

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 都道府県 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	← 遺伝子検査法の確立および検証 →		
(2) 新たな抗体検出法の確立あるいは検証	← 抗体検査法の検討および検証 →		
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	← 体内分布に関する解析 →		
(2) 豚における PEDV の感染と伝播に関する解析	← 最小有効感染量推定のための解析 → ← ウイルスの排泄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 宮崎綾子	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	△ 宮崎綾子 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	○ 宮崎綾子	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 川嵩健司 大橋誠一 宮崎綾子 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	△ 宮崎綾子 大橋誠一 芝原友幸 川嵩健司 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 TCID₅₀/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局限していた。(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 10¹⁰copies/g の高いウイルス遺伝子量が検出され、接種 4~6 週間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、10³、10⁵ 及び 10⁷ 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、10⁷ 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 豚の下痢に關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 關連)(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 關連)(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 關連)(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 關連)(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 關連)(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 關連)(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)

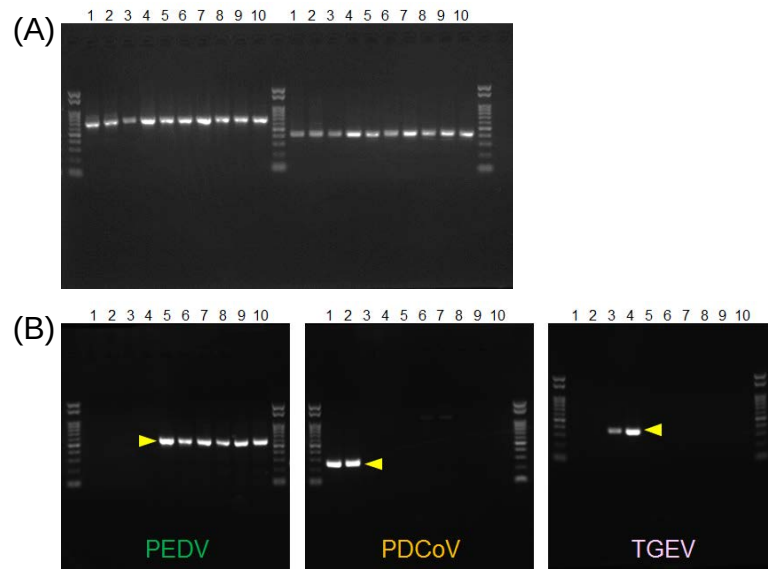


図1 コロナウイルス特異的(A)および種特異的プライマー(B)による増幅
1-2:PDCoV、3-4:TGEV、5-10:PEDV。コロナウイルス特異的および種特異的プライマーはそれぞれ用いたコロナウイルス全てを特異的かつ副反応なく増幅した。また豚の下痢あるいは糞便から検出されるロタウイルスやピコルナウイルスでは遺伝子が増幅されないことを確認した(結果省略)。

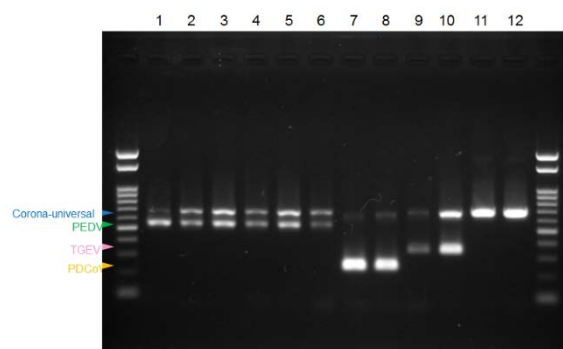


図2 効率的なコロナウイルス遺伝子の検出(マルチプレックス RT-PCR 法)
1-6: PEDV 分離株、7-8:PDCoV、9-10:TGEV、11-12:牛コロナウイルス。マルチプレックス RT-PCR 法においても用いたウイルスにおいて特異的にウイルス遺伝子の検出が確認された。

【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)		(B)			
抗血清	CV777	分離株			
		国内流行株 (1996年)	国内流行株 (2013年)	INDELs (2014年)	SL-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
△SL-del(2014年)	-	-	1280	640	1280

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 肥育豚 1	×1280	×640	×640
ショナル 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 $10^{0.5}$ TCID₅₀/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)

