

【原 著】 産業動物

2014年の北海道における豚流行性下痢ウイルスの
分子疫学的解析川内 京子¹⁾ 小岸 憲正²⁾ 横田 高志³⁾

1) 十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59番地 6)

2) 空知家畜保健衛生所 (〒079-0181 岩見沢市岡山町12番37号)

3) 釧路家畜保健衛生所 (〒084-0917 釧路市大楽毛127番地の 1)

要 約

2014年4月～2015年2月に道内24養豚場で検出された豚流行性下痢 (PED) ウイルス34株を用いてS1遺伝子領域の分子疫学的解析を実施した。いずれの株も2013～2014年に北米で検出された株と同一あるいは近縁であった。北海道株間での塩基配列の一致率は98.9～100%であり、最大23塩基の置換が認められた。北海道株は分子系統樹上大きく3系統に分かれ、同一農場由来株は塩基置換が起きた後も同じ系統に属していた。系統2の株はいずれも同じ地域の系列農場から検出されたが、他の系統株は広範な地域から検出された。また、各系統と検出時期との関連は低かった。同一あるいは極めて近縁な株が検出された一部の農場間で、子豚飼料や飼料運搬業者、と畜場などに共通点が認められたが、ウイルスの侵入経路やまん延要因の特定には至らなかった。北海道におけるPEDの発生は北米株と近縁な複数の株が複数回侵入して起きたと考えられた。

キーワード：豚流行性下痢、PED、分子疫学的解析

-----北獣会誌 61, 439～445 (2017)

豚流行性下痢 (PED) ウイルス (PEDV) は、コロナウイルス科、アルファコロナウイルス属に属し、PEDの原因となるウイルスである。PEDは水様性下痢を主徴とする豚の急性感染症で、ほ乳豚での死亡率は最大95%にも達する^[1]。PEDVは1978年にベルギーで発見され^[2]、現在、ヨーロッパやアジアの各地で常在化している。わが国においても1980年代前半から散発的に発生が確認されていたが、2006年以降は発生報告がなかった。しかし、2013年4月に米国において初めてとなるPEDの発生が確認され、その後米国各地へと急速に感染が拡大したのに続いて、2013年10月1日に、わが国では7年ぶりとなるPEDの発生が沖縄県で確認された。その後国内各地で発生が相次ぎ、北海道でも2014年4月11日以降28件 (2016年3月31日時点) の発生が確認され、特に2014年4～7月に集中発生した。

PEDVは感染豚の糞便中に排泄され、主に経口感染す

ることで伝播する^[3]。米国での発生および感染拡大の原因に関しては、これまでに数多くの調査・研究が行われてきた。米国の6カ所のと畜場で行われた調査では、PEDVに汚染された家畜運搬車両の割合は家畜の荷下ろし後に上昇しており、車両や作業員の移動に伴った農場間でのPED伝播が示唆されている^[4]。また、疫学調査の結果から、汚染飼料が感染源と考えられる事例も報告されている^[5,6]。

PEDの道内への侵入経路および感染拡大原因を明らかにし、今後のまん延防止対策の一助とするため、道内で検出されたPEDVの分子疫学的解析を行ったので、その成績を報告する。

材料および方法

2014年4月～2015年2月にPEDの発生が認められた道内24農場で採材された豚糞便由来のPEDV遺伝子34

連絡責任者：川内 京子 十勝家畜保健衛生所

〒089-1182 帯広市川西町基線59番地 6

TEL : 0155-59-2021 FAX : 0155-59-2571 E-mail : kawachi.kyouko@pref.hokkaido.lg.jp

株 (表 1) について分子系統樹解析を実施した。豚糞便から High Pure Viral RNA kit (Roche、スイス) を用いて抽出した RNA を鋳型として、OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN、ドイツ) を用いて Lee らの方法^[7]によりスパイクタンパクの変領域 (S1 遺伝子) 2,254塩基を RT-PCR 法で増幅し、RT-PCR 法でのプライマーおよびこ

