平成３０年３月２２日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業
研究成果報告書

課題番号：２７０３

コロナウイルスによる豚の下痢を呈する伝染性疾病（PED 等）の検査手法の開発及び体内動態解明に係る研究

研　究　期　間：平成２７年度～平成２９年度（３年間）
研究総括者名　：大橋　誠一
試験研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究部門

１　研究目的

豚流行性下痢（PED）は、食欲不振および水様性下痢が特徴のウイルス性伝染病で、特に発症した哺乳豚では脱水等によりほぼ 100％が死亡する。平成 25 年 10 月、我が国で7年ぶりにPEDの発生が確認され、その後全国に発生が拡大し、平成27 年1月末までに、39都道県905 戸で発生が確認された。また、この期間に米国等で豚の下痢便から新たに豚デルタコロナウイルス（PDCoV）が検出され、本ウイルスと豚の下痢との関連が指摘されている。

本研究課題では臨床的に類症鑑別が困難である伝染性胃腸炎（TGE）ウイルス（TGEV）、PEDウイルス（PEDV）および PDCoV の感染を原因とするいわゆる豚腸管コロナウイルス性疾病の検査法の高度化を図るため、高感度かつ効率的な検査手法の確立を目指す。確立する検査手法は輸入検疫や国内防疫・防疫措置の強化に資するため、動物検疫所や都道府県の家畜保健衛生所で利用可能な方法を選択する。また、PED に関して、疫学調査から国内での感染拡大の要因として、感染豚や汚染した物、人の移動が示唆されたが、最小有効感染量、感染豚でのウイルスの増殖様式や各臓器における分布、さらに、感染後のウイルス排泄についてはまだ十分な知見が得られていない。そこで、自然宿主である豚を用いた感染実験を行い、豚個体におけるウイルスの増殖部位の特定や経時的に糞便中へのウイルス排泄量の測定を行い、PEDV の感染動態を明らかにする。

２　研究内容

（1）研究課題

1）中課題1：高精度かつ効率的な検査手法の確立

・小課題1：効率的なウイルス遺伝子検出法の確立

豚で下痢を主徴とするコロナウイルスによる伝染病には PED の他にも TGE や近年米国等で確認され、豚の下痢との関連が指摘されているPDCoV 感染症がある。これらを効率よく、かつ高精度に鑑別可能な RT-PCR あるいはリアルタイム RT-PCR 法を確立する。

・小課題2：新たな抗体検出法の確立あるいは検証

現在実施されている中和試験による抗体検査は、特異性は高いものの、迅速性に欠ける。そこで、これまでよりも短時間で抗体検出が可能な手法の開発を検討する。

２）中課題２：感染豚におけるウイルスの動態等に関する研究

・小課題１：PEDV の豚での増殖動態の解析

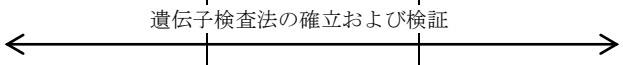
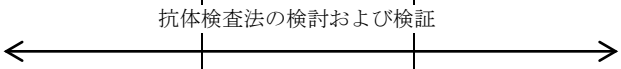
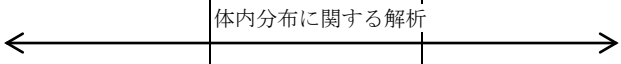
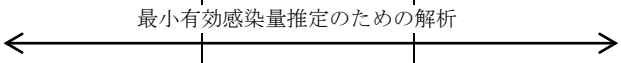
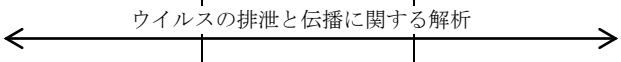
PEDV は感染後、腸管で増殖することで下痢を発症する。同じコロナウイルスである TGEV では感染後、腸管で増殖し下痢を発症するだけでなく、呼吸器でも増殖が見られることがある。そこで、PEDV 接種後、経時的に豚体内でのウイルスの分布をウイルス学的および病理学的に解析し、増殖動態を解明する。

・小課題２：豚における PEDV の感染と伝播に関する解析

疫学調査等から豚はきわめて少量の PEDV で感染が成立することが示唆されているが、実際の最小感染量は不明である。そこで、既知の感染量の PEDV を豚に

接種し、感染の成立に必要なウイルス量の推定を試みる。また、感染あるいは発症した豚の糞便中へのウイルス排泄量を経時的に測定し、ウイルスが排泄される期間を明らかにする。なお、本実験で得られる検体は中課題１の小課題１及び小課題２で実施される検出法の評価にも利用する。