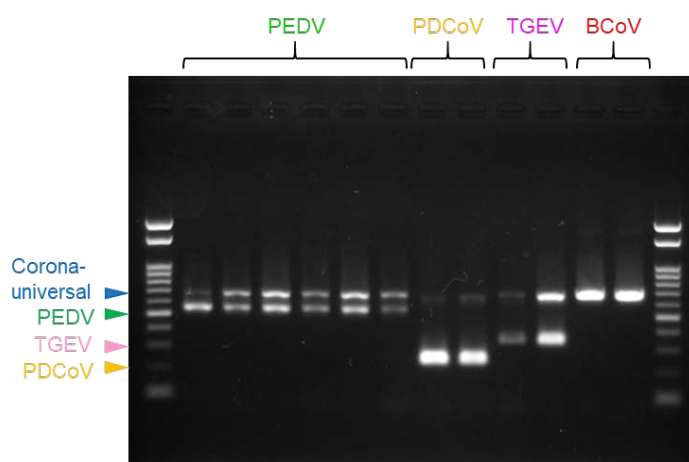


図3 マルチプレックス RT-PCR によるコロナウイルス遺伝子の検出

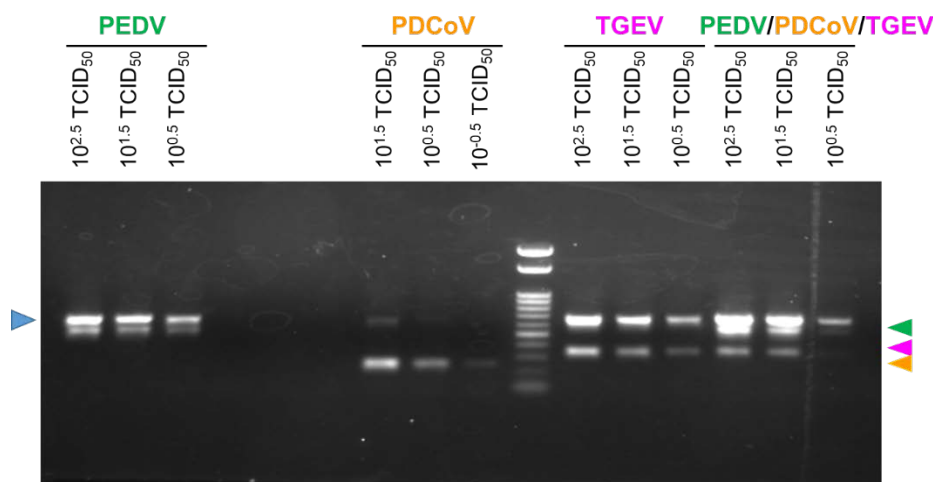


図4 培養ウイルスによる検出感度の比較

【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）

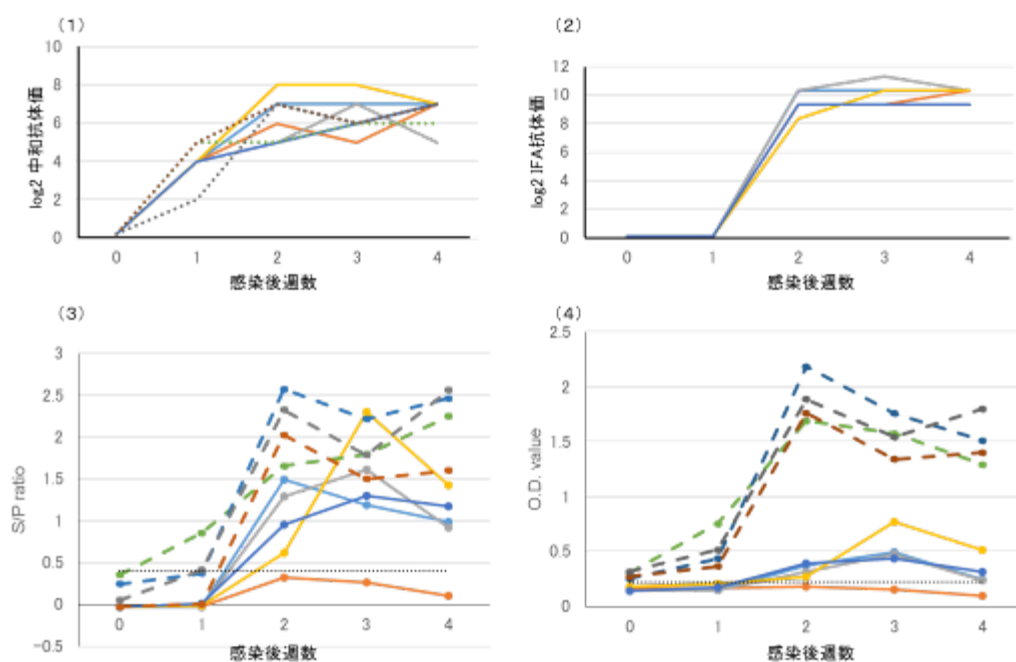


図 5 各種抗体検査法による抗体価の推移の比較

（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）

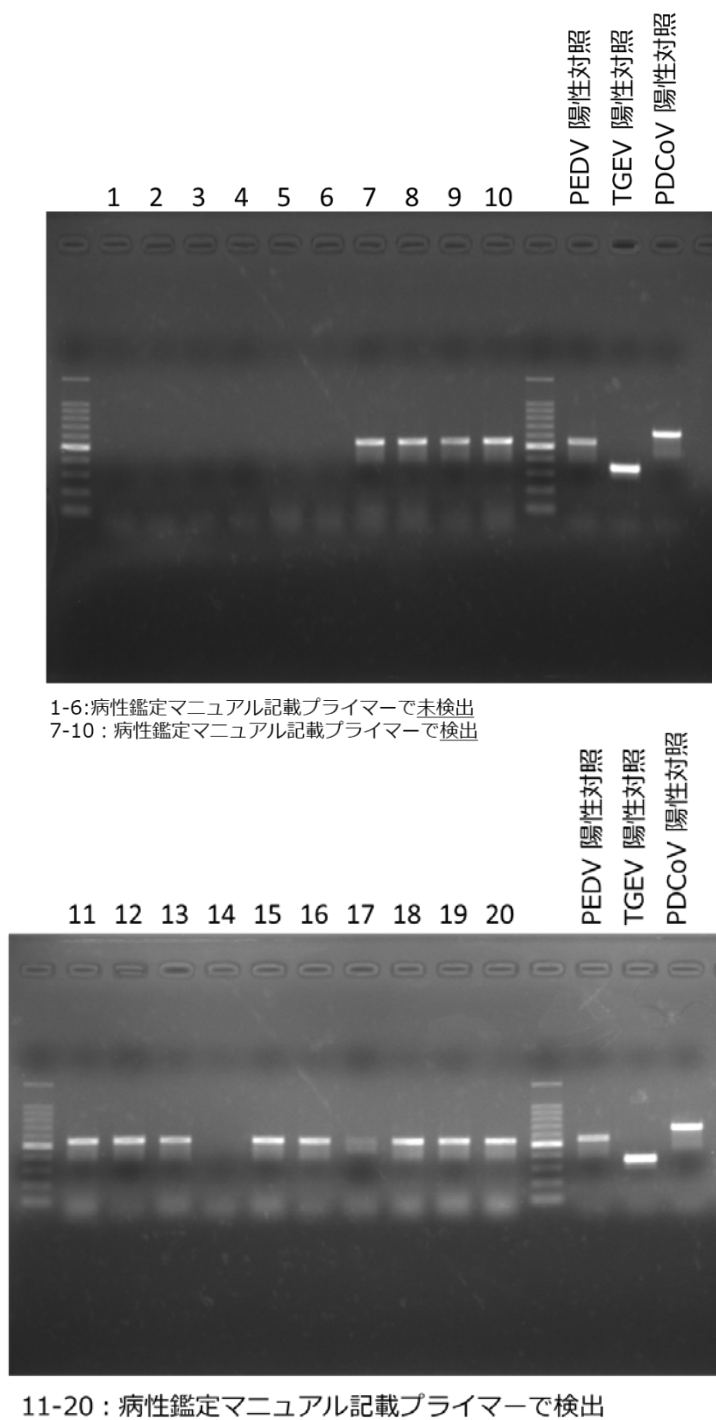


図6 野外材料による検証①

レーン 7-10 及び11-20 は PEDV 遺伝子検査で陽性の検体