れまでに報告されている標準株の塩基配列を基に、新たに設計した 6 つのプライマーを用いたダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。使用したプライマーは表 2 に示した。次に、得られた塩基配列を基に S1 遺伝子 2,245 塩基について分子系統樹解析を行った。解析には Lasergene (DNASTAR、Wisconsin USA) を用い、分子系統樹解析では道内で検出された 34 株に加えて、塩基配列情報が公開されている海外分離株約 450 株との比較を行った。また、23 戸の発生農場の疫学的関連を評価するため、利用していると畜場、豚回収業者、飼料運搬業者、飼料製造業者について聞き取り調査を行った。

表 1. PEDV 遺伝子株の由来

| 検体No. | 振興局 | 農場No. | 採材年月日 | 由来 |
|-------|-----|-------|-----------|--------|
| 1 | | | 2014/4/10 | 繁殖豚腸内容 |
| 1-2 | A | 1 | 2014/4/10 | 繁殖豚腸内容 |
| 1-3 | | | 2015/2/6 | 哺乳豚腸内容 |
| 1-4 | | | 2015/2/6 | 哺乳豚腸内容 |
| 2 | A | 2 | 2014/4/14 | 繁殖豚腸内容 |
| 3 | D | 3 | 2014/4/28 | 哺乳豚腸内容 |
| 4 | A | 4 | 2014/5/3 | 繁殖豚腸内容 |
| 5 | E | 5 | 2014/5/10 | 肥育豚腸内容 |
| 6 | E | 6 | 2014/5/10 | 哺乳豚腸内容 |
| 7 | | | 2014/5/11 | 哺乳豚腸内容 |
| 7-2 | E | 7 | 2014/5/11 | 哺乳豚腸内容 |
| 7-3 | | | 2014/9/2 | 哺乳豚腸内容 |
| 8 | E | 8 | 2014/5/13 | 哺乳豚腸内容 |
| 9 | A | 9 | 2014/5/22 | 繁殖豚腸内容 |
| 10 | | | 2014/6/6 | 繁殖豚腸内容 |
| 10-2 | A | 10 | 2015/1/22 | 哺乳豚腸内容 |
| 10-3 | | | 2015/1/22 | 落ち糞 |
| 11 | | | 2014/6/14 | 哺乳豚腸内容 |
| 11-2 | A | 11 | 2014/6/19 | 落ち糞 |
| 11-3 | | | 2014/7/3 | 落ち糞 |
| 12 | B | 12 | 2014/4/17 | 哺乳豚腸内容 |
| 13 | B | 13 | 2014/4/18 | 哺乳豚腸内容 |
| 14 | B | 14 | 2014/5/2 | 落ち糞 |
| 15 | B | 15 | 2014/5/21 | 哺乳豚腸内容 |
| 16 | B | 16 | 2014/5/22 | 哺乳豚腸内容 |
| 17 | F | 17 | 2014/5/1 | 落ち糞 |
| 18 | C | 18 | 2014/5/13 | 哺乳豚腸内容 |
| 19 | C | 19 | 2014/5/21 | 哺乳豚腸内容 |
| 20 | C | 20 | 2014/5/24 | 哺乳豚腸内容 |
| 21 | G | 21 | 2014/5/29 | 哺乳豚腸内容 |
| 22 | D | 22 | 2014/7/18 | 哺乳豚腸内容 |
| 23 | B | 23 | 2014/7/16 | 落ち糞 |
| 24 | A | 24 | 2015/2/7 | 落ち糞 |
| 24-2 | | | 2015/2/7 | 落ち糞 |

表 2. プライマー塩基配列

| (1) RT-PCR 用プライマー | | | |
|---|---------------------------------|-------------|-------------|
| プライマー名 | 配列 (5'→3') | | 結合部位※ 増幅サイズ |
| S-Fwd-1 | ACG TAA ACA AAT GAA GTC TTT | 20628-20648 | 2254bp |
| S-Rev-1 | ATA CAC CAA CAC AGG CTC TGT | 22861-22881 | |
| ※CV777株 (Accession no: AF353511) における結合部位 | | | |
| (2) シークエンス用プライマー | | | |
| プライマー名 | 配列 (5'→3') | | |
| S-F-646 | CTT AAT GTT ACT AGT GCT GGT GAG | | |
| S-R-680 | GAA ATA CCA TCC TCA CCA GCA CTA | | |
| S-F-1250 | TCG GTT TGT TGG ATG CTG TCA C | | |
| S-F-1807 | GAT CTT TTT GGT TAC CCT GAG TTT | | |
| S-R-1271 | GTG ACA GCA TCC AAC AAA C | | |
| S-R-1831 | CAA ACT CAG GGT AAC CAA AAA GAT | | |

