

資料

PED 侵入農場における継続的調査報告

小 池 郁 子 (エス・エム・シー株式会社)

Koike F. (2015). The continuous investigation report about pig farms with occurrence of porcine epidemic diarrhea
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 65, 30-33.

キーワード：PED、デルタコロナウイルス、検査

はじめに

エス・エム・シー株式会社 (SMC 株) では、豚の疾病診断ラボとして検査を行っているなかで、平成26年1月頃より豚流行性下痢 (Porcine epidemic diarrhea; PED) 関連の検査数が増加した。特に全国的に PED 初発生農場が爆発的に増加した平成26年4月以降は、その検査農場数および各農場からの検体数の増加だけでなく、各農場での、PED 鎮静化に向けた継続的な PED 関連調査依頼が多くあった。そこで、平成26年1月以降の PED 関連検査状況および、4月以降 PED 感染が確認された農場で、発生直後から鎮静化、そして現時点までの約5か月間の PEDV 核酸の検出状況の変化や抗体検査状況を継続的に調査した事例について報告する。

調査概要

期間 平成26年1月6日～9月14日

検査数および検査材料

調査期間中、PED 関連調査依頼として SMC 株にて検査を行った検体について、下痢原因検索を目的とした材料からの消化器系病原体 (図1) の検出率、PCR 法

による飼料中 PED ウイルス (PEDV) 核酸の有無、PED 発生農場での PEDV 浸潤状況調査、母豚の PEDV 浸潤状況調査、母豚の血清抗体価と発症状況調査、環境中の PEDV 核酸有無確認について調査を行った。農場数および検体数は表1に示した。

結果および考察

1. 下痢原因検索

PED 未発生農場82農場312検体、PED 発生農場62農場256検体の下痢症状を示した豚の腸管内容物および下痢便からの消化器系疾病の病原体検出率は、未発生農場ではクロストリジウムの検出率は7.4% (23/312)、ロタウイルスの検出率は4.2% (13/312) だったのに対し、PED 発生農場ではそれぞれ19.1% (48/256) および5.1% (13/256) であった。また、PEDV による下痢と類似の水様下痢便の中には、PEDV は検出されずデルタコロナウイルスやクロストリジウムとロタウイルスの感染が認められたものや、クロストリジウムとロタウイルスと同時に PEDV 感染が認められたものも多くあった。(図1)

PED 発生農場での PEDV の検出率が13.7% (35/256) と低かった。この理由として、PED 発生初期の材料は少なく、PED での下痢や死亡が収まった後の

表1 検査目的ごとの農場数および検体数 (2～6 は PED 発生農場)

検査目的	農場数	検体数	検査材料
1 下痢原因検索 (PED未発生農場)	82農場	312検体	下痢症状の腸管および便
下痢原因検索 (PED発生農場)	62農場	256検体	下痢症状の腸管および便
2 飼料汚染状況確認	14農場	95検体	飼料
3 PEDウイルス浸潤状況調査	16農場	458検体	糞便、便スワブ、唾液
4 母豚PEDウイルス浸潤状況調査	2農場	32検体	計画的自然感染母豚の糞便および便スワブ、
5 血清抗体価と発症状況確認	2農場	92検体	血液 (92検体)、血液検体と同一個体の糞便 (30検体) と乳汁 (4検体)
6 環境中汚染状況確認	13農場	321検体	豚舎内拭取りペーパー、ビット側面拭取りペーパー、ビット水、溜め込み槽、汚泥処理水

