

## 豚流行性下痢（PED）の病性鑑定事例

県央家畜保健衛生所

英 俊征            高山 環  
山本 英子        荒井 真弓  
和泉屋 公一      吉田 昌司

### 緒 言

豚流行性下痢（Porcine Epidemic Diarrhea、以下、PED）は、水様性下痢を主徴とする届出伝染病である。伝播力が強く、すべての月齢で感染するが、特に若齢豚では症状が重篤化し哺乳豚では高率に死亡する。病原体であるPEDウイルスはコロナウイルス科（*Coronaviridae*）、アルファコロナウイルス属（*Alphacoronavirus*）に属し、エンベロープの表面に放射状に突き出たスパイクをもち、ゲノムはプラス一本鎖RNAである。同じコロナウイルスで類似する症状を示す伝染性胃腸炎（以下、TGE）ウイルスとは血清学的に交差しない<sup>2),5)</sup>。

近年では、アジア、北米、中米を中心に世界的流行がみられ、我が国では2013年10月に7年ぶりに発生し、その後、流行が続き、2015年2月15日現在で39都道府県、935件、約136万頭もの発症がみられている<sup>4)</sup>。本県においても、2014年5月、一貫経営農場1件での発生があり、病性鑑定の概要について報告する。

### 発生農場の概要と経過

発生農場は、発生時において繁殖豚58頭、肥育豚317頭、離乳豚113頭、哺乳豚105頭を飼養する一貫経営農場で、直近では2013年11月、2014年3月に県内より繁殖雌豚3頭ずつを導入していた。給与飼料は配合飼料とエコフィード（パン）であった。

5月1日、繁殖豚7頭、肥育豚6頭が嘔吐、下痢、食欲低下を示し、翌5月2日には急速な拡大が認められ、繁殖豚23頭（39.7%）、肥育豚229頭（72.2%）、離乳豚43頭（38.1%）、哺乳豚27頭（25.7%）が水様性下痢を呈した。このような状況から、TGEやPEDのような伝播力の強いウイルス性下痢を疑い病性鑑定を実施した。

## 材料および方法

### 1 供試材料

発症豚（繁殖豚、肥育豚）の糞便 10 検体と発症中の哺乳豚（0～1 日齢）2 頭を供試した。

### 2 方法

#### (1) ウイルス学的検査

##### ア 分離培養

糞便 10 検体及び哺乳豚の腸内容物について Vero 細胞を用いトリプシン添加 MEM で 5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で 7 日間培養を 4 代継代した。また、哺乳豚の主要臓器 10%乳剤について CPK 細胞を用い 10%FBS 加 MEM で 5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で 7 日間培養を 5 代継代した。

また、併せて扁桃についてはカバースリップによる豚コレラウイルス蛍光抗体法を実施した。

##### イ RT-PCR

ウイルス遺伝子を検索するため RT-PCR を実施した。

糞便、哺乳豚の腸内容物からスピンカラム法により totalRNA を抽出、精製後、次の 2 つのプライマーを用いて実施した。

##### 1) PEDV P1、P2<sup>3)</sup>

ターゲット：PEDウイルスのスパイク蛋白(S)遺伝子

増幅バンド：651bp

##### 2) TGEV 21209、2374R<sup>6)</sup>

ターゲット：TGEウイルスのスパイク蛋白(S)遺伝子

増幅バンド：840bp

増幅は One-Step RT-PCR で行った。逆転写酵素に M-MuLV Reverse Transcriptase、PCR 酵素に Taq DNA polymerase を用い、逆転写 42°C で 20 分、初期変性 95°C で 5 分；変性 94°C で 30 秒、アニーリング 55°C で 1 分、エクステンション 72°C で 1 分を 35 サイクル；最終エクステンション 72°C で 5 分のサーマルサイクリング条件で行った。

#### (2) 細菌学的検査

哺乳豚の主要臓器について、β-NAD 加めん羊血液寒天培地を用いた 37°C、48 時間の好気、微

好気培養および DHL 寒天培地を用いた 37℃、48 時間の好気培養を行った。

### (3) 病理組織学的検査

哺乳豚の主要臓器、空腸、回腸、大腸、脳、脊髄および扁桃を 10%中性緩衝ホルマリン固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて観察した。

また、空腸、回腸について一次抗体に抗 PED ウイルス家兔血清を用いた免疫組織化学的染色（IHC）を実施した。方法はストレプトアビジン・ビオチン（SAB）法により抗原賦活化に Actinase E、発色基質に DAB、対比染色にヘマトキシリンを用いた。

