

1.2 スパイク蛋白遺伝子に大きな欠損を有する未報告の豚流行性下痢ウイルス

倉吉家畜保健衛生所 ○増田恒幸 足羽朋子 岡田綾子 中村耕太郎 岩尾健

1. はじめに

豚流行性下痢(Porcine epidemic diarrhea :PED)はPEDVを原因とする嘔吐や水様性下痢、それに伴う脱水を主徴とする豚の急性ウイルス感染症である (5)。全ての日齢の豚に感染は成立するが、特に若齢豚で症状が重篤化しやすく、哺乳豚での致死率は時に100%に達する。症状は伝染性胃腸炎(Transmissible gastroenteritis:TGE)と類似しており、類症鑑別が必須である。

日本では2013年10月に7年振りに発生が確認され、2014年8月までに39都道県834農場で約125万頭が発症し、そのうち38万頭が死亡する大流行となっている (農林水産省ホームページ : <http://www.maff.go.jp>)。

PEDVはエンベロープを有するコロナウイルス科アルファコロナウイルス属に分類される1本鎖(+)RNAウイルスである。PEDVのゲノムは約28,000塩基で、それらは2つの非翻訳領域と7つのORF (ORF1a, ORF1b, スパイク(S), ORF3, エンベロープ(E), メンブレン(M),ヌクレオカプシド(N)蛋白)をコードしている (1,6)。

PEDVは遺伝学的にGroup I とGroup II に分類され (2)、Group I にはS1遺伝子の5'末端に特徴的な欠損と挿入を認めるINDEL株が含まれる (9)。米国で検出されたPEDVは約9割の株がGroup II、残り約1割がINDEL株に分類されている (8)。日本国内においてもGroup IIの米国流行株とGroup IのINDEL株が確認されている。鳥取県では2014年3月に一貫経営農場(A農場)において初めてPEDが発生し、分娩舎において、多くの哺乳豚が水様性下痢を呈し、約7日で180頭が死亡・淘汰された。この農場からはGroup IIのPEDVが検出されている。2014年10月には県内2例目のPEDが発生した。哺乳豚の下痢、嘔吐、削瘦などの症状がみとめられたが、下痢により死亡した豚は1頭もいなかった。遺伝子解析の結果、Group IおよびGroup IIのINDEL株とは異なるS1遺伝子に大きな欠損を認める未報告のPEDVと判明したため、その概要を報告する。

2. 農場の概要と発生状況

鳥取県内の母豚500頭を飼養する子豚生産農場(B農場)で、10月25日に3腹の約7日齢の哺乳豚が下痢と嘔吐を呈した。翌日にはさらに3腹の哺乳豚が下痢と嘔吐を呈した。いずれも抗生剤治療には反応せず、元気消失、削瘦を示すものの、死亡する子豚はいなかった。また分娩室内に嘔吐、食欲不振、元気消失を示す母豚が散見された。発生か

表1. AおよびB農場の概要とB農場の発生状況

農場	農場概要							
	飼養形態	飼養頭数		豚導入		入浴時		PED
		母豚	子豚	肥育	繁殖採種豚	子豚	シャワー	
A	一貫経営	100	4700		県外	日産	○	×
B	子豚生産	565	680	0	県外	-	○	×

農場	日産増の発生状況					
	発生日	哺乳豚				母豚の臨床症状
		発症	死亡	淘汰	治療の有無	
A	2014/3/12	178	79	98	×	顕著ではない
B	2014/10/27	127	1	0	○	元気消失・食欲不振

ら10日間の発症頭数は母豚7頭、哺乳豚120頭であったが、その間の哺乳豚の死亡率は約3.3%と低く、下痢による死亡は確認されていない。

B農場は農場立ち入り時のシャワーイン、シャワーアウトなど衛生管理が徹底されていた。また過去半年間以内に従業員の海外渡航歴もなかった。直近の繁殖候補豚の導入は発生から約1週間前であり、県外から繁殖候補豚を導入していた。B農場でPEDワクチンの使用歴はなかった。またB農場は3月の初発農場の関連農場であり、毎週、離乳子豚をA農場へ出荷している（表1）。