（２）年次計画

項目	平成２７年度	平成２８年度	平成２９年度
１．高精度かつ効率的な検査手法の確立 （１）効率的なウイルス遺伝子検出法の確立			
（２）新たな抗体検出法の確立あるいは検証			
２．感染豚におけるウイルスの動態等に関する研究 （１）PEDV の豚での増殖動態の解析			
（２）豚における PEDV の感染と伝播に関する解析	 		
所要経費（合計）	10,000 千円	8,355 千円	9,599 千円

（3）実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者		エフォート（%）
研究総括者	動物衛生研究部門		大橋　誠一	１５
１．高精度かつ効率的な検査手法の確立	動物衛生研究部門	○	大橋　誠一	前出
（１）　効率的なウイルス遺伝子検出法の確立	動物衛生研究部門	△	大橋　誠一 宮﨑綾子	前出 １０
（２）　新たな抗体検出法の確立あるいは検証	動物衛生研究部門	△	宮﨑綾子 大橋　誠一	前出 前出
２．感染豚におけるウイルスの動態等に関する研究	動物衛生研究部門	○	宮﨑綾子	前出
（１）　PEDV の豚での増殖動態の解析	動物衛生研究部門	△	芝原友幸 川嶌健司 大橋誠一 宮﨑綾子 生澤充隆	１０ １０ 前出 前出 １０
（２）　豚における PEDV の感染と伝播に関する解析	動物衛生研究部門	△	宮﨑綾子 大橋誠一 芝原友幸 川嶌健司 生澤充隆	前出 前出 前出 前出 前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

3　研究推進会議の開催状況

別紙の（1）のとおり

4　研究成果の概要

(1)主要な成果

ア　成果の内容(別紙の(2)参照)

（ア）高精度かつ効率的な検査手法の確立

1)効率的ウイルス遺伝子検出法の確立

PEDV、TGEV 及び PDCoV 遺伝子を検出可能なマルチプレックス RT-PCR 法による効率的な遺伝子検査法を確立した。PEDV6 株、TGEV3 株 PDCoV3 株の培養ウイルスによる特異性の確認では、それぞれの標的ウイルス遺伝子のみを増幅し、異種ウイルスとの交差反応は見られなかった。また、検出感度はいずれのプライマーセットも 1 $TCID_{50}$/反応以下のウイルス遺伝子を検出可能であった。また、臨床材料(野外及び実験感染由来の糞便)からの検出を従来法と比較したところ、感度・特異度ともに同等であった。(p12、p13)

2)新たな抗体検出法の確立あるいは検証

間接蛍光抗体法あるいは免疫染色法による迅速抗体検査法を確立した。間接蛍光抗体法では PEDV4 株による交差試験の結果、PEDV 間で抗原性の差が認められなかっただけでなく、PEDV 抗原は TGEV 及び PDCoV の感染耐過血清との交差反応が認められなかったことから、本法の特異性が高いことが確認された。また、市販の ELISA キットの検証を行い、従来法との比較を行った。検証した 2 種類の ELISA ともに従来法である中和試験と同等の検出感度を示したが、中和試験や IFA で特異抗体を検出したにも関わらず、陽性限界以下となる検体があった(p9, p11、p14)。

（イ）感染豚におけるウイルスの動態等に関する研究

1)豚流行性下痢ウイルスの豚での増殖動態の解析

PEDV 感染豚の感染極期(接種2~4日目)および回復期(接種 28 日目)の体内のウイルス抗原および遺伝子の分布を調べたところ、極期では十二指腸から直腸にかけておよび腸間膜リンパ節にウイルス抗原及び遺伝子が検出されたが、回復期では腸管の一部でウイルス遺伝子のみが検出された。また、感染豚の血清中では、接種 1 日目からおよそ 10 日間ウイルス遺伝子が検出されたが、糞便中の遺伝子量の 1/100,000 以下であった。このことから PEDV の主要な増殖部位は腸管であり、ウイルス抗原の検出は感染極期の腸管に限局していた。(p17、18)

2)豚における豚流行性下痢ウイルスの感染と伝播に関する解析

実施した感染実験では日齢に関わらず、ウイルス接種後1～2日目にはウイルス遺伝子が糞便中より検出された。糞便中のウイルス遺伝子量は接種 7 日目までに約 10^{10}copies/g の高いウイルス遺伝子量が検出され、接種 4～6 週後には検出限界以下となった。また、感染豚の糞便の感染性を確認するため、10^3 、10^5 及び 10^7 copies/mL のウイルス遺伝子を含んだ糞便を子豚に接種したところ、10^7 copies/mL 群のみが感染、発症した。(p16、p17、p21、p23)

イ 成果の活用(別紙の(2)参照)