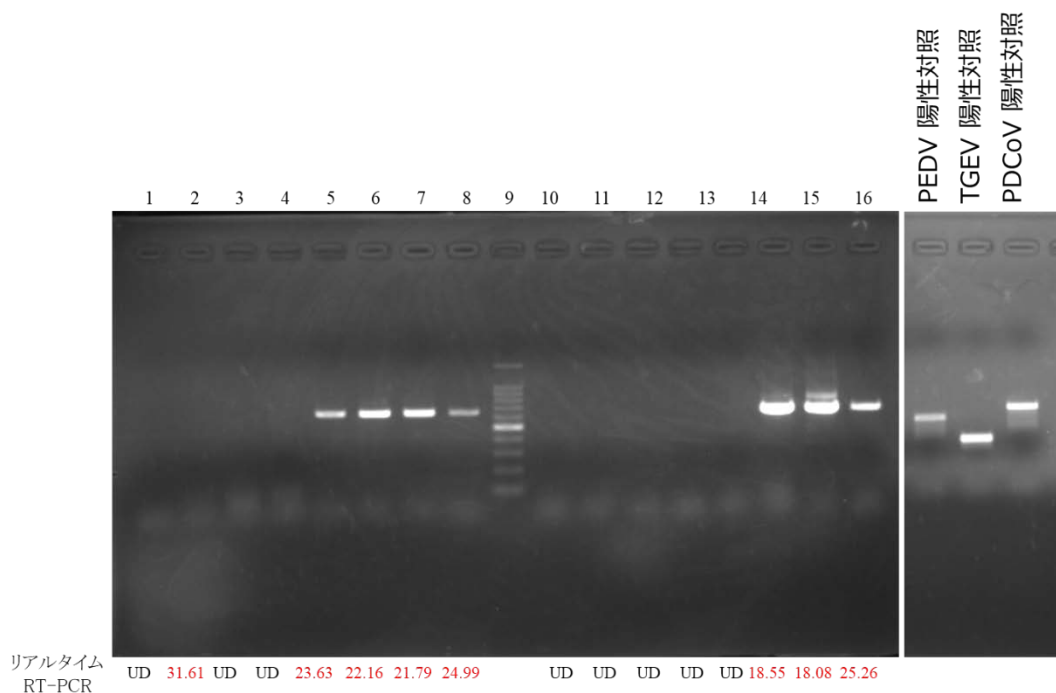


図7 野外材料による検証②
UD:未検出、赤い数字は PDCoV 遺伝子検査陽性検体 (Ct 値)

【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)

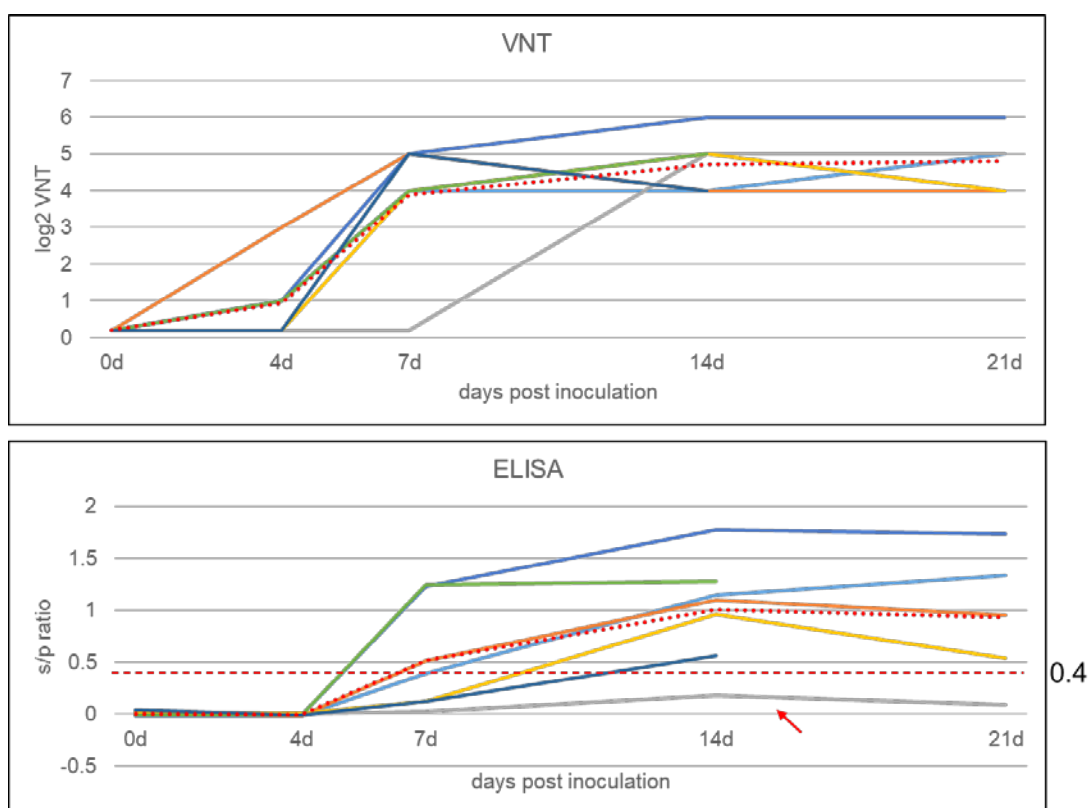
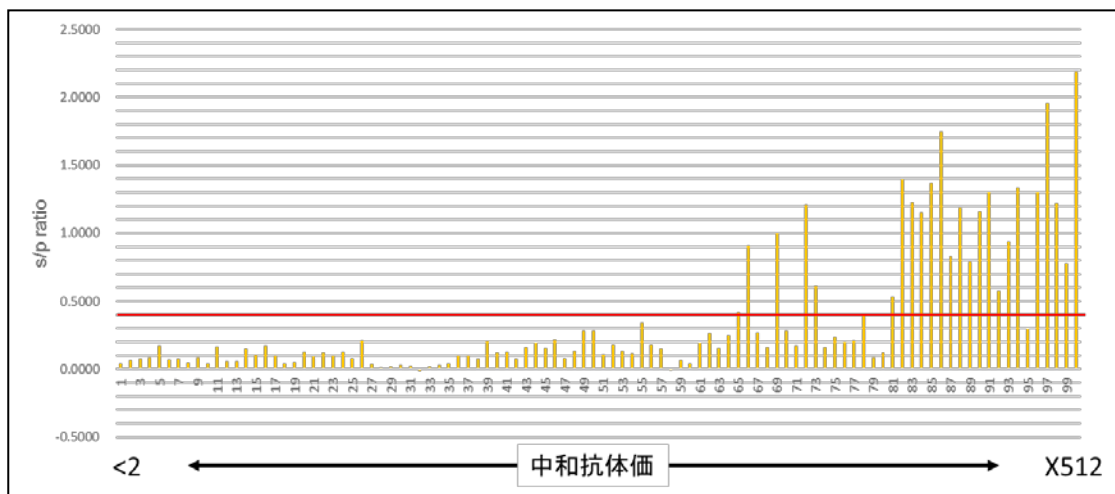


図8 感染実験由来血清を用いた中和試験(上)と ELISA(下)の比較
 上下のグラフで同一色は同一検体。赤の折れ線は平均値。ELISA の閾値は 0.4。
 下段グラフ中の赤い矢印は陽性とならなかった検体



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)