## 結 果

### 1 糞便性状および剖検所見

供試した糞便は水様性から泥状を示し、一部には固形状のものもみられた。

哺乳豚は衰弱し、肛門周辺が下痢で汚れていた（図 1a、1b）。剖検では小腸の菲薄化や未消化凝固乳による胃の膨満がみられた（図 2a、2b）。



図 1a 病性鑑定豚 1



図 1b 病性鑑定豚 2



図 2a 小腸壁の菲薄化



図 2b 未消化凝乳による胃の膨満

## 2 病原検索成績

ウイルス学的検査ではウイルスは分離されず、併せて実施した豚コレラ蛍光抗体法も陰性であった。

RT-PCR では糞便 10 検体中 8 検体と腸内容物 2 検体から 651bp の PED ウイルス特異遺伝子が検出された (図 3)。TGE ウイルス特異遺伝子は検出されなかった。

細菌学的検査では有意菌は分離されなかった。

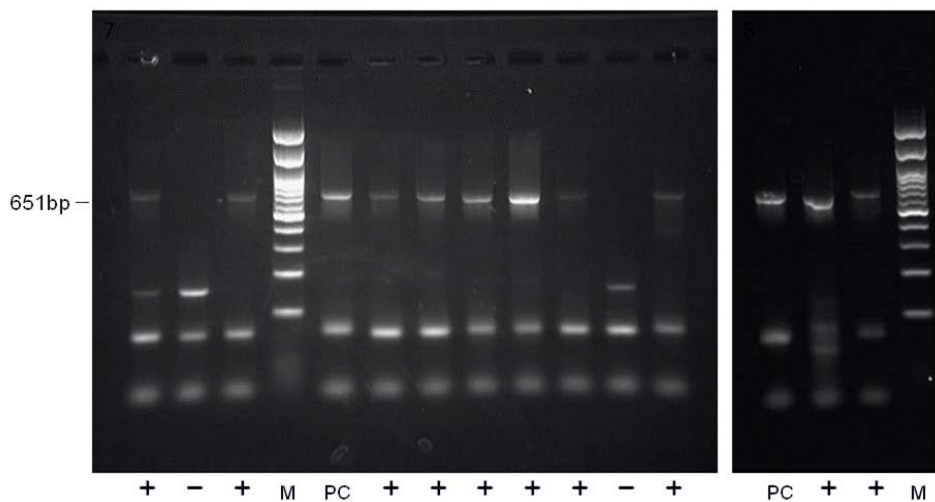


図 3 PED ウイルス RT-PCR アガロース電気泳動像 (左. 糞便、右. 腸内容)

### 3 病理組織学的検査成績

HE 染色では、2 頭ともに空腸および回腸で腸絨毛の萎縮や粘膜上皮細胞の扁平化、一部では空胞形成が認められた（図 4a、4b）。その他の臓器に著変は認められなかった。