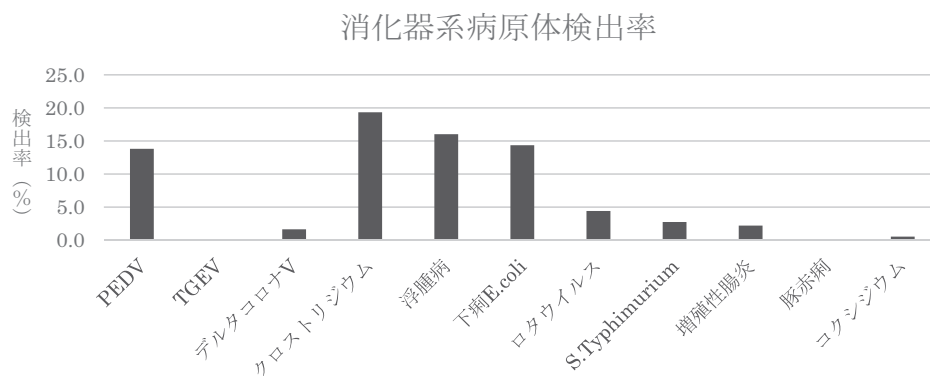


図1 PED 発生農場での消化器系病原体検出率

(PEDV、伝染性胃腸炎ウイルスおよびデルタコロナウイルスは TaqMan PCR 法^{1,3)}の変法、クロストリジウム (*Clostridium perfringens*)、浮腫病菌、病原性大腸菌 (下痢原性 *Escherichia coli*) および *Salmonella* Typhimurium は細菌培養法、増殖性腸炎菌および豚赤痢菌は PCR 法、コクシジウムオーシストはショ糖浮遊法、ロタウイルスは抗原検出キット (栄研) による。)

下痢原因検索として、PED 再発生の確認を目的とした材料が多かったためと考えられた。

2. 飼料中からの PEDV 核酸検出

PED 発生があった14農場の飼料95検体中11検体で PEDV 核酸が PCR 陽性となった。検体の多くは開封された袋から採取したものが多く、農場内でのウイルス汚染の可能性も否定できないが、未開封飼料6検体中2検体が陽性であった。

今回陽性となった11検体はシーケンス解析により PEDV 核酸と判断したが、飼料中からの抽出物には植物由来や、植物に付着したダニなど多くの核酸が含まれるため、複数のバンドが認められることが多く、陽性対照と同一位置で増幅産物が認められてもシーケンス解析により PEDV の核酸ではないことが確認さ

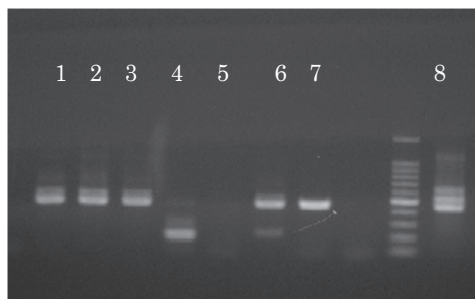


図2 飼料中サンプルからの PEDV Nested PCR^{2)変法)}

1-7: 飼料中サンプル、8: 陽性コントロール

1-3 はシーケンス解析で PEDV 核酸陽性、

4-7: シーケンス解析で PEDV 核酸は否定された。

れた事例もあり、判定には留意する必要があった (図2)。

3. PEDV 浸潤状況調査

PED 発生農場における PED 発生から約2か月間の16農場458検体の下痢から軟便、正常便について、日齢により区分して PEDV 核酸量を比較した。陽性検体の各豚舎飼育豚の平均ウイルス核酸量を図3に呈した。生後2-5日齢の下痢便は平均で 10^7 copy/ul (糞便1g換算値: 10億個 $\leq$) のウイルス核酸が検出され、死亡豚の腸管内容物と10日齢以降の生存豚の平均値は、その100分の1の量であった。また、10日齢以降での生存豚の多くは5日齢以降母豚から離れた仔豚で、母豚と離さなかった仔豚は死亡していたとの稟告であった。PED 発生から2か月間で、各哺乳豚個体中のウイルス排泄量に違いはみられなかった。

PED 発生直後の日齢によるウイルス量と生存状況から、生後すぐに感染し、ウイルスが増加し排泄されていく過程は非常に急速であり、生存している離乳豚では離乳前に発症が見られても、その排泄量は急激に減少していることが予想された。