(ウ) 成果目標に対する達成状況

効率的に PEDV のみならず、その他の豚コロナウイルスについても特異性を維持しながら同時に複数のウイルスを検出可能な検査手法を確立できた。確立した検査法は病性鑑定マニュアルに記載されている方法と同程度の検出感度を示した。また、抗体検査はこれまでよりも短時間での抗体検出を目指し、検査当日に結果が得られる間接蛍光抗体法を確立した。さらに、多検体処理が可能な市販の ELISA 法の検証を行ったが、現行法中和試験に比べて検出感度、特異性ともに劣る結果であった。確立した検査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、国内における豚の下痢のサーベイランスおよび診断体制の強化につながると考えられる。

イ 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)の研究成果の概要

(ア) 工程管理及び成果目標

工程表
① 離乳豚を用いた感染試験を行い、ウイルス増殖部位の検索を行う。(小課題 1 関連)。(平成 27 年度)
② 接種量を変えた感染試験を行い、離乳豚の感染成立に必要なウイルス量の推定を行う。(小課題 2 関連)。(平成 27 年度)
↓
③ 肥育豚を用いた感染試験を行い、ウイルス増殖部位の検索を行う。(小課題 1 関連)。(平成 28 年度)
④ 接種量を変えた感染試験を行い、肥育豚の感染成立に必要なウイルス量の推定を行う。(小課題 2 関連)。(平成 28 年度)
↓
⑤ 繁殖豚を用いた感染試験を行い、ウイルス増殖部位の検索を行う。(小課題 1 関連)。(平成 29 年度)
⑥ 変異ウイルスの感染実験による病態解析を行う。(小課題 2 関連)。(平成 29 年度)
成果目標：個体レベルでの PEDV の感染動態を明らかにし、伝播リスクや伝播経路の推定に利用可能な知見を得る。また、遺伝的に差のある分離株間の病態の比較を行う。

(イ) 各工程の進捗状況及び成果

【工程表の①】

哺乳豚(16 日齢)及び離乳豚(21 日齢)での感染動態を調べた。哺乳豚では接種後 3～5 日目に下痢や軟便が観察されたが、接種後 28 日目までに死亡する豚は認められなかった。糞

便中のウイルス遺伝子は接種 2 日目から検出され、7 日目まで高い遺伝子量(10^{10} copies/g)が検出されたが、その後減少した。離乳豚では接種後 1～7 日目に下痢や軟便、食欲不振が観察され、10 日目までに症状は消失し、接種後 56 日目までに死亡する豚は確認されなかった。糞便中のウイルス遺伝子は、接種後 2 日目から全頭で検出され、 10^{10} copies /g 以上の高いウイルス遺伝子量が約 1 週間検出され、その後減少し、28 日目以降は検出限界以下であった(図10)。一方、血清中では、接種 1 日目からウイルス遺伝子は検出され、糞便中の遺伝子量の 1/100,000 以下のウイルス遺伝子が検出された。(平成27年度)

さらに、21 日齢豚での増殖部位を検索するため経時的に解剖し、ウイルスの体内分布を調べた。PEDV 遺伝子は接種 3 日目では腸管全域、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節、28 日目及び 56 日目では小腸のみで検出されたが、PEDV 抗原は接種 3 日目の小腸と腸間膜リンパ節でのみ確認された(図11、表3)。(平成28年度)

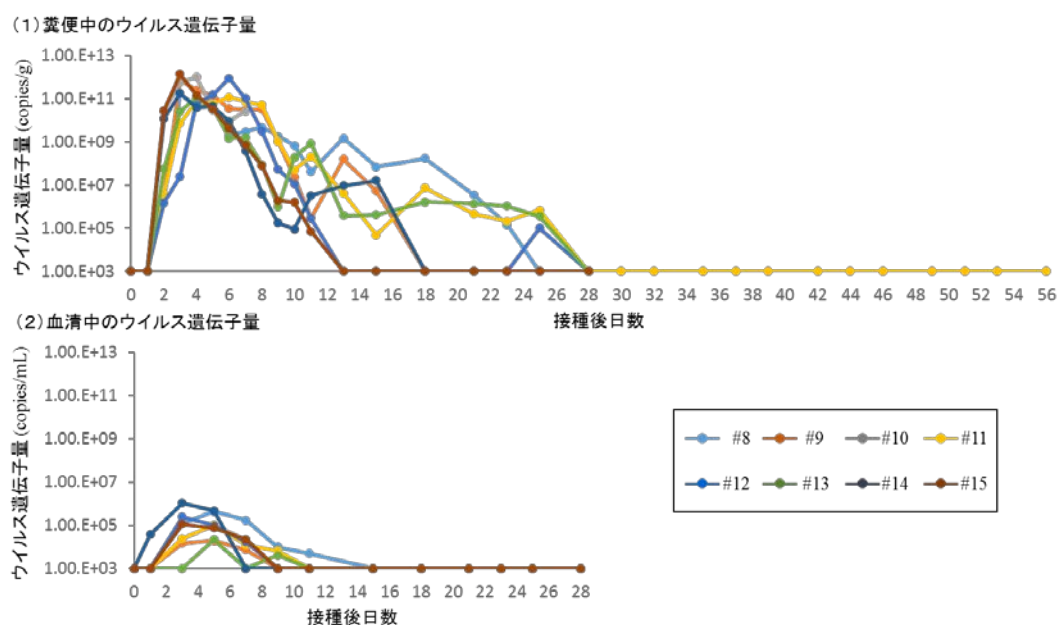


図 1 0 PEDV 感染離乳豚(21 日齢)の(1)糞便中および(2)血清中の PEDV 遺伝子量

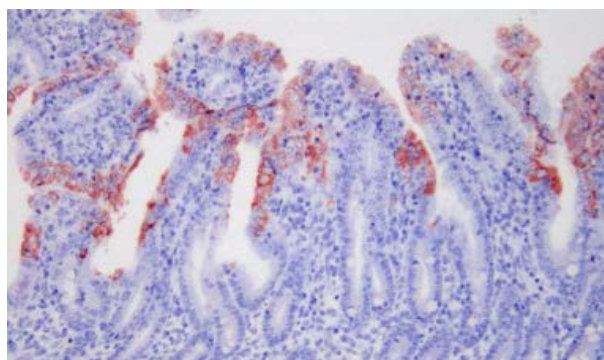


図11 感染離乳豚の接種後 3 日目の空腸上部(豚 No.4)。

粘膜上皮細胞の細胞質に PEDV 抗原(茶色の部分)が確認される。

表3 接種3日目の離乳豚の PED ウイルス抗原の体内分布

群	番号	雌雄	十二指腸	空腸上部	空腸中部	空腸下部	回腸	腸間膜リンパ節
感染群	1	去勢	+	++	++	+++	+++	+
	2	去勢	+	++	+++	+++	+++	+
	3	去勢	—	++	+++	ND	+++	+
	4	♂	+	++	+++	+++	++	+
	5	♂	—	+	+++	+++	+++	+
	6	♀	+	++	+++	+++	+++	—
	7	♀	+	++	++	++	++	—
非感染群	40	♂	—	—	—	—	—	—
	41	♀	—	—	—	—	—	—

