

PEDVの排泄量比較から見えること

はじめに

豚流行性下痢(PED)が国内で再流行し始めて4年目に入りました。今回の流行は、1990年代の流行に比べ、より広く、より重篤な結果であり、再発が数多く認められ、何かが違う印象を受けました。何が違うのか？ここでは、「ウイルス排泄量」に焦点を当てて、3年前の前号に引き続き、文献情報を整理してみたいと思います。

ウイルス量の測定方法

ウイルス量を測る方法には、原液をどこまで希釈すれば培養細胞または子豚に感染しなくなるかの限界点(50%感染価; TCID₅₀またはPID₅₀(PDD₅₀))を求める方法と、最近、広く普及した遺伝子量を測る方法(遺伝子コピー数; 以下GE*1と略)があります。前者は生きたウイルスのみを検出し、後者は死滅したウイルスも含まれますので、厳密には両者は換算できません。そうは言っても目安くらいは欲しいところゆえ、「換算」できそうな情報について数少ない報告から抜粋しておきます。

(1)定性PCRの電気泳動のバンドの濃さから量を読み取る方法

この方法でVero細胞における感染価 $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL = $10^{4.65}$ コピー/mLの結果が得られています⁽¹⁾。リアルタイムPCR(rPCR)*2とやり方が異なるので、較べて評価する際は、共通のものさしである感染価を元にrPCRのGE値に換算した方がよさそうに思われます(後述)。PEDVの感染価については、50%感染価でなくブラック形成単位(PFU)で測定されている例が少なくなく、50%感染価への換算式はTCID₅₀ = PFU/0.7(理論値)だそうです。

(2)リアルタイムPCR

感染価と遺伝子量の換算に関する記述は2つ報告がありました(① $10^{7.75}$ PFU = 10^{13} GE⁽²⁾、②PFU × 10^6 ≒ GE⁽³⁾)。それぞれ指数で5.25、6.0感染価(PFU)が低い数値です。ここでは(rPCRが死滅ウイルスもカウントすることを考慮し)差が小さい方の5.25を感染価の指数に足してGE値にしたいと思います。PEDV遺伝子(rPCR)の検出限界は、糞便中で $10^{4.8}$ GE/g(血中は $10^{3.8}$ /mL)⁽⁴⁾とのこと。ご参考まで。

※1 GE(genetic equivalent); 遺伝子相当数。コピー数と同じ(ここでは(1)の「コピー数」と区別するため、rPCRの結果は「GE」で表示した)。

※2 PEDVはRNAウイルスなので逆転写の工程が入り、本来は「rRT-PCR」

と表記すべきだが、ここでは「rPCR」と略した。

2013年以前のPEDV排泄量

PEDは米国で大発生した2013年以前から、欧州、アジアで流行していました。それらのウイルスと今のウイルスがどう違うか、遺伝子性状は他でもよく比較されているのでそれらをお読みください。ここでは感染後の排泄量を比較する目的で、感染価及び換算式からウイルス量をGE値に換算し、2013年以降の流行ウイルスとの比較を試みたいと思います(2013年以前の流行ウイルスの排泄量検討は1報だけヒット、1報だけでは確からしい結論を導けません、あしからずご了承ください)。

(1)Songらの報告⁽¹⁾

(2003年韓国分離株を投与した)発症子豚の10%小腸乳剤上清5mLを1日齢子豚に経口投与し、2日目に $10^{6.0}$ コピーを排泄(3日以内に100%死亡)。14日齢子豚の場合、死亡はなく9日間ウイルス排泄、2日目にピークの $10^{5.6}$ コピーを記録。この報告では $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL = $10^{4.65}$ コピーの換算式が公表されており(検体0.2mLの結果ゆえ1mLに直すと $10^{5.35}$ コピー/mL)、 $10^{6.0}$ コピー/0.2mLは $10^{5.35}$ TCID₅₀/mLに相当。これをrPCRのGE値に直すと $10^{10.4}$ GE/mL。