3. 材料および方法

1) 供試材料・一般検査

10月27日に農場から臨床症状を呈している2～5日齢の哺乳豚を持ち帰り、病理解剖を実施した。8頭から小腸および小腸内容を採材し、イーグルMEM培地（EMEM）（ニッスイ）を用いて10%乳剤を作製した。3000rpmで10分間遠心後、上清を0.45umフィルター濾過したものを検査材料とし、A群ロタウイルス（RVA）の検査、PEDVおよびTGEVのRT-PCR、ウイルス分離に用いた。

RVAの検査はディップスティック‘栄研‘ロタ（栄研化学）を用いて、8頭の検査を実施した。サルモネラおよび病原性大腸菌の検査は常法により実施した。6頭から消化管を含む全身諸臓器を採取し、常法により病理組織学的検索を実施した。

2) ウイルス分離

ウイルス分離には24ウェルプレートで培養した継代1～2日の70～80%シートした単層Ver oKY-5細胞を使用した。材料を接種する前に細胞を500ulのトリプシン1:250(Difco)（以下トリプシン）を10ug/mlの濃度になるよう添加したEMEM（T-EMEM）で3回洗浄した。20ug/mlの濃度になるようトリプシンを添加した検査材料200ulを各ウェルに接種し、37℃で60分培養した。その後、接種材料を除去し、500ulのT-MEMで1回洗浄した後、1mlのT-EMEMを添加した。細胞変性効果(CPE)を指標に観察し（2～5日）、CPEが認められるまで2～3代盲継代を実施した。同定は培養上清のPEDVのRT-PCRにより行った。

3) PEDVおよびTGEVのRT-PCR

材料からQIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。PEDVおよびTGEVのS遺伝子を標的としたRT-PCRはOne-Step RT-PCR Kit(QIAGEN)を用いて既報の報告に基づき実施した（3）。

4) PEDV-20320FとPEDV-21816Rのプライマーを用いたPEDVのRT-PCR

試験には県内PED初発農場で検出されたRNAおよび今回の材料から抽出したRNAを用いた。PEDV Colorado株を元にデザインされたプライマーを用いて、PEDVのORF1b領域の3'末端側とS遺伝子の5'末端側のRT-PCRを同様に実施した（6）。

5) 遺伝子解析

小腸乳剤8検体を（独）動物衛生研究所に送付し、S遺伝子およびPEDVの全ゲノム解析を実施した。この検体のS遺伝子全長を決定するためPEDV S遺伝子の増幅産物をTAクローニング法によりクローニングし、ABI PRISM 3130（Life Technologies）を用いて解析した。PEDV全ゲノム解析は次世代シーケンサー Ion Torrent PGM（Life Technologies）を用いて実施した。

6）ウイルス抗体検査

10月28日に分娩舎の母豚5頭、母豚舎の豚5頭および直近の導入豚5頭から血液を採取した。またオーエスキー病（AD）の県外導入豚着地検査のため、平成26年4月から11月に採材した県外導入豚の余剰血清49検体を用いてPEDVに対する中和抗体検査を常法により実施した。使用細胞はVeroKY-5細胞、攻撃ウイルスにはPEDV NK94P6Tr(-)株を用いた。

4．結果

1）一般検査

8頭の哺乳豚は全て生きてまま搬入された。病理解剖の結果、1匹の胃内に凝乳塊が充満していた。7頭の消化管内容は水様性では無く、黄色泥状であった。残り1頭の消化管には内容が認められず、小腸および大腸壁は中程度にひ薄化していた。抗原検出キットからA群ロタウイルスは検出されなかった。また、細菌学的検査の結果、サルモネラや病原性大腸菌などは検出されなかった。