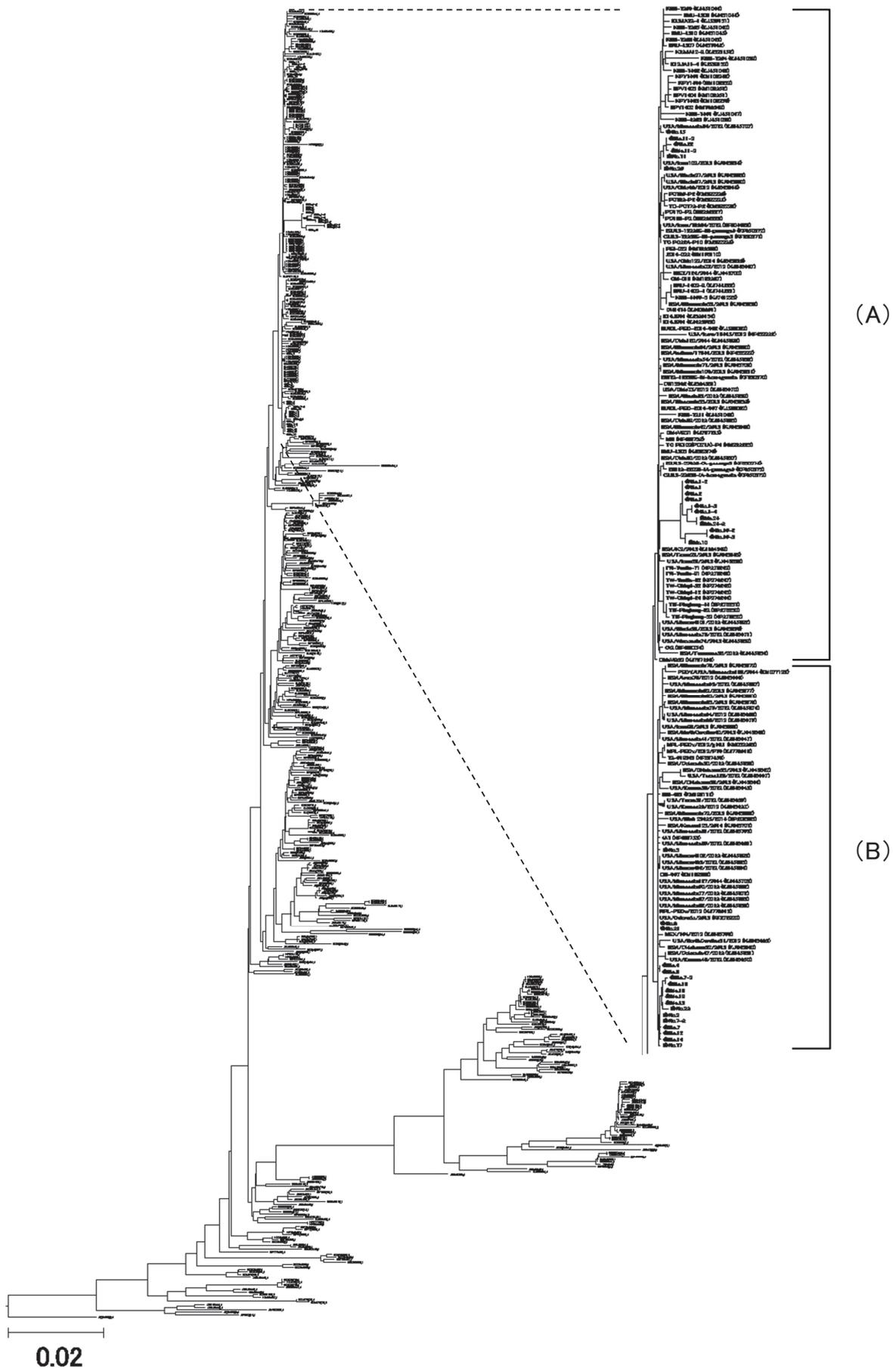


図1. S1遺伝子2,245塩基による分子系統樹解析に基づく系統樹

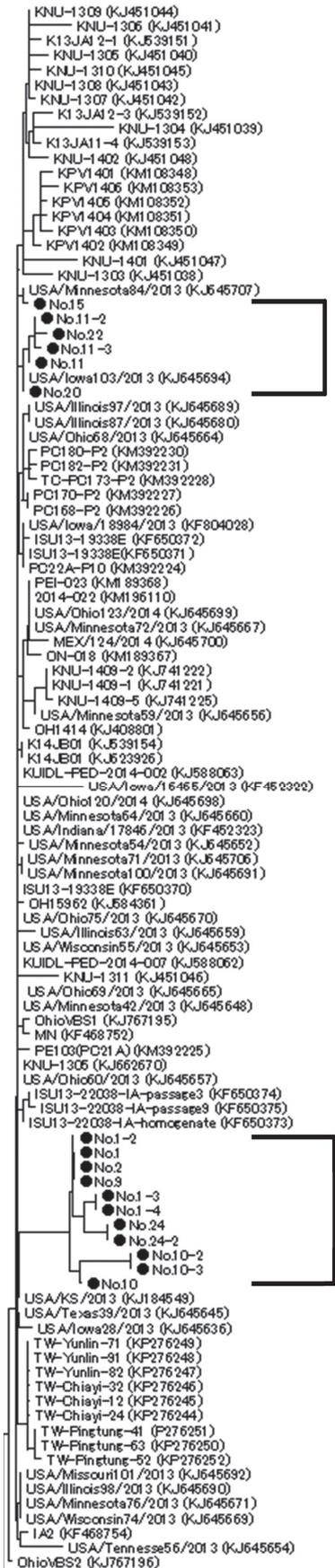
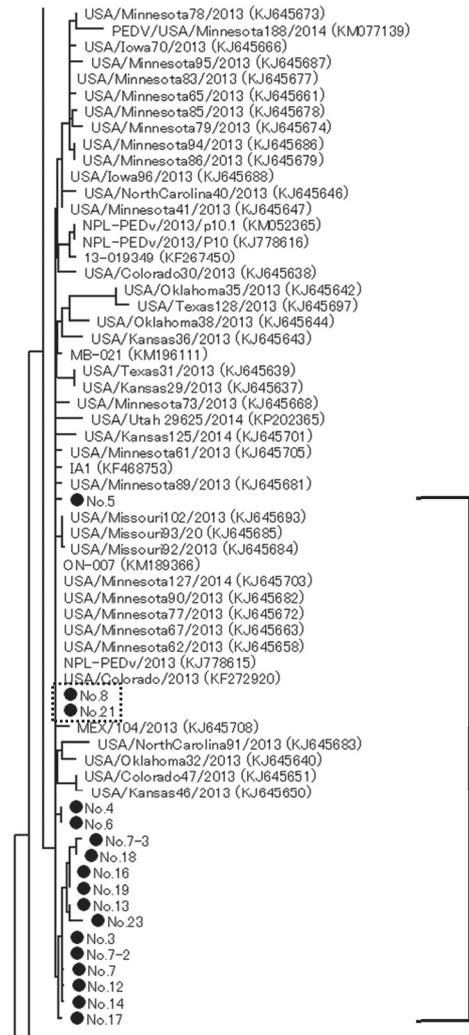


図 2. (A) 部分の拡大図

系統1

系統2



系統3

図 3. (B) 部分の拡大図

は約10カ月後の株で4塩基(4.8塩基/年)、No.7株の農場では約4カ月後の株で3塩基(9塩基/年)、No.10株の農場では約7カ月後の株で9塩基(15.4塩基/年)、No.11株の農場では約2週間後の株で1塩基、さらに2週間後の株で1塩基の変異(24塩基/年)が認められた。同一農場由来株は、塩基置換が起きた後でも同じ系統に属していた。変異はいずれも塩基の置換であり、挿入や欠失は認められなかった。

