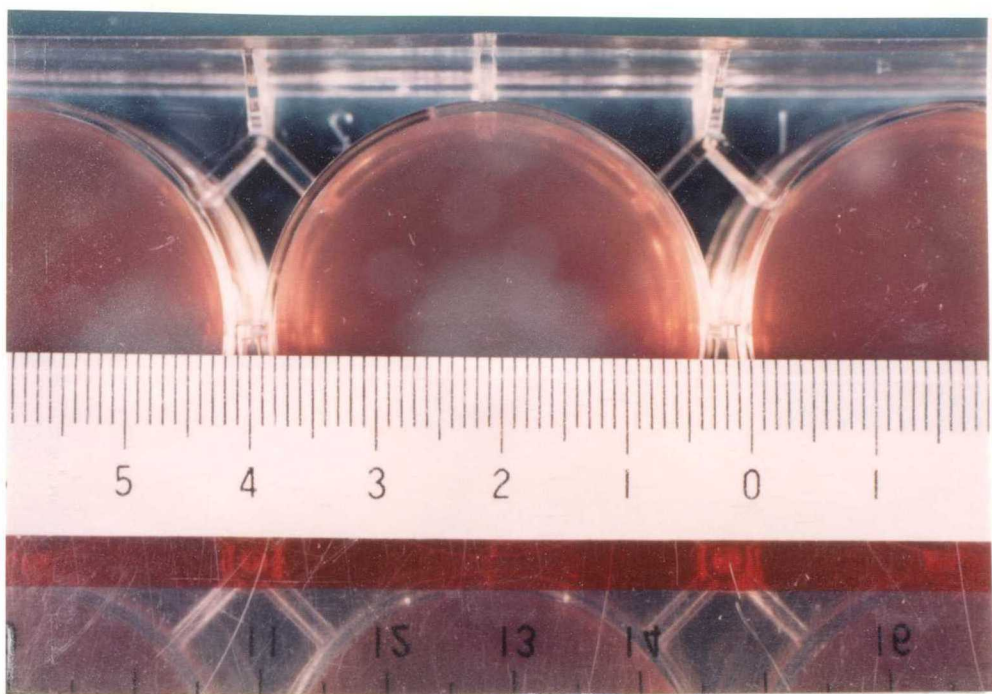


写真-17 GTV 87-96-1 株  
HmLu-1細胞に接種 5日目のプラック

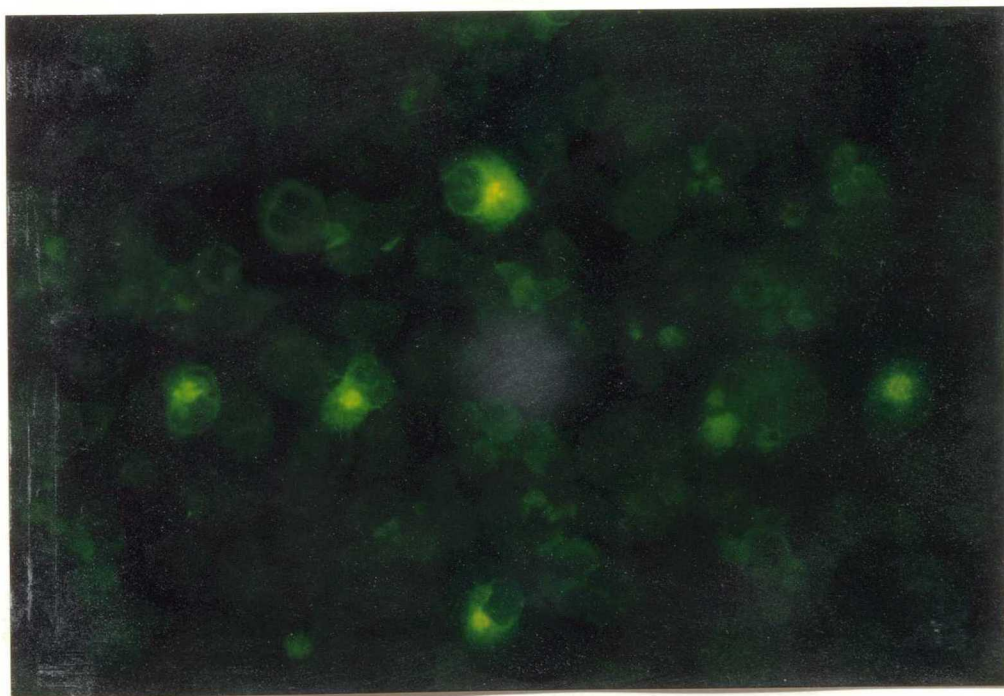


写真-18 GTV 85-109-1株  
HmLu-1細胞に接種 6時間目の蛍光抗原

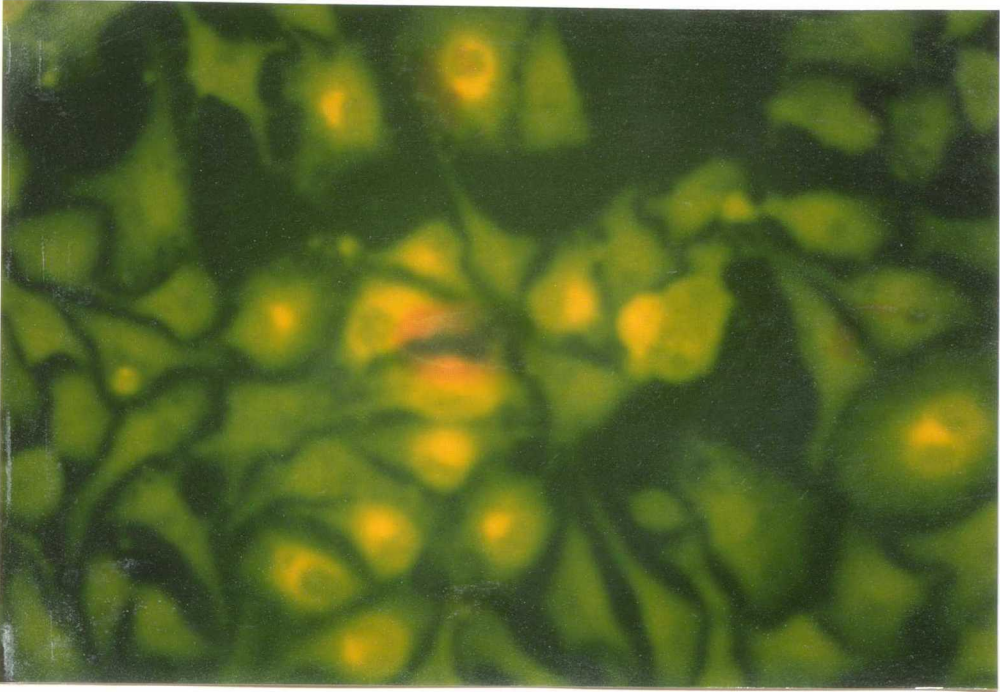


写真-19 GTV 85-109-1株  
HmLu-1細胞に接種18時間目の蛍光抗原

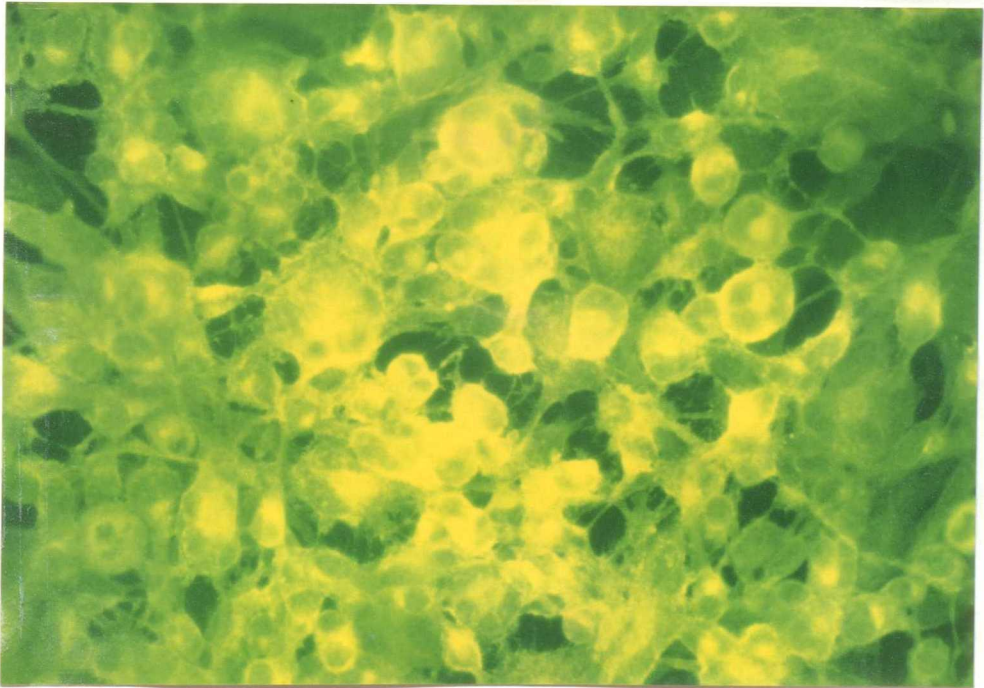


写真-20 GTV 85-109-1株  
HmLu-1細胞に接種24時間目の蛍光抗原





写真-21 GIV 85-109-1株  
脳内接種 3日後の乳のみマウス  
左：対照 中央：ひん死 右：死亡



写真-22 GIV 85-109-1株  
脳内接種 7日後の乳のみマウス  
右：対照 左：後肢麻痺、発育遅延



写真-23 GTV 85-109-1株 妊娠マウス 腹腔内接種  
左：対照 中央：生後死亡の乳のみマウス 右：死産

Studies on Getah virus infection in swine: Pathogenicity  
of the virus in piglets

KEIJI YAGO

Getahvirus, a member of alphavirus of the family Togaviridae, has been isolated from mosquitoes in Japan, Malaysia and Austraria and from healthy pigs and sick horses. Serological survey indicated that the virus was widely transmitted in swine, however, there have never been reports describing the sickness in swine due to the virus. The author has been engaged for several years in diagnostic analysis of pig diseases occurring in Kanagawa prefecture and revealed for the first time that the natural cases of fatal infection in piglets were due to the virus, which was characterized by swollen face with light neuroparalysis.

The purpose of this study is to reveal the pathogenicity of the virus in swine and discuss the factors producing fatal infection in piglets based on the epizootiological surveys as well as the experimental infection in mice and piglets of various age.

#### 1. The incidence of pig diseases in Kanagawa prefecture

An investigation was conducted for the past 5 years from 1983 to 1987 to obtain which pig diseases were most prevelent and affecting pig husboundry in the prefecture. In this period, a total of about 160,000 pigs were raised in Kanagawa prefecture, mostly in the central area for breeding, farrowing and fattening, though the population tended to be decreasing in number gradually. The accumulated data of diagnostic investigation performed during the period indicated that