(ア)マルチプレックス RT-PCR 法は動物検疫所や都道府県の家畜保健衛生所に普及することで、診断体制の強化を図ることができる。また、確立した抗体検査法は数時間で結果が得られ、迅速な抗体検査が可能となった。

(イ)PEDV の伝播リスクや伝播経路の推定や防疫対策に利用する。

（２）各研究課題の成果

ア　中課題１（高精度かつ効率的な検査手法の確立）の研究成果

（ア）工程管理及び成果目標

工程表
① 豚の下痢に関与するコロナウイルス（豚腸管コロナウイルス）を効率的および種特異的に検出可能なプライマーセットを設計し、培養ウイルスによる検討を行う。（小課題１関連）（平成２７年度） ② PED ウイルス分離株の抗原解析を行う。さらに、抗原作製法や検出系の検討を行う。（小課題２関連）（平成２７年度） ↓ ③ 感染実験材料を利用し、検討したそれぞれの方法の検出感度や特異性の検討を行い、あわせてウイルス核酸の抽出法の検討も行う。必要に応じ改良を検討する。（小課題１関連）（平成２８年度） ④ 感染実験で得られた血清を用いて、前年検討した抗体検査方法の開発を行う。(小課題２関連)（平成２８年度） ↓ ⑤ 前年度の結果を踏まえ、野外材料を利用し、検出の感度や特異性の確認を行い、検査法を確立する。（小課題１関連）（平成２９年度） ⑥ 野外感染例から得られた血清を用いて、検討した ELISA 法の評価を行い、抗体検査法の確立を行う。（小課題２関連）（平成２９年度）
成果目標：下痢の原因ウイルスを効率的かつ特異的に検出可能な検査手法を確立する。また、より短時間で検出可能な抗体検査手法を確立する。

（イ）各工程の進捗状況及び成果

【工程表①】

豚腸管コロナウイルス共通プライマーおよび各々のウイルスを特異的に検出可能なプライマーを計 4 組設計した。培養ウイルスを用いて、設計したプライマーの感度および特異性を確認した。さらに、4 組のプライマーを混合して行う効率的検出法が可能であることを確認した（図１、図２）。（平成２７年度）

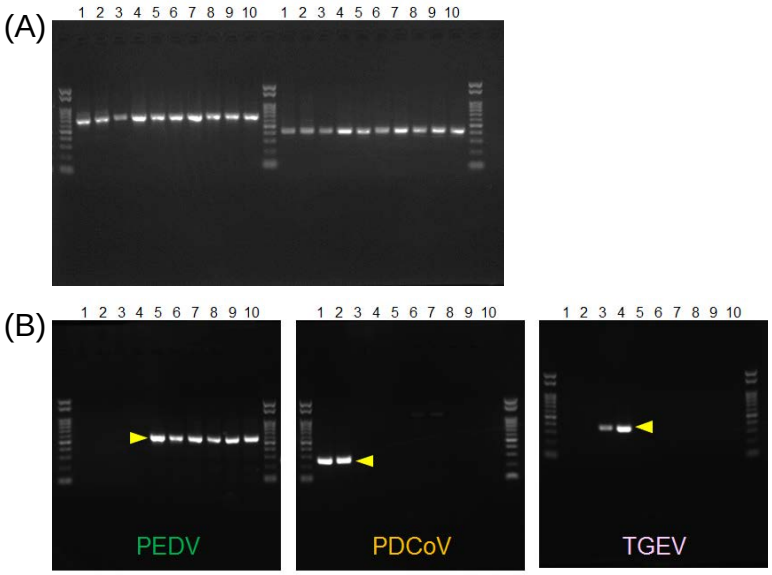


図1　コロナウイルス特異的（A）および種特異的プライマー（B）による増幅
1-2:PDCoV、3-4：TGEV、5-10：PEDV。コロナウイルス特異的および種特異的プライマーはそれぞれ用いたコロナウイルス全てを特異的かつ副反応なく増幅した。また豚の下痢あるいは糞便から検出されるロタウイルスやピコルナウイルスでは遺伝子が増幅されないことを確認した（結果省略）。

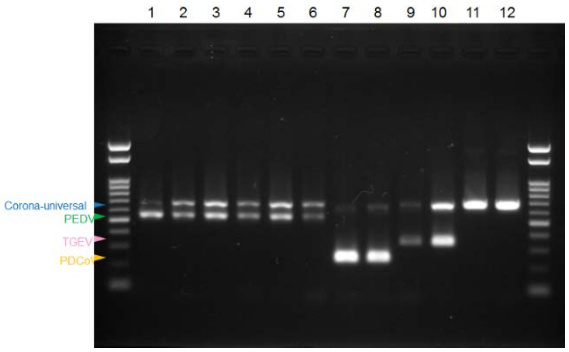


図2　効率的なコロナウイルス遺伝子の検出（マルチプレックス RT-PCR 法）
1-6: PEDV 分離株、7-8：PDCoV, 9-10：TGEV、11-12：牛コロナウイルス。マルチプレックス RT-PCR 法においても用いたウイルスにおいて特異的にウイルス遺伝子の検出が確認された。

