資　料

これまでの国内外における PED ウイルスの変遷

鈴木　亨、宮﨑綾子、大橋誠一（国立研究開発法人　農業・食品産業技術総合研究機構　動物衛生研究所）

Suzuki, T. , Miyazaki, A. and Ohashi, S. (2016).
Change of pig epidemic diarrhea virus according to transition of time.
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 67, 6-11.

キーワード：豚流行性下痢（PED）、S 遺伝子、変異、欠損

はじめに

2013年10月以降、我が国では 7 年ぶりに豚流行性下痢（Porcine Epidemic Diarrhea: PED）が大流行した。流行株の特徴を把握するためには、原因病原体である PED ウイルス（PEDV）の抗原性や病原性に関与するとされるスパイクタンパク質をコードする遺伝子（S 遺伝子）を中心に解析が行われる。当研究所では、2013年以降全国の家畜保健衛生所から病性鑑定依頼を受けた複数の PEDV 株を用いて、S 遺伝子について解析を行い、2013年以降他国で発生した流行株と比較・解析しながら、我が国における流行株の遺伝的特性を把握することに努めた。本稿では、世界における PED 発生の歴史的背景を含めた PEDV の変遷について概説する。

1．国内外における PED の発生状況概要

PED は1971年に伝染性胃腸炎（Transmissible gastroenteritis:TGE）に類似した CLV（Coronavirus-like virus）を原因とする下痢症として英国で初めて発見された[28]。1978年には、ベルギーにおいて PED が PEDV（その当時 CV777株が分離された）に起因することが明らかとなった[18]。その後（1980年代）、PED はドイツ、フランス、ハンガリー、スペイン、スイスなどの欧州各国で散発的に発生した[2,16,25]。また同じ頃、PED は欧州各国での発生にとどまらず、アジア各国でも発生が認められるようになった。1984年に中国で PEDV が検出されて以来、1990年から2000年代にかけて日本、韓国、そしてタイでも相次いで PEDV が検出された[10,19,20,23]。特に、我が国では1982年から PED の発生が認められていたが、1996年に 9 道県102戸の農場におよぶ大規模な発生が認められ、約 4 万頭の子豚が死亡する事態となった経緯がある[24]。また、中国では2010年10月以降、チベットとハイナン州を除く29州で約100万頭の子豚が死亡する国家規模での発生が報告されている[3]。その後、中国では当時の大発生に至った原因を探るために、PEDV の S 遺伝子に対する解析が実施され、結果的に当時の PEDV 株は1970年代に分離された CV777株と遺伝的に明確に異なることが明らかとなった。また、この原因ウイルスは子豚における高い致死率（80－100%）を特徴とすることから、高病原性（High Pathogenicity）株と称された[4,12,13]。その後、この高病原性 PEDV 株は中国国内で、変異と感染拡大を繰り返してきた。そして、2013年 4 月、米国で初めて PEDV が検出され、わずか 1 年の間にウイルス感染はほぼ米国全土に伝播・拡大し、米国内の養豚産業に深刻なダメージを与えた[9,21]。2013年以降、このような発生は、米国のみならず、カナダやメキシコ、さらにはペルーやドミニカ共和国などの北中南米各国にも拡大していった[17,26]。さらに、米国の大規模発生から半年後には、韓国、台湾、そして我が国を含むアジア各国でも PED が発生し、そして 1 年後にはドイツ、ベルギー、フランスなどの欧州各国でも PED の再発が確認される大惨事となった[5,6,8,11]。

2．国内外 PEDV 株の遺伝学的特徴

図 1 に示すように、1980年代は世界で初めて分離された CV777株に類似した PEDV 株が、アジア各国でも流行・まん延していたと推測される。1990年代に入ってからは CV777株とは遺伝的に異なる株が出現し、それらの株が一時我が国でも流行し、多数の子豚が死に至った。2010年以降は中国で PED の発生が続く中、少なくとも 2 種類の異なる PEDV 株が出現し、感染を繰り広げてきたことが推測される。中でも、AH2012株や CH/ZMDY-11株などの中国由来株は北米で初めて検出された高病原性 PEDV 株（北米型）と遺伝的に近