抗 PED ウイルス家兎血清を用いた免疫組織化学的染色（IHC）では、2 頭ともに空腸および回腸の粘膜上皮細胞内に PED ウイルス抗原が認められた（図 5）。

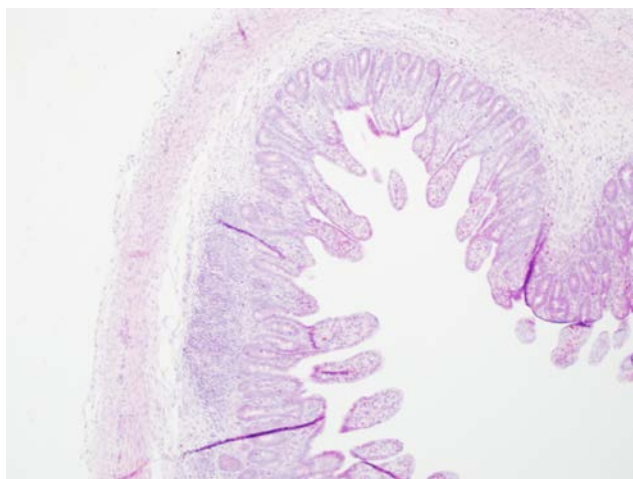


図 4a 絨毛の萎縮、粘膜上皮細胞の扁平化

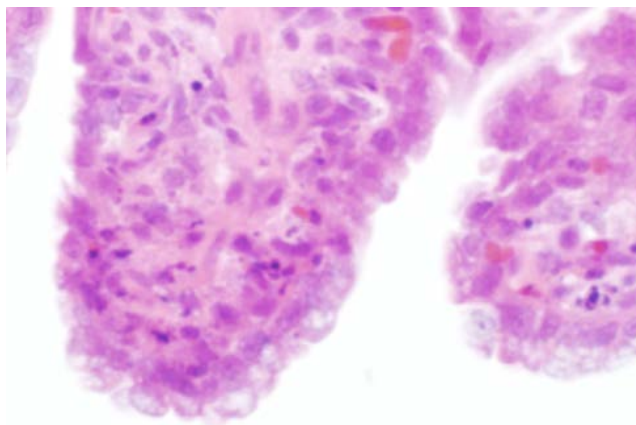


図 4b 粘膜上皮細胞の空胞形成

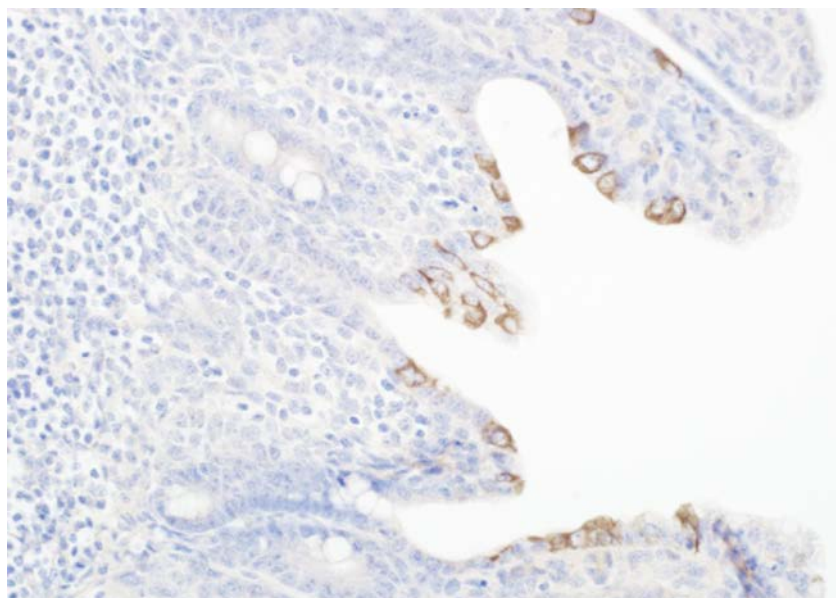


図 5 免疫組織化学的染色 (IHC)

### 4 診断

臨床症状および各検査成績により本症例を PED と診断した。

## 考 察

本症例は下痢、嘔吐を主徴とし、伝播力が強く、TGEやPEDなどのウイルス性の急性伝染病を疑った。PEDウイルスに感染した豚の臨床所見は、その重症度によって様々であり、他の原因の下痢と区別することができない。臨床症状は、豚の年齢、以前の感染状況、免疫状態、二次感染等によって異なる。急性感染により死亡した豚の死後所見はTGEと類似しており、主に小腸に局限した腸の菲薄化、胃内の未消化ミルクの存在、水様性の腸内容物といった所見がみられる<sup>5)</sup>。このようにPEDはTGEと臨床的に区別できないため、確認検査による類症鑑別が重要となる。確認検査はウイルス分離、RT-PCR、免疫組織化学的染色（IHC）、血清学的検査により行うが、PEDやTGEウイルスは分離が困難なため、通常、RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出と免疫組織化学的染色（IHC）によるウイルス抗原の確認により確定診断を行うこととなる<sup>1), 2), 5)</sup>。今回についてもこの両検査によりPEDと診断し、臨床症状、病変およびウイルス増殖部位はPEDの特徴を示すもので、最近の国内外でみられているものと差はなかった。PEDウイルスはすべての月齢で感染するとされているが<sup>2), 5)</sup>、特に今回のように0～1日齢と出生直後にもかかわらず、粘膜上皮細胞内にPEDウイルス抗原が確認されたことは、本ウイルスの感染が暴露後に非常に早く成立し、ウイルスが粘膜上皮細胞内で急速に増殖することを示しており、発症豚であれば今回のように出生直後であっても問題なく検査に供することが可能と思われた。

PEDウイルスの直接伝播は、ウイルスに汚染された糞便の摂取を介して起こる。また、間接伝播は、人、機材又はその他の種類の糞便で汚染された物品（汚染飼料を含む。）を介して、また同様に、汚染された可能性のある車両（飼料トラックや作業車両）を介して起こる<sup>5)</sup>。今回、発症直後の豚群に中和抗体は認められないことから、人や車両、物品を介してPEDウイルスが農場に侵入し、免疫のない豚群へ感染が拡大したものと推察された。

PEDが発生した際は下痢に対する対症療法及び二次感染の防止以外に対応方法はなく、ほとんどの肥育豚は、二次感染が起きない限り7～10日以内に回復するとされている<sup>5)</sup>。今回の事例は約3週間で沈静化し、他の農場への拡大もなく、以後新たな発生はみられてない。本病への対策は健康な豚の導入、農場内での豚、物および人の移動制限、車両及び設備の消毒、死亡豚や糞尿の適切な処理等の厳密なウイルスの侵入と拡散防止対策が最も有効であると考ええる。

## 引用文献

- 1) 病性鑑定指針. 平成 20 年 6 月 2 日付 20 消安第 880 号農林水産省消費・安全局長通知, 242-243
- 2) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 HP. 豚流行性下痢 (PED) .  
<http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/ped/index.html>
- 3) Kim, SY ( 2001 ) . j.Vet.Diagn. Invest.13 ( 6 )
- 4) 農林水産省 HP. 豚流行性下痢について. <http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/ped.html>
- 5) OIE Technical Factsheet. Infection with porcine epidemic diarrhoea virus ( 2014 )
- 6) Vaughn, E.M. et al ( 1994 ) . j.Clin.Microbiol.32 ( 7 )