【工程表の②】

間接蛍光抗体法（IFA）による抗体検出法を構築し、抗原プレートの作製条件及び反応条件を検討した。また、検出法について蛍光法と免疫染色法の比較を行った。IFA による PEDV 分離株間の抗原性状を比較したところ、分離株間で抗原に大きな差は認められなかったこと（表1A）、また、近縁である TGEV および PDCoV との交差性も認められなかったことから、IFA の特異性が確認された（表1B）。（平成27年度）

【追】当初計画には無かったが、検出系の検討も実施し、蛍光抗体法だけでなく、酵素抗体法でも抗体検出が可能であることを確認した（表2）。（平成27年度）

表１　蛍光抗体法による PEDV 分離株間の抗原性の比較（A）および豚コロナウイルス間の IFA による交差性の比較（B）

（A）

抗血清	分離株				
	CV777	国内流行株（1996年）	国内流行株（2013年）	INDELs（2014年）	S L-del（2014年）
⊿CV777	**2560**	1280	1280	1280	-
⊿国内流行株（1996年）	640	**640**	640	1280	-
⊿国内流行株（2013年）	2560	2560	**2560**	2560	2560
⊿INDELs（2014年）	2560	640	1280	**2560**	1280
⊿S L-del（2014年）	-	-	1280	640	**1280**

（B）

抗原	感染耐過豚血清		
	PEDV	TGEV	PDCoV
PEDV Vero cell	**1280**	<20	<20
TGEV CPK cell	<20	**2560**	<20
PDCoV ST cell	<20	<20	**1280**

表２　異なる検出系による抗体価の比較

検体		FITC	DAB	AEC
HCPD 豚	血清 1	×2560	×1280	×1280
	血清 2	×160	×80	×80
コンベンショナル	肥育豚 1	×1280	×640	×640
	肥育豚 2	×160	×80	×160
	母豚	×1280	×320	×640

3 つの検出系の間で抗体価に大きさは認められない。FITC：フルオレセインイソチオシアネート、DAB：ジアミノベンジジン、AEC：アミノエチルカルバゾール

【工程表の③】

コロナウイルス特異的（676bp）および種特異的プライマー（PEDV: 554bp、TGEV:353bp PDCoV: 256bp）はそれぞれ用いたコロナウイルス全てを特異的かつ副反応なく増幅した（例えば図３の左から 2 番目のレーンでは PEDV 分離株を検出しているのでコロナウイルス特異的 PCR 産物（上側）と PEDV 特異的 PCR 産物（下側）の２本が増幅され

ている)。また豚の下痢あるいは糞便から検出されるロタウイルスやピコルナウイルスでは遺伝子が増幅されないことを確認した（図３)。(平成２７年度)

さらにマルチプレックス RT-PCR 法について、培養ウイルスを用いた検出感度の検定では、PEDV, TGEV および PDCoV いずれのウイルスも $10^{0.5}TCID_{50}$/反応まで検出可能であった（図４)。また、PEDV 実験感染豚由来の糞便材料からの検出では、判定を阻害するような副反応は見られず、容易に判定が可能だった。さらに、抽出法の検討を行った。(平成２８年度)