同時に、農場死亡率80%以上の野外発生農場における哺乳豚の排泄量は平均で $10^{5.07}$ コピー/0.25mL; RNA抽出供与量(最大 $10^{5.59}$ コピー/0.25mL; 同)でした。これは $10^{5.02}$ TCID₅₀/g糞便に相当(同様にGE値に直すと $10^{10.3}$ GE/g糞便)。

本題から外れますが、この報告のなかで、「発生農場の検査において、発症豚のPEDV検出量と死亡率の間に関連性はなさそう」と結論づけられています。しかしながら、文献の表中データから求めた回帰直線の相関係数が0.51ですので「相関がある」としてよさそうです(すなわち死亡率が高いほど排泄量が多いと言ってよい)。

(2)化血研データ⁽⁵⁾

弊所では攻撃ウイルス量、排泄量は感染価(TCID₅₀)で測定されました。攻撃ウイルス(1996年分離株)

10^{6.5}TCID₅₀/mLを3mL胃内に投与され、4～9日目に10頭中7頭が死亡。排泄量は検査された3頭平均で1日後にピークの10^{6.25}TCID₅₀/g糞便。GE値に直すと、**10^{11.3}GE/g糞便**に相当。

以上の2件のデータから、2013年以前の発生では糞便1gあたり**10^{10.3}～10^{11.3}GE**が排泄されたと結論づけておきます。

2013年以降のPEDV排泄量

一方、2013年以降のPED発症哺乳豚の排泄量について示します。こちらはデータがいくつか報告されています。

(1) 感染実験成績

①Linらの報告⁽⁴⁾

この研究者は「感染価(PFU)は遺伝子コピー数より10⁶低い」という経験をお持ちのようです。感染実験では1頭あたり10¹⁰GE(感染価で10³⁻⁴PFU)投与されています。排泄量のデータは、文献中ではスワブ懸濁液1mLあたりで表示してありますが、「糞便10%として」と記載されており、糞便1gあたりに直した表記にすると(10倍かけると)、3-4日齢子豚では**10^{12.1}～13.7(平均10^{12.8})GE/g糞便**、29日齢子豚では平均10^{11.6}GE/g糞便、母豚では10^{9.4}～11.6(平均10^{11.2})GE/g糞便、と報告されています。蛇足ですが、症状はS-INDEL株(S蛋白一部挿入・一部欠損変異株)が軽いものの、強毒株とS-INDEL株とは排泄量の差はさほどなかったとのことです。

②Chenらの報告⁽⁶⁾

5日齢に10⁴TCID₅₀/mLの10mLを胃内投与し、継続的に糞便中のウイルス量を測定。強毒標準株では投与1-2日後に**10¹⁰GE/g糞便**以上となる。S-INDEL株では投与5日後に10^{6.4}GE/g糞便にとどまる、とのこと。

S-INDEL株の排泄量が少ない結果はLinらの報告と異なりますが、病原性の異なる株の存在も考えられ、あり得ることでしょう。

③Liuらの報告⁽²⁾

4日齢に100PDD₅₀(子豚の50%感染価; 10²PFU、10⁸GEに相当)を経口投与し、**下痢便1mL(≒1g)中に10^{11.8}～13.0GE(平均値記載なし)**。感染耐過母豚の産子では10⁴PDD₅₀(10⁴PFU、10¹⁰GE)を経口投与しても排泄は10^{5.1}～8.9GE/mLだったとのこと(個体別には排泄陰性子豚も存在)。「感染免疫を保有すれば排泄量も軽減される」ということです。逆に、「感染免疫をもってしても感染防御しない」ということでもあります。蛇足ですが、この結果をもって「ワクチンの有効性確認にはこの攻撃量がよい」とあります。(ちなみに弊所では1頭あたり10⁷TCID₅₀/頭の攻撃ウイルス量で試験しましたので、ウイルス量だけを見ると弊所の設定の700分の1の量ということになります。)

(2) 臨床検査成績

①岩手県福成ら⁽⁷⁾

PED発症哺乳豚の下痢便10^{11.6}GE/g、小腸10^{11.1}GE/g、発症肥育豚10^{8.5}GE/g(いずれも「中央値」)