3. 系統内での塩基の同源性

各農場での初発材料由来のウイルス株において、複数株で同じ位置に塩基の置換が確認され、これらの箇所の配列は各系統内でよく保存されていた(表3-1)。このような保存領域は計12カ所確認された。これら12塩基の変異のうち、8塩基はアミノ酸の変異を伴っていなかった。また、系統1に特に近縁であった北米株(Iowa 103/2013)および系統3に特に近縁であった北米株(ON-007)についても、これらの12塩基の特徴は一致してい

表 3. 系統内での塩基の相同性及び海外株との比較

表 3-1. 北海道株

| 系統 | 検体No. | 相対位置 | | | | | | | | | | | |
|----|-----------------------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 87 | 609 | 757 | 843 | 1090 | 1110 | 1161 | 1179 | 1181 | 1456 | 1568 | 2050 |
| 1 | 11、15、20、22 | C | T | G | C | T | C | C | A | T/C | C | G | T |
| 2 | 1、2、9、10、24 | T | C | A | T | T | C | C | A | C | A | A | C |
| 3 | 3~8、12~14、16~19、21、23 | C | T | G | C | C | T | T | T | C/A | C | G | T |

表 3-2. 海外株

| 株名 | 由来 | 相対位置 | | | | | | | | | | | |
|--------------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 87 | 609 | 757 | 843 | 1090 | 1110 | 1161 | 1179 | 1181 | 1456 | 1568 | 2050 |
| CV777 | 欧州 | T | T | G | C | C | C | C | T | C | C | G | T |
| Iowa103/2013 | アメリカ | C | T | G | C | T | C | C | A | T | C | G | T |
| ON-007 | カナダ | C | T | G | C | C | T | T | T | C | C | G | T |

注) 相対位置とは、解析を行った2245bp中の位置を示す。

表 4. 各系統のS1遺伝子の塩基配列一致率および採材間隔

表 4-1. 系統 1

| No. | 11 | 15 | 20 | 22 |
|-----|----|----|----|----|
| 11 | | | | |
| 15 | 24 | | | |
| 20 | 21 | 3 | | |
| 22 | 34 | 58 | 55 | |

表 4-2. 系統 2

| No. | 1 | 2 | 9 | 10 | 24 |
|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 1 | | ★ | ★ | | |
| 2 | 4 | | ★ | | |
| 9 | 42 | 38 | | | |
| 10 | 57 | 53 | 15 | | |
| 24 | 303 | 299 | 261 | 246 | |

表 4-3. 系統 3

| No. | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 12 | 13 | 14 | 16 | 17 | 18 | 19 | 21 | 23 |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 3 | | | | | ★ | | ★ | | ★ | | | | | | |
| 4 | 5 | | | ★ | | | | | | | | | | | |
| 5 | 12 | 7 | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 12 | 7 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 13 | 8 | 1 | 1 | | | ★ | | ★ | | | | | | |
| 8 | 15 | 10 | 3 | 3 | 2 | | | | | | | | | ★ | |
| 12 | 11 | 16 | 23 | 23 | 24 | 26 | | | ★ | | | | ★ | | |
| 13 | 10 | 15 | 22 | 22 | 23 | 25 | 1 | | | | | | | | |
| 14 | 4 | 1 | 8 | 8 | 9 | 11 | 15 | 14 | | | | | | | |
| 16 | 24 | 19 | 12 | 12 | 11 | 9 | 35 | 34 | 20 | | | | ★ | | |
| 17 | 3 | 2 | 9 | 9 | 10 | 12 | 14 | 13 | 1 | 21 | | | | | |
| 18 | 15 | 10 | 3 | 3 | 2 | 0 | 26 | 25 | 11 | 9 | 12 | | | | |
| 19 | 23 | 18 | 11 | 11 | 10 | 8 | 34 | 33 | 19 | 1 | 20 | 8 | | | |
| 21 | 31 | 26 | 19 | 19 | 18 | 16 | 42 | 41 | 27 | 7 | 28 | 16 | 8 | | |
| 23 | 79 | 74 | 67 | 67 | 66 | 64 | 90 | 89 | 75 | 55 | 76 | 64 | 56 | 48 | |