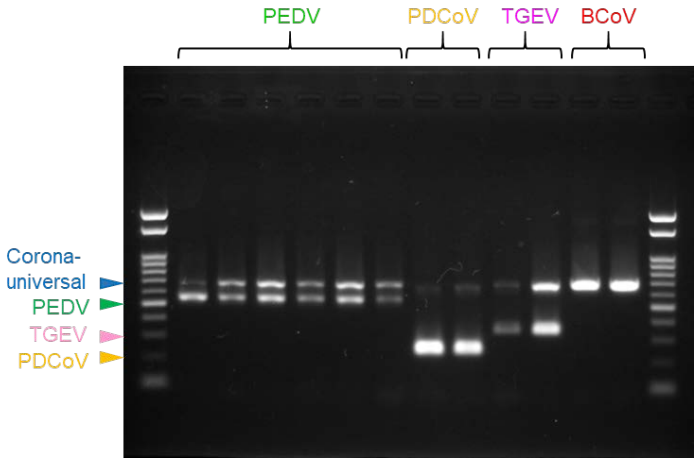


図3　マルチプレックス RT-PCR によるコロナウイルス遺伝子の検出

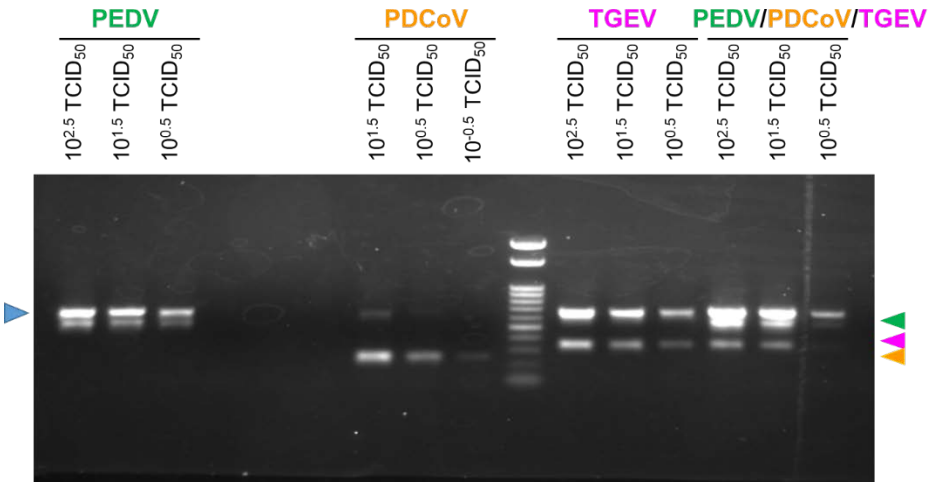


図4　培養ウイルスによる検出感度の比較

【工程表の④】

感染実験で得られた経過血清を用いて、前年検討した IFA と中和試験の比較を行った。また、海外製の多検体 ELISA キットの検証を行った。

哺乳豚及び肥育豚の感染実験由来血清において、中和抗体の検出はウイルス接種後

４～7 日目に検出され、14 日目には最大抗体価に達した。IFA では接種後 7 日以降に抗体が検出され、14 日目には最大値に達した。哺乳豚及び肥育豚での検出感度の差は見られなかった（図５-（１）、（２））。

ELISA の検証では、入手可能であった 2 種類について検討した。ELISA キット A は組換えヌクレオカプシドを抗原としたアビジン - ビオチン法による検出系、ELISA キット B は精製ウイルス粒子を抗原としたダブルサンドイッチ法であった。哺乳豚及び肥育豚の感染実験由来血清を用いて評価を行ったところ、キット A は接種後 7～14 日目以降に S/P 比が閾値を超え、陽性と判定できた。また、哺乳豚に比べ肥育豚で S/P 比が高い傾向見られるとともに、中和試験及び IFA で陽性であった 1 検体が陰性と判定された。キット B では肥育豚の OD 値が哺乳豚の値と比べ高く、７日目から 14 日目にかけて上昇した（図５-（３）、（４））。（平成２８年度）