また、肥育豚で PEDV 核酸の排泄が認められた便は、軟便から正常のもので、便性状から PEDV 排泄の有無を判断することはできなかった。また、図3中の破線は通常の PCR 法²⁾での検出限界を示しており、外部から肥育舎に侵入していたとしても、すぐには発見されない可能性が十分にあることが示された。

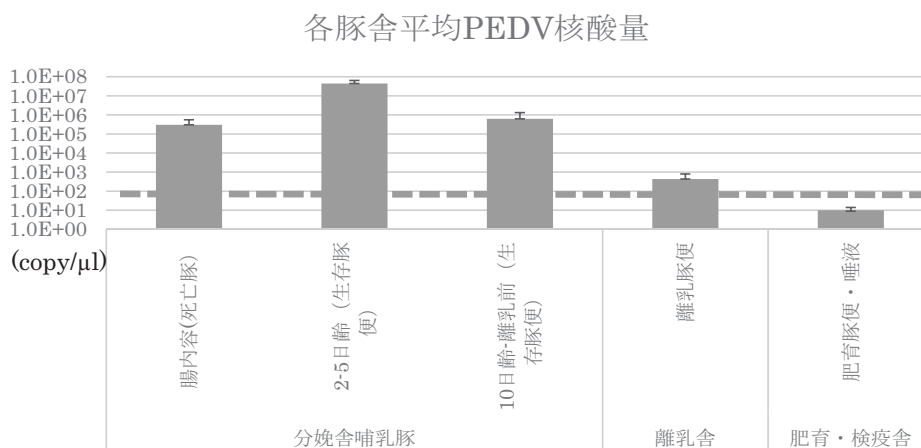


図3 各豚舎陽性検体の平均 PEDV 核酸量 (TaqMan PCR 法¹⁾変法)

破線は通常の PCR²⁾ 検出限界値

(分娩舎哺乳豚 48 陽性検体/135 検体、離乳舎 31 陽性検体/103 検体、肥育舎 21 陽性検体/220 検体の各平均値および標準偏差)

4. 計画的自然感染(馴致)後の母豚糞便からの PEDV 保有状況調査

管理獣医師の指示のもと、PED 発生確認後 2～3 日後より、水様下痢便がみられた哺乳仔豚の腸管ミンチ 3 頭分の水溶液を 1l/50 頭の割合で、分娩前 2 週から授乳中の母豚を除く全母豚の鼻腔および口腔への噴霧を 1 日おきに 3 回実施することで、母豚への計画的自然感染が行われた 2 農場について、臨床症状が記された糞便およびその母豚血液 32 検体について調査した。給与された母豚の便性状は水様下痢便から正常のものがあ、食滞の状況も個体により違いが認められた。母豚の便からの PEDV 排泄量は、排泄されない豚から 10^2 copy/μl～ 10^5 copy/μl までと差があった。また、給与後 1 か月から 2 か月後の母豚の血清中和抗体価も、2 倍～256 倍以上と差が認められた。ウイルス核酸の検出量と抗体価は、食滞と軟便が認められた母豚では、食滞と軟便が認められない母豚より高い傾向があった。

5. 母豚中和抗体価と発症状況の推移

5 月末に分娩舎にて PED が確認された 2 農場において、6 月～9 月までの 4 か月間の分娩舎での母豚各 5 頭の血液からの PEDV の中和抗体価、糞便および一部乳汁中の PEDV 核酸の有無を確認した(表 2)。分娩舎で発症がみられた 2 週間後(採材月 6 月)の母豚抗体価は高かったが、全分娩母豚の哺乳豚で下痢が認められた。その翌月の分娩 7～9 日前の母豚の中和抗体価は個体による差が見られ、下痢発症は 1 割程度の分娩母豚の哺乳豚で認められた。8 月、9 月の中和抗体価はすべて陽性(抗体価 16～128)であり、哺乳豚での下痢発症は認められなかった。