chronic infectious diseases and complicated infections increased instead of acute infectious diseases and abortion as well as loss of weaned and unweaned piglets were prevalent. The most prevalent among them were Aujeszki's disease, pneumonia due to the infection with Hemophilus and Pasteurella, coli-bacteriosis, abortions due to the infection with Japanese encephalitis virus and swine parvovirus, infectious gastroenteritis and toxoplasmosis. Besides, it was noticeable that concentrated occurrence of a disease in two litters of newborn piglets, characterized by swollen face with a light neuroparalysis, was first confirmed to be due to the infection with Getah virus.

## 2. Etiological investigation of the fatal disease of newborn piglets of two litters

In October 1985, at a subsidiary pigfarm in Fujisawa city, 12 newborns of a litter suddenly showed decreased activity and tremors followed by posterior paresis. Eight of them died by the 3rd day after the onset and the remaining four recovered gradually(case#1).

In October 1987 at a subsidiary pigfarm in Hatano city, 11 newborns of a litter were born including two stillborn fetuses. At 23 days of age, all 9 piglets had swollen faces, nervous signs such as tremor and unusual walking. Three of them were submitted for necropsy the next day when two were dead and the other one was moribund. Although the remaining 6 piglets showed slight bilateral swelling of eyelids,

they recovered gradually (case #2).