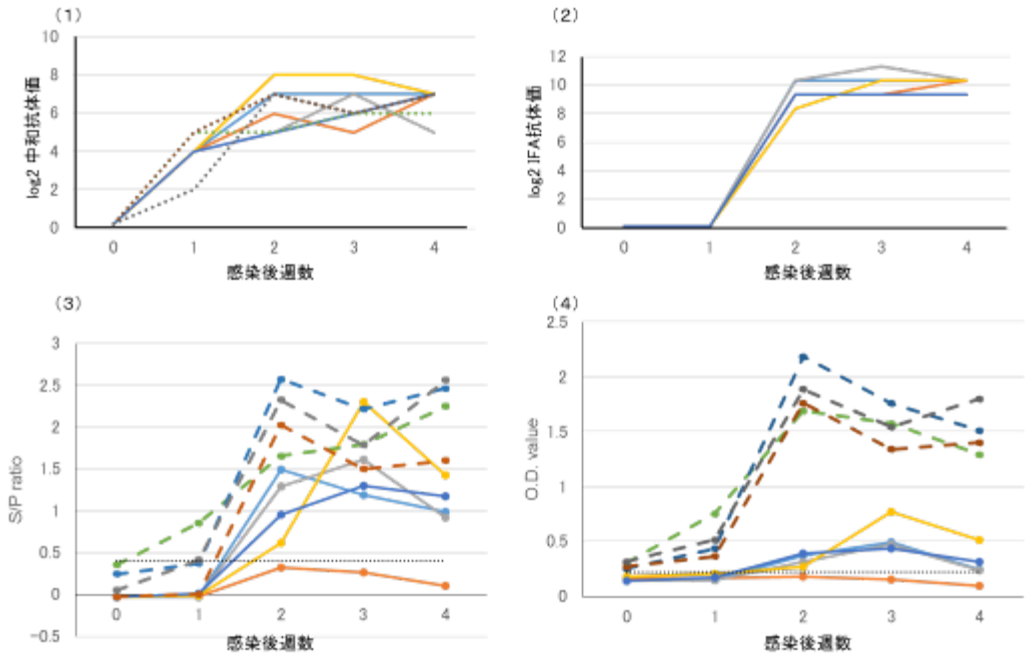


図５　各種抗体検査法による抗体価の推移の比較
（１）　中和試験（２）IFA（３）ELISA（Biovet 社製）（４）ELISA（Biotang 社製）
各図中同色、同一線種は同一個体を示す。2 種類の ELISA は中和試験と同等の検出感度を示したが、中和試験や IFA で陽性を示した検体のなかに、陰性となるものがあった（図中オレンジ色）。

【工程表の⑤】

前年度までに設計したプライマーセットでの感度の低下および副反応を改善するための検討を行い、RT-PCR の反応条件の最適化を実施した。さらに、感染実験材料及び野外材料を用いた検証を行った(図６，７)。（平成２９年度）