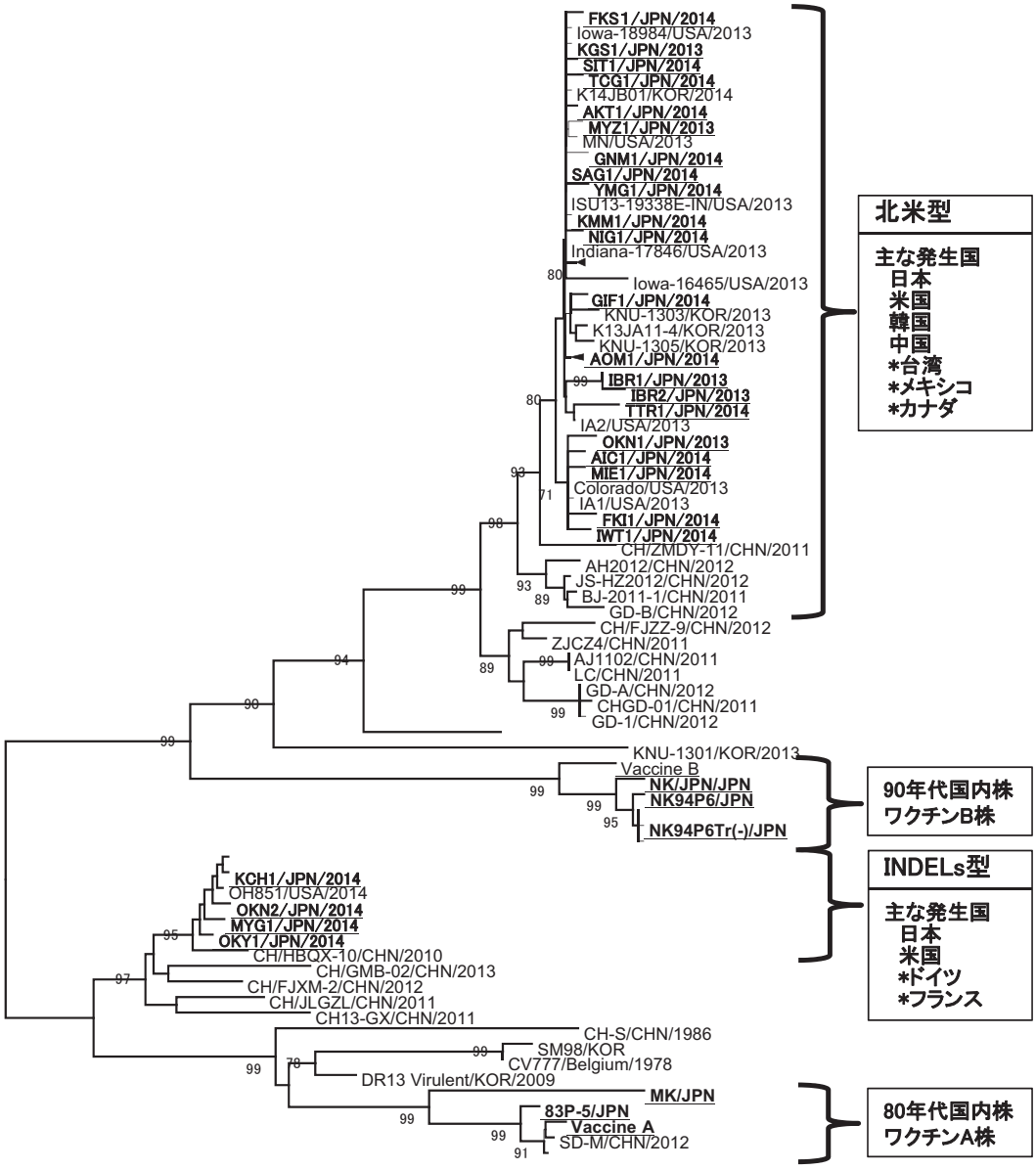

図１．PED ウイルス S 遺伝子の S1 領域に基づく分子系統樹
株名、採取国、採取年を表記している。国内で採取された株は下線で示す。
＊は本図には記載されていないが、それらの国でも遺伝的に近縁な株が採取されていることを表している。

縁であることが示唆されている[26]。2013年 4 月以降、米国では初めにその北米型の PEDV 株が検出され、その 2 カ月後（6 月）には新たに S 遺伝子の S1 領域において北米型と比べて 2 箇所の欠損と 1 箇所の挿入をもつINDELs型のPEDV株が侵入したことが判明している[18,27]。

我が国では米国と同様に、2013年10月以降北米型の PEDV 株が相次いで侵入し、さらに翌年 1 月以降には INDELs 型の PEDV 株が侵入してきたことが明らかとなった[22]。米国や我が国以外にも、北米型の PEDV 株は2013年から2014年にかけて、カナダやメキシコ、ドミニカ共和国、ペルーなどの北中南米各国、あるいは韓国や台湾などのアジア各国で検出されており、一方 INDELs 型の PEDV 株は2014年以降ドイツ、ベルギーやフランスなどの欧州各国で検出されている[5,6,8,11]。