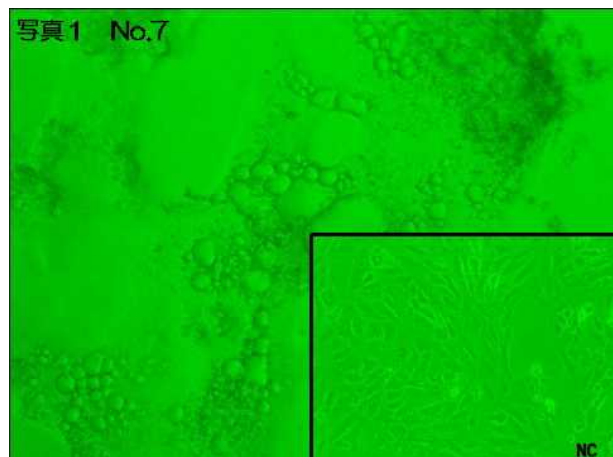
病理組織学的検索の結果、6頭全てで小腸粘膜上皮細胞の空胞変性、絨毛の萎縮、癒合及び粘膜のひ薄化が認められた。一部の個体でまれに大腸粘膜上皮細胞にも空胞変性が認められた。抗PEDV兎血清（（独）動物衛生研究所）を用いた免疫組織化学的検索では6頭全てで小腸粘膜上皮細胞の細胞質に陽性抗原が散見された。

2）ウイルス分離

8検体中1検体において継代2代目で空胞化とシンシチウム形成を特徴とするCPEが認められた。また培養上清のPEDVのRT-PCRで陽性が確認された。（写真1）

3）PEDVおよびTGEVのRT-PCR

S遺伝子のRT-PCRにおいて、全ての材料でPEDV陽性となった。TGEVは全て陰性であった。



4) PEDV-20320FとPEDV-21816Rのプライマーを用いたPEDVのRT-PCR

8検体全てで約860bpのPCR増幅産物を確認した。しかし、県内の初発例（A農場）から検出された検体のPCR増幅産物は、約600bpほど今回の症例のものより大きく、約1500bpであった（図1）。

5) B農場由来株（Tottori-2）のS蛋白遺伝子および全ゲノム解析

S蛋白遺伝子全長解析の結果、対照として用いたA農場由来株（Tottori-1）よりTottori-2はS1領域の前半部分に興味深い大きな欠損を認めた。欠損部分の大きさは582塩基（194アミノ酸）であった。系統発生解析の結果、Tottori-2は近年、米国で検出されたPEDV TC-PC177株と高い相同性を示し、その塩基配列の一致率は97.89%であった。TC-PC177株にもほぼ同じ部位に大きな欠損が確認されているが（197aa）、Tottori-2と欠損位置は若干異なっていた（図2, 3）。

次世代シーケンサーによる全ゲノム解析によりTottori-2の27342塩基の全配列が決定された。系統発生解析の結果、Tottori-2は全ゲノム配列が明らかになっている既知の北米検出株と高い相同性を示し、その塩基配列の一致率は99.64%から99.87%であった。米国INDEL株との一致率は98.90から99.45%であった。最も相同性が高かったのはIowa103株であった。

6) 発生時の同居豚の抗体保有状況および県外導入豚の遡り抗体検査

検査した分娩舎の母豚は、5頭中2頭がPEDVに対する中和抗体を保有し、それらは16, 25倍であった。10月21日に県外より導入した繁殖候補豚は5頭中4頭が中和抗体を保有し、それらは2~64倍であり抗体価のばらつきが見られた。母豚舎のストールで飼養されている豚は5頭中4頭が中和抗体を保有し、それらは32~64倍であった。

また県外導入豚の遡り抗体検査では、4月7日から9月16日までに採血した39頭の豚は全てPEDVに対する中和抗体を保有していなかったが、発生後の11月4日に採血した豚は10頭全て中和抗体を保有しており、32~128倍と高い中和抗体価を示していた（図4）。

図1. A・B農場由来株の比較
Primer: PEDV-20320-F / PEDV-21816-R (Marthaler, 2013)