PEDウイルス抗原陽性細胞 +++: 多数、++: 中程度、+: 少数、—: なし、ND: 検査せず

【工程表の②】

16 日齢の子豚 5 頭に PEDV $10^{4.2} \sim 10^{4.5}$ TCID₅₀/頭を経口接種したところ、全頭が接種後 2～3 日目に下痢や嘔吐を発症し、接種後 21 日目の糞便からもウイルス遺伝子が検出された（図 1 2）。また、中和抗体及び IFA 抗体は接種 1 及び 2 週目からそれぞれ検出され、その後最大抗体価となった（図 1 3）。（平成 2 7 年度）

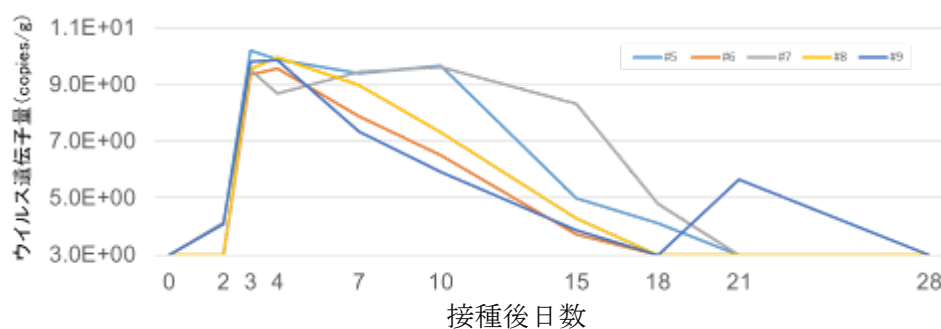


図12 PED ウイルス感染哺乳豚(16 日齢)の糞便中の PED ウイルス遺伝子の検出
接種豚は接種後 1～7 日目に下痢や軟便、食欲不振を呈し、10 日目までには症状は消失した。糞便中のウイルス遺伝子は、接種 3 日目から全頭で検出され、最大 10^{10} copies /g のウイルス遺伝子が約 1 週間検出された。

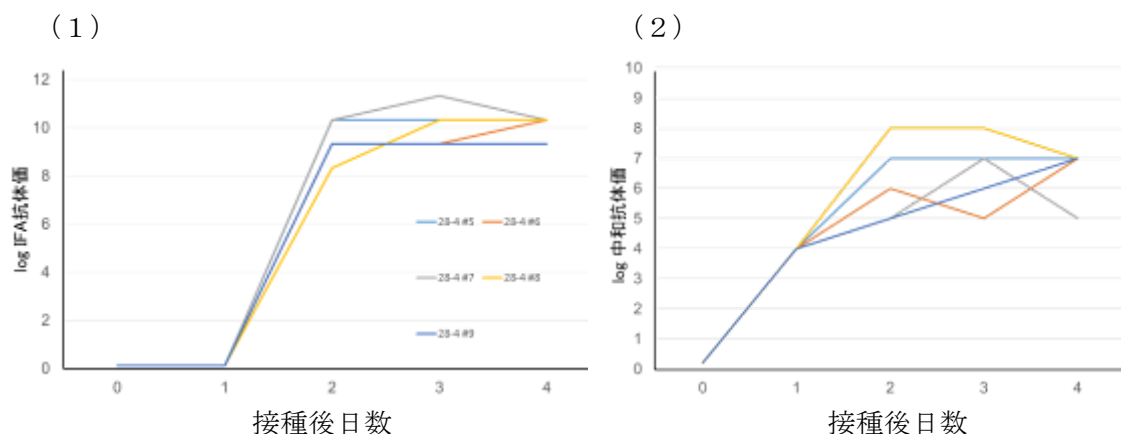


図13 PEDウイルス感染哺乳豚(16日齢)の抗体価の推移

(1) IFA抗体、(2) 中和抗体。中和抗体は接種後7日目、IFA抗体は接種後14日目に抗体が検出(5頭/5頭)された。

【工程表の③】

肥育豚に経口的にウイルスを $10^{3.2} \sim 10^{2.2}$ TCID₅₀/頭接種し、経時的にウイルスの体内分布を調べたところ、接種4日目では腸管全域、腸間膜リンパ節のほか、一部臓器からもウイルス遺伝子が検出されたが、接種30日目では空腸中部から大腸および腸間膜リンパ節から検出された(表4)。一方、病理学的検索では同時期の空腸及び回腸の粘膜上皮細胞にウイルス抗原が確認された(図14)。(平成27年度)

表4 肥育豚接種4日目および30日目でのウイルス遺伝子の体内分布

	胃	十二指腸	空腸上部	空腸中部	空腸下部	回腸	盲腸	結腸	直腸	腸間膜リンパ節
接種4日目	UD*	11.3 [†] 7.8	11.3 7.4	10.8 6.3	10.6 6.6	10.8 9.8	8.7 7.1	8.6 8.1	9.2 7.2	UD 4.8
接種30日目	UD UD	UD UD	UD UD	UD 8.8	8.9 UD	9.5 9.3	7.5 UD	6.5 UD	6.4 6.1	7.7 7.1

	鼻腔粘膜	気管	肺	胸線	心臓	肝臓	腎臓	脾臓	鼠径リンパ節	筋肉
接種4日目	5.2 UD	7.1 UD	UD UD	9.8 UD	5.5 UD	5.7 UD	6.8 UD	5.6 5.0	9.3 8.8	UD UD
接種30日目	UD UD	UD UD	UD UD	— —	UD UD	UD UD	UD UD	5.7 UD	— —	UD UD

*: 検出せず、[†]: copies/mL

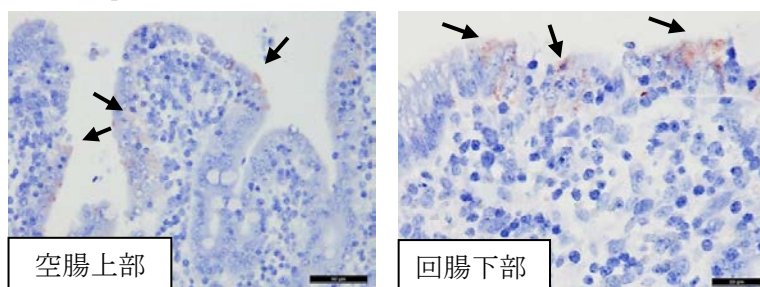


図14 感染肥育豚(発症4日目)の小腸におけるウイルス抗原の分布(矢印)