Both sows of Case #1 and #2 as well as pigs chosen randomly from the neighboring pigfarms were examined thoroughly but all of them showed no clinical abnormalities at all. At necropsy, there were found no specific gross and histopathological lesions. However, there were observed gelatinous infiltration of hypodermis and light edema of lungs, liver, spleen, kidney and lymphonodi in all of dead and moribund piglets.

Bacteriological examination of visceral organs (brain, lungs, liver, spleen, kidney and gut) did not indicate that no pathologic bacteria were involved in the disease, although Escherichia coli was isolated from the intestinal contents.

Virus isolation was attempted from visceral organs. Ten percent suspensions of the organs were inoculated onto cultures of HmLu cells originated from the hamster lung. Cytopathic effects of round cell type were observed two days after inoculation in the cultures inoculated with all the tissue samples examined. The infectivity titers ranged from  $10^{3.0}$  to  $10^{6.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml in Case #1 and from  $10^{2.5}$  to  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml in Case #2, respectively. The viruses recovered from Case #1 and Case #2 had a similar characteristics of cytopathic effects and could not be differentiated each other by neutralization test between convalescent sera and each isolates. The results of antibody examination using isolate antigen indicated that the hemaggl-

utination inhibiting antibody titers ranged from 1:320 to 1:480 in convalescent sera of 53 days of age in Case #1 and from 1:160 to 1:320 at 44 days of age in Case #2. The antibody was never detected in acute phase sera of both cases. These results indicate that the disease of piglets was due to the infection with the recovered virus.