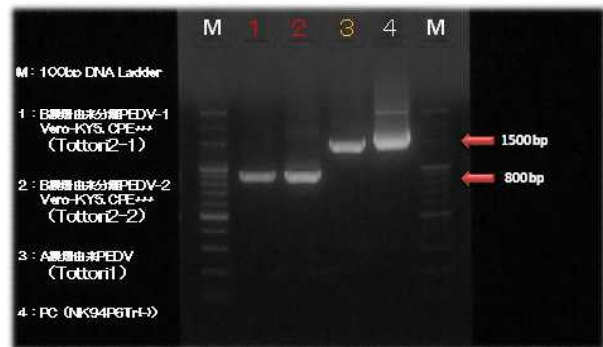
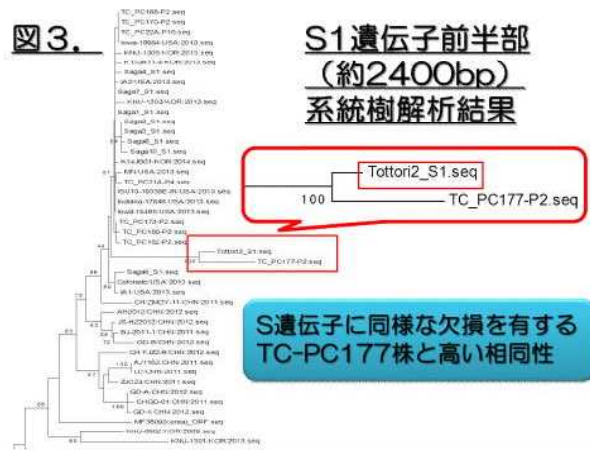


図2. Tottori2のS遺伝子における欠損部位 (aa)



図3.



S1遺伝子前半部
(約2400bp)
系統樹解析結果

S遺伝子に同様な欠損を有する
TC-PC177株と高い相同性

5. 考察

鳥取県において2014年3月にA農場で、10月には関連農場であるB農場でPEDVが発生し、B農場から分離されたPEDV (Tottori-2株) にはS蛋白遺伝子に大きな欠損 (194aa) が認められた。欠損部位はアミノ酸配列でS蛋白遺伝子の23番目から217番目の位置であった。このような大きな欠損を持つPEDV株は米国において培養細胞由来株 (TC-PC177株) での報告があるのみで (4)、野外症例では世界で初めての報告である。欠損部位に若干の差が認められたことは (197aaの欠損)、TC-PC177株が培養細胞由来のものであるためだと考えられた。またTottori-2は大きな欠損を有していること以外は、既知のPEDVと相同性が高く、近年の野外流行株と同じ起源を持っている可能性が示唆された。

現在、日本国内においてGroup IIの米国流行株とGroup IのINDEL株が確認されているが、この欠損株はこれらと異なる第3の変異株である可能性が示唆された。A農場では分娩舎で哺乳豚の激しい水様性下痢が確認され約7日間で約180頭の哺乳豚が死亡・淘汰されたが、母豚の臨床症状は顕著ではなかった。一方、B農場では哺乳豚で下痢や嘔吐が認められるものの死亡する子豚はいなかった。また発生直後に母豚で嘔吐、食欲不振などの臨床症状が確認されている。AおよびB農場は発生時にはどちらもPEDVワクチン未接種であったため、両者の発生状況の差異は異なるウイルス株によるものと強く示唆された。

国内でも分離例のあるINDEL株はS蛋白遺伝子の5'末端側に特徴的な欠損と挿入が認められている (167, 176, 416番目にそれぞれ1, 11, 3塩基の欠損および474と475番目の間に6塩基の挿入)。またINDEL株によるPEDVが発生した農場では哺乳豚の致死率が低いという報告もある (9)。

PEDVと同じアルファコロナウイルス属に属するTGEVの変異株と考えられている豚呼吸器コロナウイルス (PRCV) ISU-1株はS蛋白遺伝子に227アミノ酸の欠損が認められており (10)、元株のTGEVとは異なった呼吸器系細胞への組織親和性を有し、病原性も減弱されている (7)。今回の分離株の欠損位置とサイズはこのISU-1株のそれと極めてよく似ている。現在、PEDVではS蛋白遺伝子の変異がその病原性に影響を与えるという報告はないが、S蛋白遺伝子の大きな欠損が哺乳豚の致死率の低減や母豚への臨床症状として現れたのかもしれない。B農場でPEDVを発症した哺乳豚の呼吸器系組織のPEDVに対する免疫染色を実施したが感染は確認できず、組織親和性が消化管から呼吸器系へシフトしている可能性は低いと考えられる (表2)。

B農場ではADV抗体検査のために2014年4、5、7、9、11月に計5回導入豚の採血を実施しており、その余剰血清を用いてPEDVの中和抗体検査を実施した。9月までは39頭全て陰性であったが、11月に採材した血清では10頭全て32~128倍の高い中和抗体価を保有していた。このことからB農場へのPEDVの侵入は9月の下旬から10月の上旬であると推察された。