3．我が国で発見された新たな PEDV S 遺伝子変異体（欠損型）の特徴

2014年10月、鳥取県では 2 例目の PED 発生事例が起こった。発生農場は母豚500頭規模の繁殖農場であり、10/25（通報 2 日前）より分娩舎で哺乳豚が下痢・嘔吐を示し、また母豚も元気消失・食欲不振などの臨床症

状を示していたことから、農場主が当時 PED の流行が真只中であったこともあり、PED を疑い、倉吉家畜保健衛生所に通報・検査を依頼した。この症例は立ち入り検査（10/27）の翌日にはすでに PED と診断されたが、10/31までの間に約120頭の子豚が発症したものの、死亡豚が 1 頭も発生しない状況であった。そのため、多くの子豚が発症・死亡した当該県 1 例目の発生事例とは明らかに状況が異なることから、その原因を究明するために、当研究室に病性鑑定の依頼が届いた。初めに、本ウイルス（Tottori 株）の遺伝的特徴を調べるために、常法に従って、S 遺伝子全長の増幅を試みた。その結果、特に S1 領域の増幅産物のサイズが従来よりも約600bp 小さいことを発見した。次いで、その増幅産物をオートシーケンサー（ABI3130; Thermo 社）により解読し、当該領域の塩基配列を決定した結果、図 2 に示すように翻訳開始点より23番目のアミノ酸から216番目のアミノ酸までの計194アミノ酸（582塩基に相当する）が他の PEDV 株と比べて、欠損していることが明らかとなった[15]（この結果をうけて、欠損型と称する）。さらに、Tottori 株の S1 領域以外の遺伝子配列の相違を調べるために、またそれらの配列をもとに本ウイルスの系統発生学的位置づけを調べるために、次世代シークエンサー（Ion PGM; Thermo 社）を用いて本ウイルス株のゲノム全長配列を解読した。その結果、Tottori 株は他の PEDV 株と比べて S1 領域以外に明確な相違を持たず、また図 3 に示すように、近年の流行株と遺伝的に近縁であることが明らかとなった[14]。従って、Tottori 株は野外において、近年の流行株より自然発生的に派生し、当該農場に侵入した可能性があることが示唆された。

今回発見された Tottori 株の S1 領域における欠損部位は TGE ウイルスと豚呼吸器コロナウイルスの遺伝的関係と類似している。すなわち、豚呼吸器コロナウイルスは TGE ウイルスの S1 領域欠損変異体（227アミノ酸:681塩基に相当する）であり、豚呼吸器コロナウイルスは当該部位が欠損したことにより、臨床症状を示さない、あるいは示しても軽度であるなど病原性が減弱化するとともに、腸管ではなく、呼吸器への親和性を獲得したことが知られている[1,7]。そこで、今後は、その豚呼吸器コロナウイルスと類似した欠損部位を有する Tottori 株について、分離した本ウイルス株を用いて新生子豚への感染実験を行い、高病原性 PEDV 株である Okinawa 株と比較・解析しながら、それらの病原性や組織親和性の違いを明らかにするつもりである。

```
Colorado/USA/2013   1:MKSLTYFWLFLPVLSTLSLPQDVTRCSANTNFRRFFSKFNVQAPAVVVLGGYLPIGENQG 60
Tottori2/JPN/2014   1:MKSLTYFWLFLPVLPTLSLPQD------------------------------------ 22
                      **************.*******

Colorado/USA/2013   61:VNSTWYCAGQHPTASGVHGIFVSHIRGGHGFEIGISQEPFDPSGYQLYLHKATNGNTNAT 120
Tottori2/JPN/2014   22:------------------------------------------------------------ 22


Colorado/USA/2013   121:ARLRICQFPSIKTLGPTANNDVTTGRNCLFNKAIPAHMSEHSVVGITWDNDRVTVFSDKI 180
Tottori2/JPN/2014    22:------------------------------------------------------------ 22


Colorado/USA/2013   181:YYFYFKNDWSRVATKCYNSGGCAMQYVYEPTYYMLNVTSAGEDGISYQPCTANCIGYAAN 240
Tottori2/JPN/2014    23:-----------------------------------VTSAGEDGISYQPCTANCIGYAAN 46
                                                           **********

Colorado/USA/2013   241:VFATEPNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVHGKVVSNQPLLVNCLLAIPKIYGLGQFFSFN 300
Tottori2/JPN/2014    47:VFATEPNGHIPEGFSFNNWFLLSNDSTLVHGKVVSNQPLLVNCLLAIPKIYGLGQFFSFN 106
                        ************************************************************

Colorado/USA/2013   301:QTIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALGTNFSFVCSNSSNPHLATF 360
Tottori2/JPN/2014   107:QTIDGVCNGAAVQRAPEALRFNINDTSVILAEGSIVLHTALGTNFSFVCSNSSNPHLATF 166
                        ************************************************************

Colorado/USA/2013   361:AIPLGATQVPYYCFLKVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNGFGYLHLGLLD 420
Tottori2/JPN/2014   167:AIPLGATQVPYYCFLKVDTYNSTVYKFLAVLPPTVREIVITKYGDVYVNGFGYLHLGLLD 226
                        ************************************************************
```