【工程表の④】

肥育豚に接種ウイルス量を変えて経口接種し、感染および発症の有無を観察した。高用量 ($10^{3.2}$ TCID₅₀/頭) および中用量接種群 ($10^{2.2}$ TCID₅₀/頭) では接種後 2 日から下痢と食欲不振が観察されたが (図15)、低用量接種群 ($10^{1.2}$ TCID₅₀/頭) では接種後 3 週目までに臨床症状および抗体の陽転が見られなかったことから、感染成立に必要なウイルス量は $10^{1.2} \sim 10^{2.2}$ TCID₅₀/頭と推定された (表5)。(平成27年度)



図15 PED ウイルス感染肥育豚の臨床症状

表5 感染成立に必要なウイルス量(最小感染量)の推定

接種材料	ウイルス遺伝子量 (copies/dose)	ウイルス感染価 (TCID ₅₀ /dose)	発症までの日数	中和抗体検出日
HPCD豚継代	$10^{11.7}$	—	接種後2日	接種後7日
HPCD豚継代	$10^{8.7}$	—	接種後2日	接種後7日
Vero細胞継代	$10^{6.4}$	$10^{3.2}$	接種後2日	接種後7日
Vero細胞継代	$10^{5.4}$	$10^{2.2}$	接種後2日	接種後7日
Vero細胞継代	$10^{4.4}$	$10^{1.2}$	発症せず	検出せず

【工程表の⑤】

妊娠豚 3 頭に $10^{11.7}$ copies/dose のウイルスを経口的に接種し、臨床症状の発現と糞便中へのウイルス排泄量を測定した。接種後 2 日目に 2 頭が嘔吐、1 頭が下痢を示した。糞便中のウイルス遺伝子は 3 頭で接種後 2 日目から 7 日目まで高用量のウイルス遺伝子が検出され、その後減少しながら観察終了時である接種後 28 日目でもウイルス遺伝子は検出された (図 1 6)。また、実験期間を通して血中からウイルス遺伝子は検出されなかった。

分娩 1 週前に接種した妊娠豚及びその産子を分娩日に解剖したところ、母豚及び娩出された哺乳豚の消化管においてウイルス遺伝子が検出された。また、母豚の乳汁・乳腺・生殖器・生殖腺、筋肉及び子宮内に残存していた胎子 (3 頭) の諸臓器からはウイルス遺伝子は検出されなかった (表 6)。分娩 4 週前に PEDV を経口接種した妊娠豚の産子を分娩日及び生後 7 日齢時に解剖した結果、分娩日解剖の初乳未接種豚と哺乳豚の諸臓器ではウイルス抗原は検出されなかったが、7 日齢哺乳豚 8 頭中 1 頭の空腸中部及び下部においてウイルス抗原が検出された。(平成 2 9 年度)

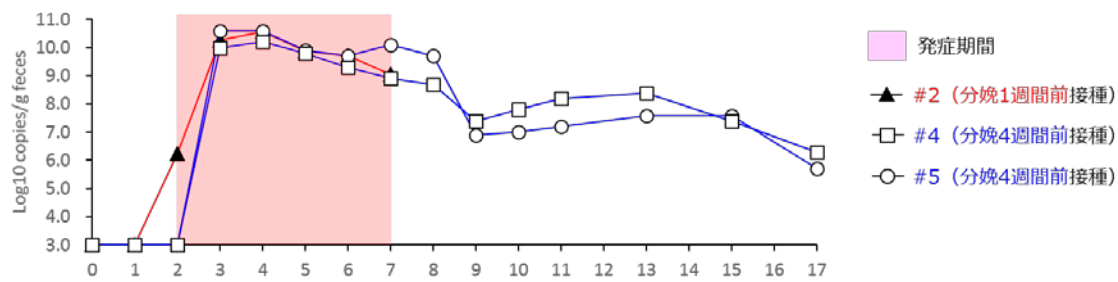


図16 PEDウイルス感染妊娠豚の糞便中のPEDウイルス遺伝子の検出

表6 分娩1週間前にウイルス接種した妊娠豚及びその子豚の分娩時のウイルス遺伝子の体内分布

	胃	十二指腸	空腸上部	空腸中部	空腸下部	回腸	盲腸	結腸	直腸	腸間膜リンパ節
妊娠豚	UD*	6.8†	6.5	6.9	7.3	9.2	7.0	7.2	6.6	8.4
娩出子豚1	4.9	-	8.4	6.6	6.4	6.4	-	-	-	UD
" 2	UD	-	5.2	UD	UD	UD	-	-	-	UD
" 3	5.1	-	UD	UD	UD	UD	-	-	-	UD
" 4	UD	-	10.3	9.7	8.5	5.6	-	-	-	6.7
" 5	4.8	-	UD	6.6	UD	UD	-	-	-	UD
子宮内胎子1	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-	-	-	UD
" 2	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-	-	-	UD
" 3	UD	UD	UD	UD	UD	UD	-	-	-	UD

*: 検出せず、†:copies/mL

これまで実施してきた感染実験の解析結果からウイルスの排泄量の経時的変化を明らかにしたが、実際に感染豚由来の糞便の豚への感染リスクは不明だった。重要な感染源である糞便の感染リスクの解明を行う必要があると考えられたことから、試験研究課題運営チームと相談の上、これに係る研究を工程表⑥「変異ウイルスの感染実験による病態解析を行う」に代えて実施した。

感染豚由来のウイルスを含む糞便材料を作製し、それらを用いて感染閾値の推定を試みた。3週齢の離乳豚に $10^{4.2} \sim 10^{4.5}$ TCID₅₀/頭のウイルスを経口接種し、経時的に糞便及び血清を採取し、ウイルス遺伝子量および培養細胞を用いて感染価を測定した（図17）。

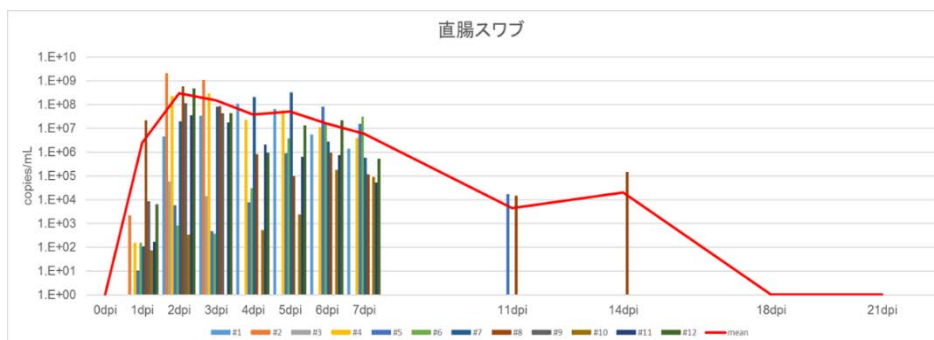


図17 感染離乳豚の直腸便からのウイルス遺伝子の検出

また、接種後3、7、及び14日に解剖し、腸管およびその内容物のウイルス遺伝子量および感染価も測定した。腸管及び腸内容物のウイルス遺伝子量は接種後3日で最も多く、遺伝子量は腸管内容物よりも腸管乳剤の方が10~100倍多かった。その後、接種後28日目では2頭中1頭の空腸下部でウイルス遺伝子が検出された（図18）。一方、感染価は接種後3日目が最も高く、空腸では $10^4 \sim 10^6$ TCID₅₀/mL のウイルスが検出された（図19）。（平成29年度）