②弊所検査結果(未発表)

(農場A);PED発症哺乳豚の下痢便10^{11.4}GE/g(10検査平均)。

(農場B);PED発症哺乳豚の下痢便10^{11.2}GE/g(5検査平均)。

(農場C);PED発症哺乳豚の下痢便**10^{12.3}GE/g**(5検査平均)。

(農場D);PED発症哺乳豚の下痢便10^{12.1}GE/g(5検査平均)。肥育豚では10^{9.7}GE/g。

(農場E);PED発症肥育豚の下痢便10^{10.6}GE/g(5検査平均)。

スワブ附着・吸収物からRNAを最終的に60μLに抽出。使用したスワブは少なくとも0.1mLの水分を吸収することから、検体量は0.1g以上と推測されるが、0.1gと仮定して1gあたりの換算値は検査値の10倍とした。

2013年前後の流行株の排泄量比較

以上、検査結果は多様であり考察に困ってしまう結果です。2013年以前と以降で排泄量の平均値を比較するのは、流行ウイルス株の多様性も含まれている可能性があり、妥当ではない気がしますので、それぞれ排泄量が多い同士で比較することにします。2013年以前が**10^{11.3}GE/g**、2013年以降が国内データで**10^{12.3}GE/g**、海外データで**10^{12.8}GE/g**という結果(いずれも平均値)が得られており、2013年以降の方が**10～32倍排泄量が多い**という結果になります。思ったほど差は大きくなかった、というのが第一印象ですが、排泄量が過去のPEDVに較べ少なくとも10倍以上多そうであることは銘記しておくべきと思われます。

最後に

ここまでまとめておきながら今さらですが、本来なら2013年以前も現在と同じ方法で測定しないと厳密には比較できません。本稿は科学論文ではないので、ないものをあえて(無理やり)比較した位置づけであることを申し添えます。

豚の日齢による感受性の差について、5日齢と21日齢では100倍以上の差があるそうです(ウイルス液の限界希釈感染実験から)⁽⁸⁾。若齢哺乳豚ではよほどバイオセキュリティに気を付けておかないと感染が成立しやすい、という意味だと思います。排泄量も若齢哺乳豚が最も多く、離乳豚、肥育豚・成豚の順に少なくなります。

ワクチンについては、投与農場でも発症死亡が経験され、不信感を拭いきれないままになっていますが、母豚が先行感染していないこと(泌乳に異常がないこと、暴露が哺乳開始前に起こらないこと)がコントロールされている攻撃試験では2013年以前のPEDVに対する効果と同等のワクチン効果が確認されており、ワクチンブレイクが起こる「変異」が起こっている訳ではないようです。ただし、10⁷TCID₅₀の量の攻撃までは実施していますが、それを超える量では見ていません。また、ワクチンの効能・効果そのものが「軽減効果」ですので下痢やウイルス排泄は完全に防げませんので、「ワクチン接種しているので安心できる」レベルには達しません。

馴致の効果は臨床現場で確認されています。ただし、感染免疫が成立した腹でも感染防御はしていないことから、「症状はなくてもウイルスを持っているかもしれない」という管理、特に「分娩舎内で暴露が起こらない管理」が必要かもしれません。馴致事例でも再発が確認されており、ワクチン・馴致いずれの場合でも、分娩舎内の清浄性維持がカギになることは論を俟ちません。

参考文献

- (1) Songら, J. Virol. Methods, 133, 27-33, 2006
- (2) Liuら, Vet. Res., 46, 109, 2015
- (3) Jungら, Emerg. Infect. Dis., 20(4), 662-5, 2014
- (4) Linら, Vet. Res., 46, 134, 2015
- (5) スイムジェンTGE/PED製造販売承認申請資料
- (6) Chenら, J. Gen. Virol., 97, 1107-21, 2016
- (7) 福成ら, 平成26年度全国家畜保健衛生業績抄録
- (8) Thomasら, PLOS ONE, 10(10):e0139266, 2015