注 1) ★は交差する検体間での塩基配列が完全に一致することを示す。

注 2) 左下の数字は交差する検体間での採材間隔 (日数)。また、塩基配列が完全に一致するものを網掛けで示した。

表 5. PED 発生農場の疫学情報

| 系統 | 農場No. | 振興局 | と畜場 | | | | 廃豚回収業者 | 飼料運搬業者 | | | 子豚飼料製造業者 | | |
|----|-------|-----|-----|---|---|---|--------|--------|---|---|----------|---|---|
| 1 | 11 | A | D | | | | 自社 | A | | | B | | |
| | 15 | B | A | B | | | A | A | D | L | A | E | F |
| | 20 | C | C | | | | H | B | J | | B | D | |
| | 22 | D | E | | | | B | A | G | | B | | |
| 2 | 1 | A | F | G | | | 自社 | A | | | B | | |
| | 2 | A | F | G | | | 自社 | A | | | A | D | |
| | 9 | A | F | | | | 自社 | A | | | A | | |
| | 10 | A | F | | | | 自社 | A | | | A | D | |
| 3 | 3 | D | E | | | | C | C | D | | A | D | |
| | 4 | A | F | G | | | 自社 | A | | | B | | |
| | 5 | E | B | E | F | G | D | C | E | | - | | |
| | 6 | E | E | | | | B | A | F | | B | D | |
| | 7 | E | E | | | | A | A | I | | A | | |
| | 8 | E | B | E | | | B | H | | | A | E | F |
| | 12 | B | A | B | | | A | F | K | | D | | |
| | 13 | B | A | B | | | A | F | | | D | | |
| | 14 | B | A | B | F | G | A | C | | | D | | |
| | 16 | B | A | | | | - | - | | | E | F | |
| | 17 | F | B | | | | B | H | P | | A | E | F |
| | 18 | C | C | | | | G | M | N | O | B | D | F |
| | 19 | C | G | | | | E | H | Q | | B | C | D |
| | 21 | G | G | | | | F | B | | | D | E | |
| 23 | B | A | | | | A | C | D | | E | | | |

注 1) 項目ごとにアルファベットに置き換えて表した。項目間でのアルファベットは対応していない（廃豚回収業者 A と飼料運搬業者 A は異なる）。

注 2) 網掛けで示した部分は特に疫学的に関連が強いと推察される項目。

一方、系統 3 の農場に疫学的関連は認められなかったものの、塩基配列が一致した株の一部（No. 4 と No. 6 および No. 8 と No. 21）では、飼料運搬業者や子豚飼料製造業者に共通点が認められた（表 5）。なお、各系統株の初発検出時期は 7～41 日違っていた。

考 察

2013～2014 年にかけて国内で確認された株には 2 つの型（北米型と INDELS 型）が報告されているが^[8]、道内で確認された株は全て北米型に近縁であった。その中で、北海道株は大きく 3 つの系統に分かれ、系統間の塩基配列の一致率は最大で 99.8%（系統 1 と 3）、最低で 98.9%（系統 2 と 3）であった。2008～2009 年にかけて韓国で分離された 7 株間での S 蛋白領域の塩基配列の一致率が 94.8～97.9%^[7]であったことと比較すると、北海道株の一致率が非常に高いことが分かる。同一農場由来株では、同時期に採材された株間では塩基配列は 100% 一致、2 週間隔で採材したもので 1 塩基、4～10 カ月間隔で 3～9 塩基の置換が認められた。いずれの置換によっても元の株と同じ系統に属し、系統樹上でも近縁であった。

これらの結果から、S1 遺伝子の塩基配列の比較は疫学解析において有用であることが明らかになった。

同一系統内の株間では、検出された農場が利用していると畜場や廃豚回収業者、飼料などに一部共通点が認められるものもあった。これまでの報告で指摘されているとおり、道内の PED 発生事例においても豚の運搬に伴って伝播したと考えられる事例、また、飼料等の輸送に伴って伝播したと考えられる事例が存在していた。全体的に地理的および時間的な関連は低い傾向にあり、同一地域で同時期に採材された株でも一致率が低いものが存在した一方で、異なる地域で採材された株間でも近縁なものが存在した。また、異なる地域で且つ異なる時期に検出された株の一部が、北米の検出株と塩基配列が一致したことは非常に興味深い結果と言える。