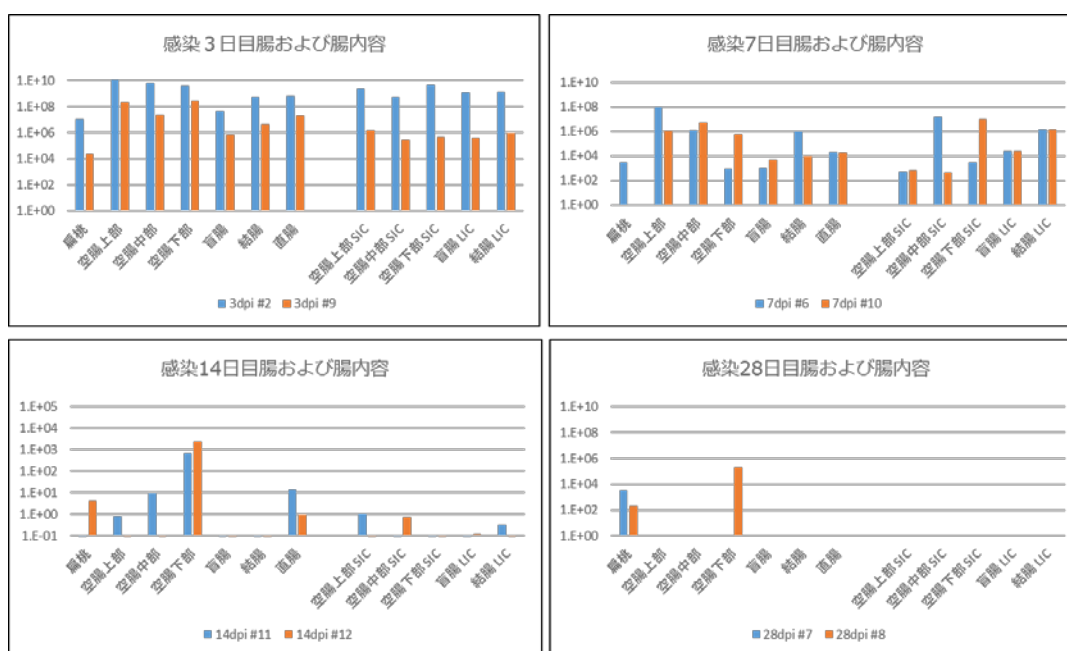


図18 接種3、7、14及び28日目の腸管および腸内容中からのウイルス遺伝子の検出

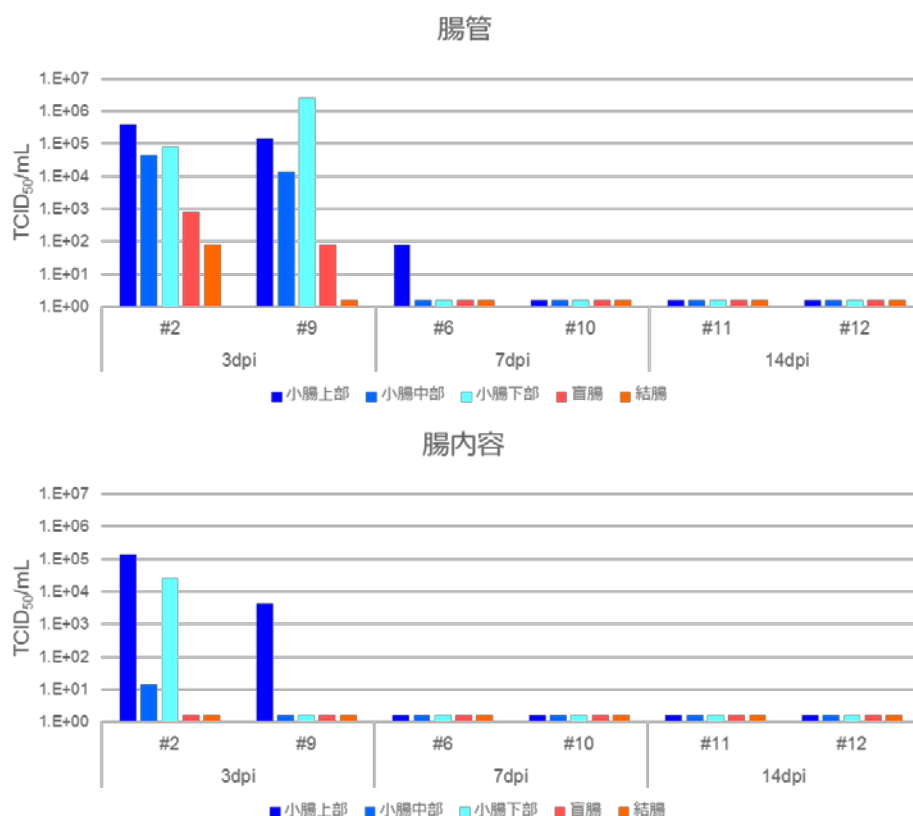


図19 接種 3, 7, 14 及び 28 日目の腸管および腸内容物中からのウイルス分離

これまでの感染実験の結果から感染を成立させるには 10^2 TCID₅₀/mL 以上のウイルスが必要であると推定されたことから、上記の感染実験から得られた $10^3 \sim 10^7$ copies/mL ($10^2 \sim 10^5$ TCID₅₀/mL に相当) の直腸スワブ乳剤を 24 日齢の子豚に経口接種し、経時的に臨床的観察及び採材を実施した。 10^3 及び 10^5 copies/mL 接種群では実験期間を通してウイルス遺伝子の糞便への排泄及び抗体応答は確認されなかったが、 10^7 copies/mL 接種群では接種後 2～3 日目に下痢が観察され、糞便中にウイルス遺伝子 ($10^7 \sim 10^9$ copies/mL) が検出され、接種後 14 日には中和抗体が接種した 4 頭全てから検出されたことから感染が成立したと判断された (図 20、表 7)。