### 3. Characteristics of the isolates

First, the virus recovered from the samples of Case #1 and Case #2 were examined for physico-chemical properties. The result of filtration test (50-100nm), the growth test in the presence of IUDR(50 $\mu$ g/ml) and sensitivity to the organic solvents such as ethyl ether and chloroform indicated that the virus have the general properties of alphavirus of the family Togaviridae.

The virus had hemagglutinating ability only with erythrocytes in the ristricted range of pH 6.0 to 6.2 (HA titer of 128 with the virus infectivity of  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml). From these results it was suspected that the virus might belong to Getahvirus. Therefore, the serological properties was examined using the Haruna strain, the reference strain of Getahvirus and its specific antiserum. By cross-neutralization test, the virus recovered could not be differentiated from the Haruna strain, indicating that the virus is identified as Getahvirus.

Secondly, the virus isolates were examined for pathogenicity in mice and gnotobiotic piglets including the relationship between age and pa-

thogenicity in mice. Mice were inoculated intracerebrally with approximately 10  $\mu$ l of  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml. When inoculated at one to three days of age, all the mice were killed. When inoculated at 11 days of age 50 % of mice and at 13 days of age 10 % of mice were killed. However, at 15 days or more, no mice were killed. Pregnant mice were also tested by intraperitoneal inoculation with  $10^{7.0}$  TCID<sub>50</sub> of the virus in order to examine whether or not their fetuses were affected. When inoculated at anytime during the first 10 days of gestation, they hardly produced normal newborns probably due to fatal infection of embryos. When inoculated after 10 days of gestation or thereafter, they produced almost normal number of newborn which died soon after birth through the intrauterine infection. Inoculation at 16 days of gestation resulted in 64 % death of newborns. When inoculated at 17, 18 and 20 days of gestation, their newborns died soon after birth at 37 %, 7.4 %, and 7.1 %, respectively. These results indicated that the younger the fetal age is, the more serious infection.

Five 5-day-old and one 18-day-old gnotobiotic piglets were intramuscularly inoculated with  $10^{5.5}$  PFU of the virus and three 5-day-old piglets were inoculated oronasally with the same dose of the virus. They were observed daily for clinical signs. All of piglets inoculated intramuscularly exhibited anorexia, depression, tremors of the whole body, red discoloration of the skin and incoordination of the pelvic limbs. Three piglets became moribund and died 2 to 3 days after inocu-



lation. the virus was recovered from their tonsils, lungs, liver, and blood. The infectivity titers of the virus in organs and sera ranged from  $10^{2.0}$  to  $10^{5.6}$  PFU/ml. Furthermore, one of the three piglets inoculated showed some clinical signs 2 days after inocuration. Thus, the experimental infection of piglets with the recovered Getahvirus reproduced the same peracute fatal disease as observed in the natural cases.

#### 4. serological survey of Getahvirus infection in swine

In 1986 and 1987, serum samples were collected mainly from sows of the breeding farms (133) in Hatano, Isehara and Hiratsuka district, in order to know the incidence of infection with Getahvirus in swine in Kanagawa prefecture. As a whole, the positive incidence were 48.0 % in 1986 and 28.0 % in 1987, respectively. The positive rates of pigfarms infected were 35.0 % in Hatano, 56.0 % in Isehara and 71.0 % in Hiratsuka district. The result indicate that the distribution of antibody varied depending on years and districts. In 1986, some pigs were set in each district as sentinel pigs and tested for antibody with all negative result. In October and November 1987, however, these sentinel pigs were found infected with the virus at 7.7 % and 11.0 %, respectively.

## Discussion and conclusion

In the present study, it was clearly revealed for the first time that Getahvirus produces a peracute fatal infection in piglets under some conditions. In both cases encountered in the field, the outbreak of the disease was concentrated only in each farrow and did not spread to their neighboring pigs. The result was the same in the experimental infection in mice, suggesting that the age of infection is one of the most important factors. Furthermore, as in the experimental infection of gnotobiotic piglets, it is considered that if newborns without maternal antibody are primarily exposed to a relatively concentrated virus, the infection would result in peracute fatal disease as seen in the natural cases. As seen in the serological survey, the recent incidence of infection in sow was relatively low and varied by years and district. These findings could provide some favorable conditions for producing the disease. Lastly, prenatal infection could still result in neonatal disease and possible subsequent death.

In conclusion, It was elucidated that the infection with Getahvirus produces a peracute fatal disease in piglets without maternal antibody and some factors for producing the disease were also discussed.