表2. 呼吸器組織中のPEDV抗原検索

農場	検体	採材日	PEDV RT-PCR		PEDV免疫染色		
			材料	S遺伝子	S遺伝子欠損	小腸	呼吸器
A	A1	2014/3/12		+	-	+	ND
	A2	2014/3/12		+	-	+	ND
	A3	2014/3/12		+	-	+	ND
	A4	2014/3/12		+	-	+	ND
B	B1	2014/10/27	小腸	+	+	+	-
	B2	2014/10/27	小腸	+	+	+	-
	B3	2014/10/27	小腸	+	+	+	-
	B4	2014/10/27	小腸	+	+	+	-
	B5	2014/10/27	小腸	+	+	+	-
	B7	2014/10/27	小腸	+	+	+	-
	B8	2014/10/27	小腸	+	+	+	-

また10月28日時点での分娩舎の母豚では5頭中2頭しか中和抗体価を保有していなかったのに対し、導入7日後の導入豚は5頭中4頭が2～64倍の中和抗体価を保有し、ストールで飼養されている母豚は5頭中4頭が32～64倍の中和抗体価を保有していた。これらの結果よりPEDVは豚の導入に伴いB農場へ侵入したというよりは、何らかの原因で農場内に侵入したPEDVがストールから導入豚、そして分娩舎の順に浸潤していったと考えられる。疫学関連農場であるA農場でPEDVが2014年3月12日に発生しているが、発生後直ちに哺乳豚を全頭殺処分し、伝播防止等の防疫対策を実施し、3月末には沈静化している。A農場とB農場では従業員がそれぞれ固定されており、従業員同士の行き来はない。またA農場ではこのようなS蛋白遺伝子に欠損が認められた欠損を伴うPEDVは確認されておらず、A農場由来株とB農場由来株とは遺伝的に異なっていることが示唆された。このためA農場からB農場へPEDVが伝播した可能性は低いと考えられる。Tottori-2株は米国で分離されたTC-PC177株（4）と高い相同性を保有していたため、海外からの侵入も考えられたが、B農場の従業員には直近の海外渡航歴もなく侵入経路の解明は出来ていない。

今回、B農場から分離されたTottori-2株はS蛋白遺伝子に大きな欠損が認められ、哺乳豚の死亡率が低く従来のPEDVより病原性が低下している可能性が示唆された。PEDVについて、未だ解明されていないことが多くあるが、この疾病は畜産経営に大打撃を与える恐ろしい伝染病である。本ウイルスの感染実験等による病原性についてのさらなる研究は必要であろうし、今回の発見が、効果的なワクチン開発などのようなPEDVの予防やコントロールに寄与することを期待したい。

6. 謝辞

本稿を終えるに当たり、遺伝子解析を実施していただき、多くのご助言、ご指導を頂いた（独）動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域の鈴木享先生およびウイルス分離について多くのご助言を頂いた岩手県中央家畜保健衛生所の福成和博先生、福島県中央家畜保健衛生所の佐藤敦子先生に深謝いたします。

7. 参考文献

(1) Chen J, et al. 2013. Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China. *Viruses* 5, 2601-2613.

(2) Chen Q, et al. 2014. Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 52, 234-243.

(3) Kim SY, et al. 2001. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest* 13, 516-520.

(4) Oka T, et al. 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetic

ally diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Veterinary Microbiology* 173, 258-269.

(5) Pensaert, M. B. 1989. pp. 167-176. *In: Virus Infections of Porcine* (Pensaert, M. ed.), Elsevier, Amsterdam.

(6) Marthaler D, et al. 2013. Complete genome sequence of porcine epidemic diarrhea virus strain USA/Colorado/2013 from the United States. *Genome Announc.* 1 .

(7) Saif L.J, et al. 2012. Coronaviruses. *In: Zimmerman, J.J. (Ed.), Diseases of Swine.* 10th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA, pp. 501-524.

(8) Vlasova AN, et al. 2014. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. *Emerg. Infect. Dis.*, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2010.140491>.

(9) Wang l, et al. 2014. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 917-919.

(10) Zhang X, et al. 2007. Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *Virology* 358, 424-435.