以上のことから、離乳豚が感染するには接種豚由来の糞便に 10^7 copies/mL のウイルス遺伝子量が必要であり、接種後約 7 日間は 10^7 copies/mL またはそれを超えるウイルス遺伝子量が検出されていることから、この時期は感染が拡大する可能性が高いと考えられた。

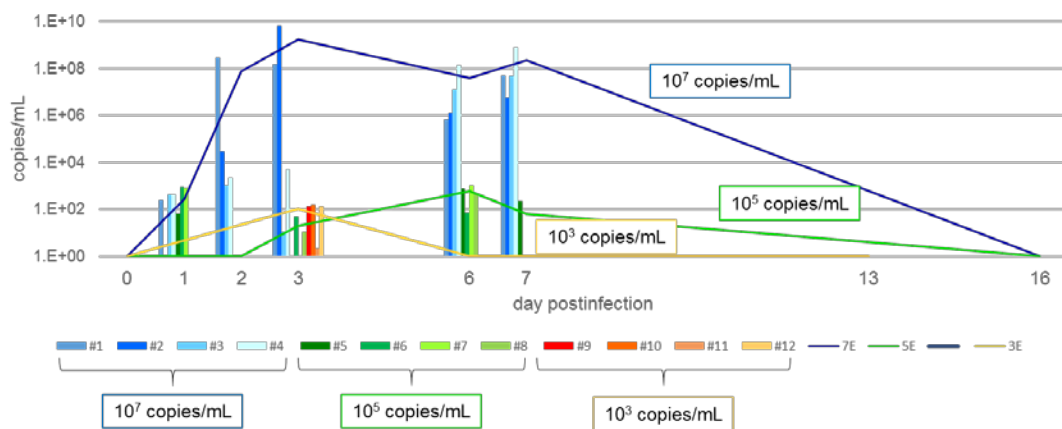


図20 糞便乳剤接種豚の直腸便中のウイルス遺伝子の検出

表7 糞便乳剤接種豚の中和抗体価

接種後 日数	10 ³ copies/mL				10 ⁵ copies/mL				10 ⁷ copies/mL			
	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#1	#2	#3	#4
0dpi	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
14dpi	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	×32	×32	×16	×16

(ウ) 成果目標に対する達成状況

哺乳豚、離乳豚、肥育豚及び妊娠豚を使用した感染実験を通して、個体レベルのウイルス排泄動態（期間及び排泄量）を解析し、当初計画になかった感染豚由来の糞便の豚での感染性についても検討を行った。また、感染豚体内のウイルス抗原あるいは遺伝子の検出を行い、感染極期及び回復期におけるウイルスの体内分布を解析した。得られた結果はPEDの伝播リスクや感染源を推定するための有用な知見になると考えられる。遺伝的に差のある分離株の病態解析は実施出来なかったが、これまでに得られた結果で対応可能と考えられる。

5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）

別紙の（3）～（8）のとおり

6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

高精度かつ効率的な検査手法の確立では遺伝子検査法及び迅速な抗体検査法の確立を試みた。効率的で従来法と同等の検出感度の遺伝子検査法が確立された。本検査法の精度を維持するためには、定期的な野外のウイルスとプライマーの塩基配列の比較が必要である。また、抗体検査法の検討では多検体処理に向いている ELISA を検証したが、十分な検査感度ではなかったことから、今後 ELISA による抗体検査を実施するためには新たな検査法の開発が必要であると考えられる。

感染豚におけるウイルスの動態等に関する研究では当初の目標通り、個体レベルでの PEDV の感染動態を解析し、伝播リスクの高い臓器や期間を推定した。また、変異ウイルスの感染動態の解析は実施できなかったが、今回得られた結果をもとに推定することは可能であると考えられる。

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	コロナウイルスによる豚の下痢を呈する伝染性疾病(豚腸管コロナウイルス性疾病)の検査手法の開発及び体内動態解明に係る研究
---------	---

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用しう る成果の 有無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
2703	4	有	1		3	1	2						無

(1)研究推進会議等の開催実績
区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	平成27年度第1回研究推進 会議	平成27年7月23日	農林水産省消費・安全局第 2・3会議室	15名	有	本研究課題の全体説明および今年度の研究計画 の説明
①	平成27年度第2回研究推進 会議	平成28年2月10日	農林水産省消費・安全局第 2・3会議室	15名	有	今年度の研究成果の説明および来年度の研究計 画の説明
①	平成28年度研究推進会議	平成29年3月6日	農林水産省本省	10名	有	当該年度の実施内容及び次年度の実施計画の 検討
①	平成29年度研究推進会議	平成30年2月13日	農林水産省本省	9名	有	当該年度の実施内容及び3年間の実施結果全体 の総括

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	豚流行性下痢を検出する遺伝子検査、免疫染色法、及びその他感染実験成績に基づくウイルス動態等	各都道府県の家畜保健衛生所で実施する病性鑑定及び農場宛てリーフレット等	検査法については、現行の体制を見直す際に併せて活用する予定

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
「離乳後問題となる疾病」 芝原 友幸, 宮崎 綾子, 生澤 充隆, 山口 遼作, 松林 誠 日本豚病研究会報、66巻, p22-25 2015年8月	動物衛生研究所

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
Prolonged and massive excretion of porcine epidemic diarrhea virus RNA in feces of experimentally infected pigs at finisher age. A. Miyazaki, M. Chanthol, T. Suzuki, S. Ohashi, M. Ikezawa, T. Shibahara, M. Yamakawa. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Kyoto, Japan, June 2015.	動物衛生研究所
「豚流行性下痢ウイルス2013年国内分離株の肥育豚における病原性と同居豚への伝播」 宮崎綾子、伊藤咲江、鈴木亨、生澤充隆、川島健司、山川睦、芝原友幸、大橋誠一 第158回日本獣医学会学術集会 2015年9月	動物衛生研究所
「国内で再興した豚流行性下痢ウイルスに対する研究の現状と展開」 宮崎綾子 農研機構シンポジウム「国際化する農業における動物衛生研究の展開」 2015年11月	動物衛生研究所
「豚のコロナウイルス感染症(豚流行性下痢)」、芝原友幸、第159回日本獣医学会学術集会、(平成27年9月7日)	農研機構 動物衛生研究部門

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
④	PEDウイルスの正体、徐々に明らかに！ 宮崎 綾子, 芝原 友幸, 鈴木 亨, 大橋 誠一 アニマル・メディア社 (Pig Journal), 2015年10月	動物衛生研究所
①	「母豚・子豚に関する疾病のアップデート」豚流行性下痢(PED)と口蹄疫 新母豚全書 増補版 監修:伊東正吾 岩村祥吉 芝原友幸 緑書房 2018 印刷中	農研機構 動物衛生研究部門

(6) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考