図 2．Tottori 株の S1 領域における欠損箇所
翻訳開始点より23番目のアミノ酸から216番目のアミノ酸までの計194アミノ酸（582塩基に相当）を欠損している。-* は比較した 2 株間でアミノ酸が保存されていることを表している。

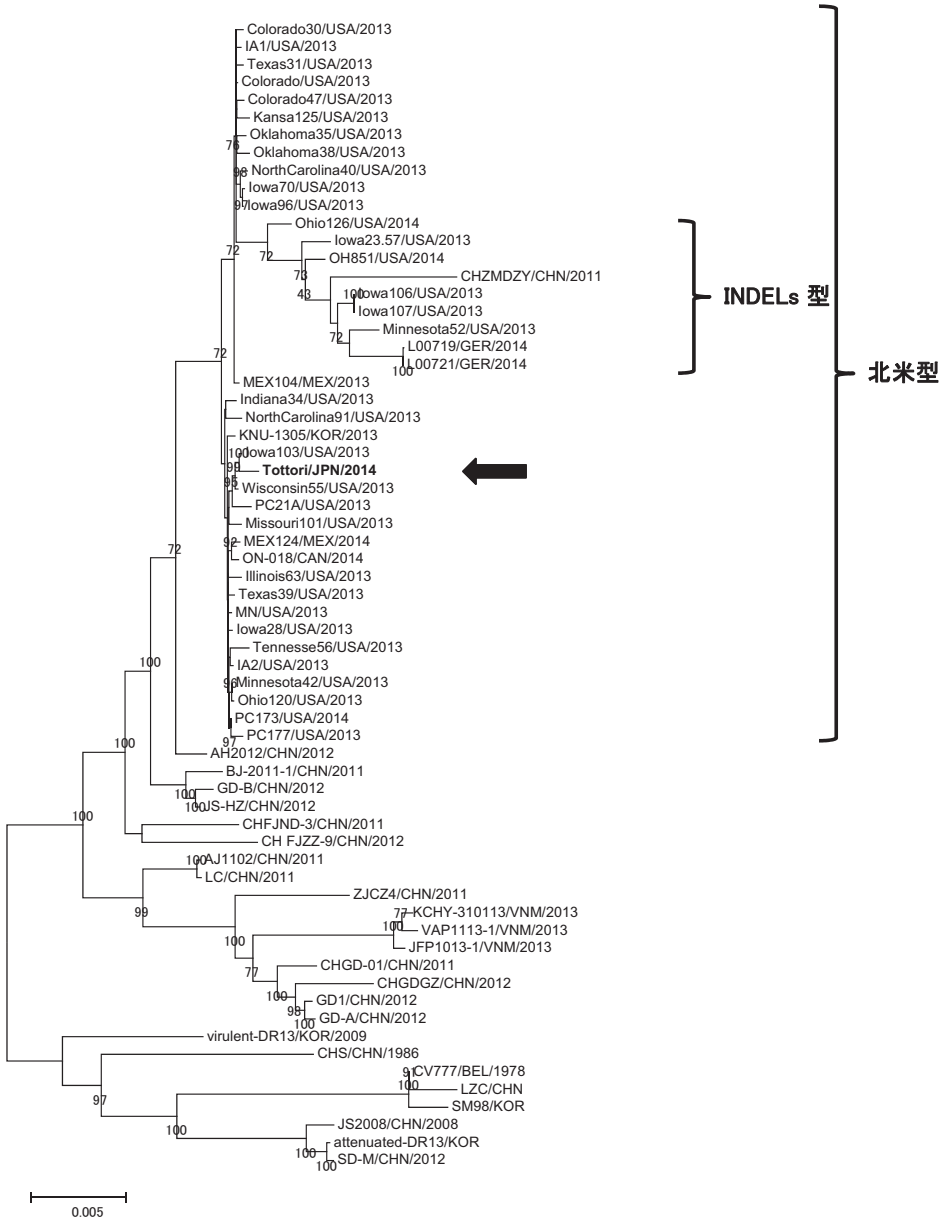

図３．Tottori 株を含む PEDV 全ゲノム配列に基づく分子系統樹
株名、採取国、採取年を表記している。矢印は Tottori 株を指しており、Tottori 株は2013年以降米国で採取された株と遺伝的に近縁であることを示している。