海外から国内への PEDV 侵入経路としては血漿タンパクの関与を疑う声もあったが、Opriessnig らが行った感染実験では、PEDV 遺伝子が検出されたとしても、感染性が失われている可能性が高いことが報告されている^[9]。一方、Dee らが行った感染実験では、PED 発生農場の餌容器内残渣を給与することで子豚への感染が成

立することが示されており、飼料等を介して国内へウイルスが侵入した可能性は完全には否定できないとも考えられる^[10]。また、発生農場での環境検査では、畜舎内だけでなく作業者の休憩所のドアノブまで、農場内の非常に広い範囲からPEDVが検出されており（藤岡、第55回全国家畜保健衛生業績発表会）、飼料そのものだけではなく、コンテナなどの輸送設備や作業者の衣服や靴などを介してウイルスが運ばれた可能性も推測される。

今回の解析結果から、PEDVの道内への侵入経路および道内各地へのウイルス伝播経路を特定することはできなかった。しかし、道内でのPEDの発生は、道内での流行前に、関東以北の地域において発生件数が増加していることから^[8]、本州の県を介して海外由来の複数の株が複数回にわたって道内に侵入したためと推測された。さらに、一部のウイルスは運搬車両等によって拡散された可能性があると考えられた。このことから、農場や畜産関連施設で使用した器具や車両の洗浄・消毒を徹底し、さらに石灰帯や消毒槽を活用することは、農場間のPED感染を防ぐための有効な手段であると考えられた。一方で、近縁なウイルスが検出されているにも関わらず疫学的には関連の低い農場も存在しており、PEDVの感染経路については未だ不明な部分も多く残る。現在、道内には大小併せて約300戸の養豚場があるが、発生農場と同じ飼料や運搬業者、と畜場、廃豚回収業者を利用しているもPEDの発生がなかった農場も数多く存在している。今回の聞き取り調査は発生農場のみ実施しているが、今後は非発生農場にも同様の聞き取りを行い、発生に至る要因を明らかにすることが必要である。

北海道では2016年9月に全てのPED発生農場が非発生農場へ復帰し、その後の発生は報告されていない。しかし、本州や九州では依然として発生が続いており、より一層の防疫強化が望まれる。

本解析を実施するにあたりご助言をいただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門北海道研究拠点 恒光裕氏に深謝する。

引用文献

[1] Stevenson GW, Hoang H, Schwartz KJ, Burroughs EB, Sun D, Madson D, Cooper VL, Pillatzki A, Gauger P, Schmitt BJ, Koster LG: Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States;

clinical signs, lesions, and viral genomic sequences, *J Vet Diagn Invest*, 25, 649-54 (2013)

- [2] Pensaert MB, Bouck P: A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine, *Arch Virol*, 58, 243-247 (1978)
- [3] Song D, Park B: Porcine epidemic diarrhea virus; a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines, *Virus genes*, 44, 167-175 (2012)
- [4] Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang J, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R: Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States, *Emerg Infect Dis*, 20, 872-874 (2014).
- [5] Bowman AS, Krogwold RA, Price T, Davis M, Moeller SJ: Investigating the introduction of porcine epidemic diarrhea virus into an Ohio swine operation, *BMC Vet Res*, 11, 38, (2015)
- [6] EFSA Panel on Animal Health and Welfare: Scientific opinion on porcine epidemic diarrhea and emerging pig deltacoronavirus, *EFSA J*, 12, 3877, (2014).
- [7] Lee DK, Park CK, Kim SH, Lee C: Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea, *Virus Res*, 149, 175-182, (2010)
- [8] 農林水産省: 豚流行性下痢 (PED) の疫学調査に係る中間取りまとめ (2014)、(オンライン)、http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/pdf/ped_ekigaku_chukan.pdf, (参照2017-6-14)
- [9] Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Zhang J, Halbur PG: Porcine epidemic diarrhea virus RNA present in commercial spray-dried porcine plasma is not infectious to naive pigs, *PloS one*, 9, 1-10 (2014).
- [10] Dee S, Clement T, Schelkopf A, Nerem J, Knudsen D, Christopher-Hennings J, Nelson E: An evaluation of contaminated complete feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea virus infection of naïve pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept, *BMC Vet Res*, 10, 176, (2014)