6 月の母豚では糞便および乳汁中からもウイルスの排泄が確認され、高い抗体価があっても、母豚でウイルス排泄が見られ、哺乳豚では下痢発症と死亡が認められた。

表 2 母豚中和抗体価と農場発症状況

採材月	母豚中和抗体価					糞便中 PEDV 核酸陽性数	採材母豚	農場発症状況(母豚 2000 頭規模)
	128	≥256	128	≥256	≥256			
6 月	128	≥256	128	≥256	≥256	3/5	発症 2 週間後母豚	全腹哺乳仔豚で下痢・嘔吐・死亡
7 月	≥256	≥256	≥256	16	8	0/5	分娩 7～9 日前母豚	1 割の腹の哺乳仔豚で下痢・嘔吐
8 月	128	128	64	16	32	0/5	分娩 7～9 日前母豚	下痢ほぼなし
9 月	32	32	32	128	128	0/5	分娩 7～9 日前母豚	下痢ほぼなし

ワクチン歴：6 月分娩よりワクチン 2 回接種済み母豚。5 月末の PED 発生後ワクチン接種を中止した。計画的自然感染終了後 3 週目より、分娩前 2 週でのワクチン接種を再開した。

6. 環境サンプルからの PEDV 核酸汚染状況調査

13農場321検体の環境サンプルからは、PED 発生から約3か月後、PED による哺乳豚の下痢および死亡がほぼ認められなくなり、哺乳豚での PEDV の排泄もみられなくなった後も、分娩舎床の洗浄がしにくい給餌器の裏底や豚舎隅から PEDV 核酸が確認された。さらに便や豚舎床面からウイルス核酸が検出されなくなった後も、13農場中4農場での調査で、3か月以上複数の豚舎のピット22検体中8検体、溜め込み槽20検体中16検体、汚水20検体中4検体から PEDV 核酸が検出された。尚この時期、1農場では、母豚約100頭中2頭から PEDV 核酸が検出されている。

まとめ

農場状況と検査結果より、発生初期に分娩舎でのウイルス量をいかに減らすことができるかが、重要であることが示唆された。発症仔豚の糞便から排泄される PEDV 核酸量は平均で便1g 中約10億個存在し、下痢および死亡頭数が多い初期の時期においては発症豚の下痢便中だけでなく、母豚の便や乳からも PEDV 核酸が検出され、この状況では、母豚に抗体があっても下痢と死亡は抑えられなかったと考えられる。

鎮静後は再発防止のために豚舎内の徹底的な洗浄・消毒が必要で、正常便からもウイルスが確認されたこと、分娩舎の床表面からはウイルス核酸が確認されなくなった後も、床下などから PEDV 核酸が検出されたことから、洗浄不足や洗浄時の跳ね返りにより再感染を起こす可能性が示唆された。このため、洗浄・消毒の目視確認だけでなく、ウイルス核酸の排泄が母豚糞便中でなくなり豚舎内に存在していないことを、拭取り検査による PEDV 検査で確認してから豚を導入することが予防の重要点と考えられた。

そして、PEDV が数か月に亘り豚および環境サンプルから検出されることから、再侵入および未発生農場での PED 侵入防止のためには、バイオセキュリティの見直しが必要であるとともに、万が一農場内に PEDV が侵入した場合の対応を、計画的自然感染の有無を含め、知識と経験の十分ある管理獣医師とともにしておくことが必要である。

今後も継続的な検査を行っていき、PED 発生から鎮静化、清浄化への対策の一助となるような検査データを積み重ねていきたい。

引用文献

- 1) Kim SH, et al. (2007) Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. J Virol Methods, 146: 172-177.
- 2) 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.
- 3) Woo PCY, et al. (2012) Discovery of seven novel mammalian and avian coronavirus in the genus deltacoronavirus supports bat acoronavirus as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. J Virol, 86: 3995-4008.