おわりに

2013年以降全国の家畜保健衛生所から病性鑑定依頼を受けた複数の PEDV 株について、S 遺伝子の解析を実施した結果、我が国には少なくとも３種類の異なる PEDV 株（北米型，INDELs type，欠損型）が存在することが明らかとなった。現在、我が国における PED の発生は年を経るごとに減少し、収まりつつあるが、また PEDV が新たな変異を獲得し、更なる被害をもたらす可能性は十分に考えられる。そのためにも、今回の流行株の特性をしっかりと把握・検証することは今後の PED 対策に向けた命題として極めて重要である。2013年以降のこの大流行を決して忘れることなく、むしろ教訓として、今後益々の研究の進展につなげていきたいものである。

謝辞

本研究を進めるにあたり、検体の収集や解析にご協力いただいた全国家畜保健衛生所の職員の方々に深謝いたします。

引用文献

１）Callebaut P, et al. (1988) Antigenic differentiation

between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. J Gen Virol 69: 1725-1730.

2） Chasey D, et al. (1978) Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. Res Vet Sci 25: 255-256.

3） Chen J, et al. (2010) Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China. Arch Virol 155: 1471-1476.

4） Chen X, et al. (2012) Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) samples from field cases in Fujian, China. Virus Genes 45: 499-507.

5） Chiou M, et al. (2014) Molecular characterization of the porcine epidemic diarrhea virus TW 4/2014 in Taiwan. Austin Virol and Retrovirology 1: id1007.

6） Choi J, et al. (2014) Comparative genome analysis and moleculer epidemiclogy of the reemerging porcine epidemic diarrhea virus strains isolated in Korea. Infect Genet Evol 26: 348-351.

7） Gallagher TM, et al. (2001) Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. Virology 279: 371-374.

8） Hanke D, et al. (2015) Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. Emerg Infect Dis 21: 4893-4896.

9） Huang YW, et al. (2013) Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States. mBio 4: e00737-00713.

10） Kweon CH, et al. (1993) Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. Korean J Vet Res 33: 249-254.

11） Lee S, et al. (2014) Outbreak-related porcine epidemic diarrhea virus strains similar to US strains, South Korea, 2013. Emerg Infect Dis 20: 1223-1226.

12） Li W, et al. (2012) New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. Emerg Infect Dis 18: 1350-1353.

13） Li ZL, et al. (2012) Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field cases in south China. Virus Genes 45: 181-185.

14） Masuda T, et al. (2015) New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs. Arch Virol 160: 2565-2568.

15） Murakami S, et al. (2015) Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus variant Tottori2/JPN/2014. Genome Announc 3: e00877-15.

16） Nagy B, et al. (1996) Enterotoxigenic Escherichia coli, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea virus, adenovirus and calici-like virus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. Acta Vet Hung 44: 9-19.

17） Pasick J, et al. (2014) Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. Transbound Emerg Dis 61: 397-410.

18） Pensaert MB, et al. (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol 58: 243-247.

19） Puranaveja S, et al. (2009) Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. Emerg Infect Dis 15: 1112-1115.

20） Song D, et al. (2012) Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis and vaccine. Virus Genes 44: 167-175.

21） Stevenson GW, et al. (2013) Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. J Vet Diagn Invest 25: 649-654.

22） Suzuki T, et al. (2015) Molecular characterization of pig epidemic diarrheoa viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. Infect Genet Evol in press.

23） Takahashi K, et al. (1983) An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. Jpn J Vet Sci 45: 829-832.

24） 津田知幸（1997）豚流行性下痢（PED）．日本豚病学会報 31: 21-28.

25） Van Reeth K, et al. (1994) Prevalence of infectious

with enzootic respiratory and enteric viruses in feeder pigs entering fattening herds. Vet Rec 135: 594-597.

26）Vlasova AN, et al. (2014) Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014. Emerg Infect Dis 20: 1620-1628.

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

28）Wood EN, (1977) An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhea. Vet Rec 100: 243-244.