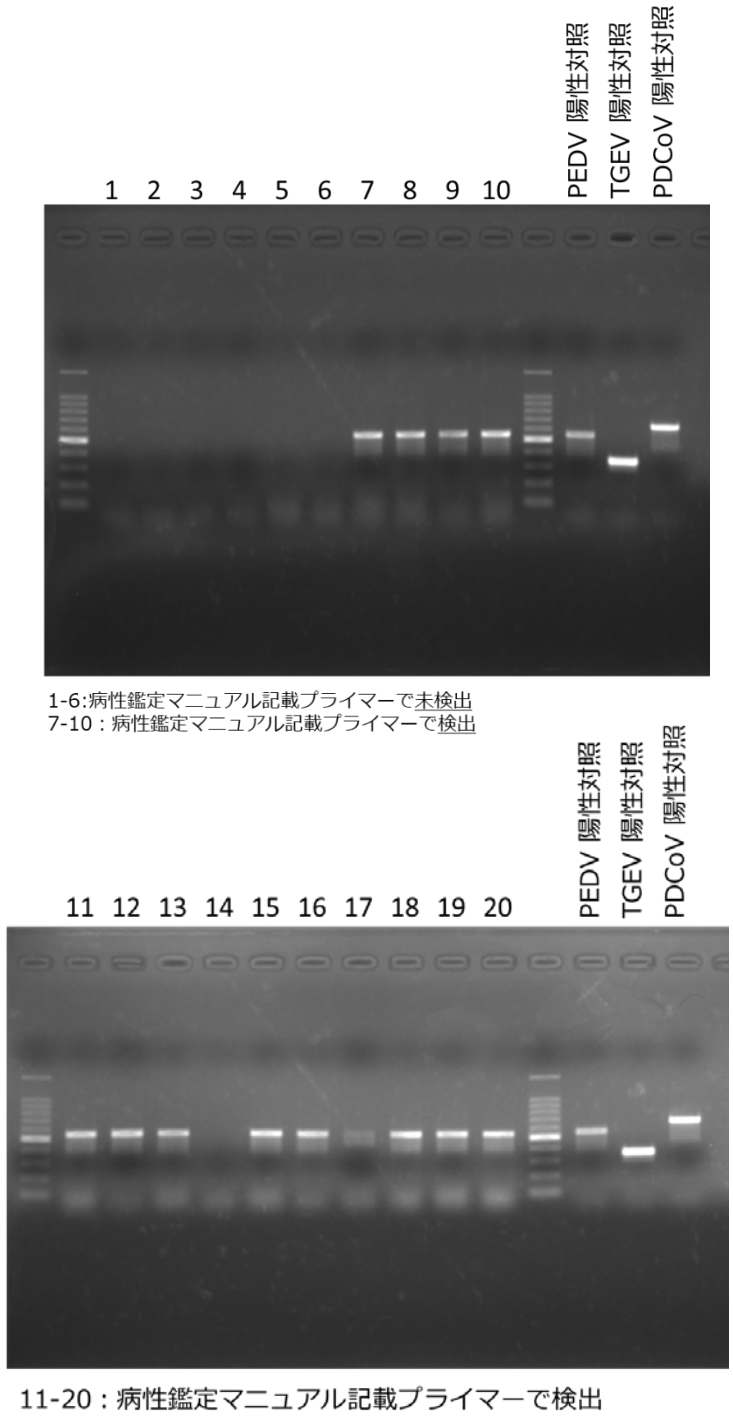


図6　野外材料による検証①

レーン 7-10 及び11-20 は PEDV 遺伝子検査で陽性の検体

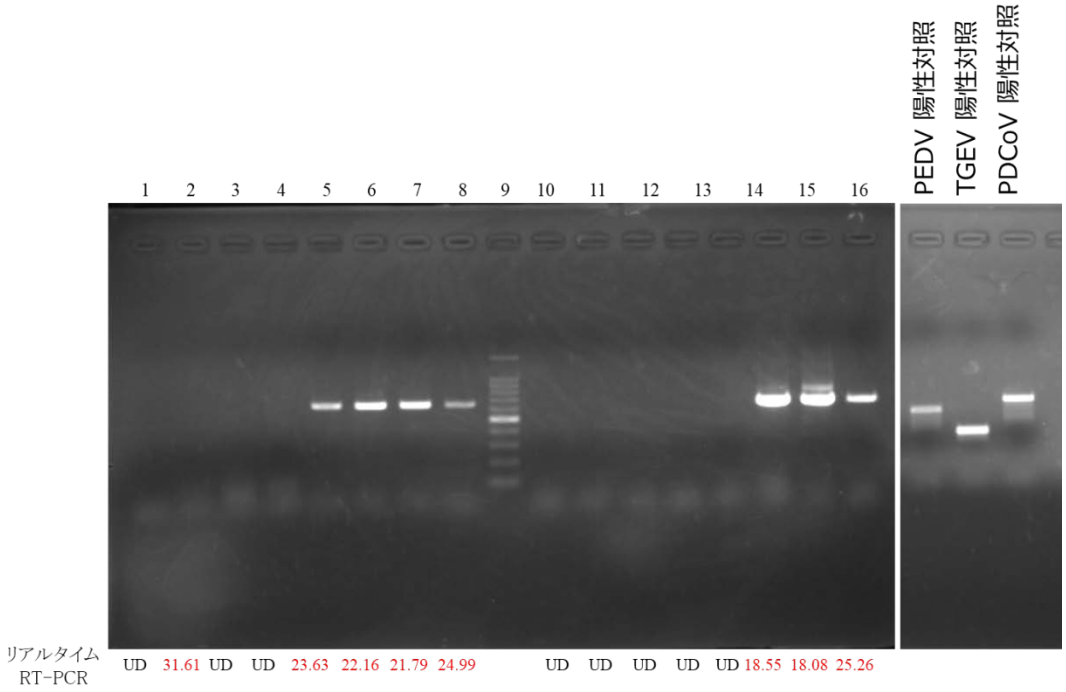


図7　野外材料による検証②
UD：未検出、赤い数字は PDCoV 遺伝子検査陽性検体（Ct 値）

【工程表の⑥】

感染実験より得られた血清及び野外血清 100 検体を用いて中和試験と ELISA の検出感度、特異性の比較を行った。ELISA は前年度の結果から作業が容易な ELISA キット A を採用した。中和試験で感染実験由来血清を検査すると接種後 4～7 日目に抗体が検出され、14 日目までには最大値となった。ELISA では接種後 7 日目から検出され、14 日までに最大値となった。また、中和抗体が検出されたにもかかわらず ELISA では陽性閾値に達しない検体が 1 検体あった（図8）。

野外血清における比較では中和抗体価が 2 倍以下から 512 倍までの様々な検体を準備した（図9）。中和抗体価 2 倍以下の検体はいずれも ELISA では陰性と判定されたが、中和抗体価が 2～16 倍の陽性検体が ELISA の判定では 7 割ほどが陰性となった。検討した ELISA の抗原は組換えヌクレオキャプシドのため、単純に比較はできないが中和試験と比べて特異性、検出感度ともにやや劣っていため、使用する場合は注意が必要と考えられた（図9）。（平成29年度）

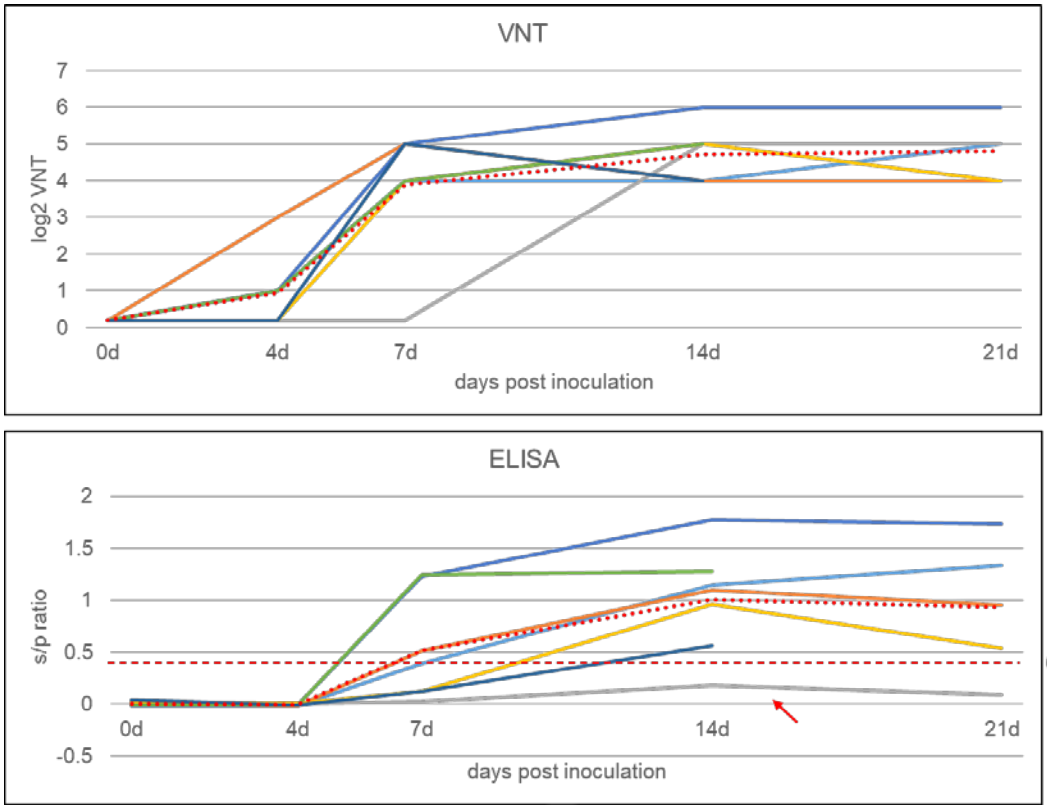
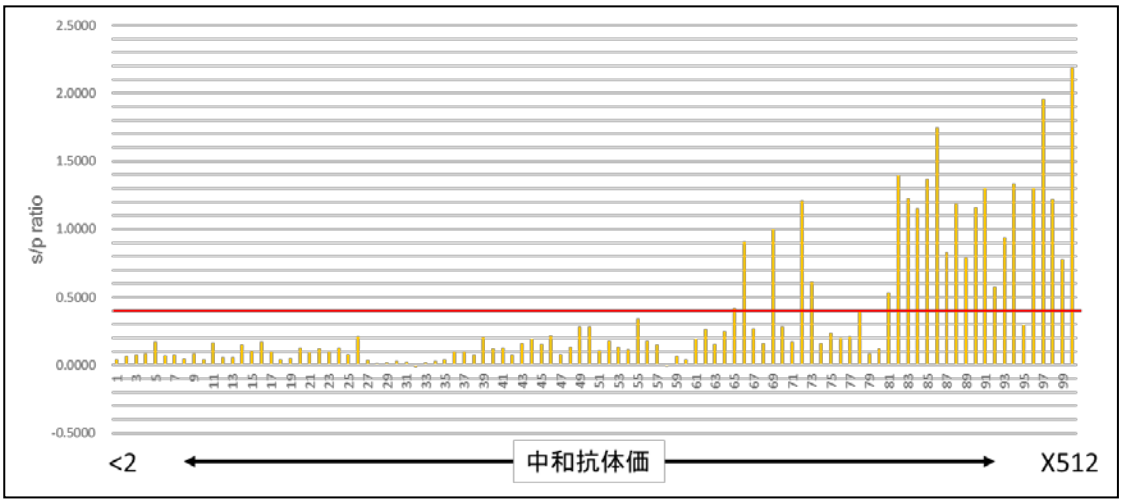


図８　感染実験由来血清を用いた中和試験(上)と ELISA(下)の比較
上下のグラフで同一色は同一検体。赤の折れ線は平均値。ELISA の閾値は 0.4。
下段グラフ中の赤い矢印は陽性とならなかった検体



中和抗体価	<2	2	4	8	16	32	64	128	256	512	合計
検体数	60	5	5	5	6	5	6	3	1	4	100
平均S/P比 ±SD	0.106 ± 0.073	0.258 ± 0.103	0.524 ± 0.396	0.478 ± 0.450	0.259 ± 0.174	1.378 ± 0.229	0.973 ± 0.283	0.858 ± 0.524	—	1.371 ± 0.590	

図９　中和抗体価と S/P 比の分布（図中赤線は陽性閾値）