

嘔吐・下痢を認めた豚から分離された
豚デルタコロナウイルス本田光平^{1)†} 平野かおり²⁾ 小嶋 暢¹⁾ 鈴木 亨³⁾ 大橋誠一³⁾

- 1) 山形県中央家畜保健衛生所 (〒990-2161 山形市大字漆山736)
 2) 山形県置賜家畜保健衛生所 (〒999-2232 南陽市三間通444)
 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2017年8月8日受付・2018年3月3日受理)

要 約

2015年1月に山形県内の豚繁殖肥育一貫経営農場の飼育豚において、嘔吐・下痢症が認められた。母豚及び種雄豚では激しい嘔吐または下痢、食欲不振を認めたが、哺乳豚では下痢のみが認められた。豚13頭の糞便についてウイルス遺伝子の検索を行った結果、豚流行性下痢ウイルス及び伝染性胃腸炎ウイルス遺伝子は検出されなかったが、豚デルタコロナウイルス (PDCoV) 遺伝子が全頭から検出された。さらに当該材料について LLC-PK1 細胞を用いたウイルス分離を試みたところ、PDCoV が分離された。分離ウイルスの S 遺伝子、N 遺伝子の塩基配列は米国株及び韓国株と高い相同性を示した。分離ウイルスを抗原に用いた間接蛍光抗体法による抗体検査では、疾病の発生後少なくとも8カ月間抗体が検出される母豚が存在した。本症例は野外において、PDCoV が主原因となる病態を明らかにした国内最初の報告である。——キーワード：下痢、LLC-PK1 細胞、豚デルタコロナウイルス (PDCoV)、ウイルス分離。

-----日獣会誌 71, 354~360 (2018)

近年、従来のアルファコロナウイルス属、ベータコロナウイルス属、ガンマコロナウイルス属に分類されない新たなコロナウイルスがいくつかの哺乳類及び鳥類の糞便から検出され、これらは新たに第4のグループとしてデルタコロナウイルス属に分類された [1]。また、2012年に香港で行われたデルタコロナウイルスに対するサーベイランス調査では、豚及び鳥類の糞便からも新たなデルタコロナウイルスが検出された [2]。2014年2月、米国のオハイオ州で、下痢を呈した豚の糞便及び腸内容物から豚デルタコロナウイルス (PDCoV) が初めて検出された [3]。その後、米国の他の州及びカナダ、中国、韓国でも、相次いでPDCoVが検出されている [4-9]。一方、わが国でも同様の時期にPDCoVが検出されているが、その実態は十分に把握できていない [10, 11]。

今回、われわれは農場において嘔吐・下痢を呈した母豚の糞便乳剤から、わが国で初めてPDCoVを分離した。また、分離したウイルスを用いて抗体検査を実施し、発

生農場におけるウイルス浸潤状況調査を行ったので、それらの概要を報告する。

材料及び方法

発生概要：2015年1月8日、パークシャーと金華豚及びそれらの雑種豚1,450頭を飼養する繁殖・肥育一貫経営農場の分娩舎で繁殖豚28頭、種雄豚4頭に下痢・嘔吐が発生した。母豚及び種雄豚ではその後も激しい嘔吐を示し、発症した母豚は食欲低下及び元気消失を示した (図1)。哺乳豚では数頭に下痢が観察されたが、嘔吐及び食欲低下は認められず、また死亡豚も認められなかった。翌日、別の分娩舎に感染が拡大し、合計繁殖豚52頭、種雄豚8頭に下痢あるいは嘔吐を認め、また哺乳豚数頭に下痢が観察された。発生3日後からは新たな発症豚はなく、発症した豚も回復傾向がみられ、発生5日後にはすべての豚が回復し終息した。なお、この発生期間中に肥育豚舎の豚では、下痢及び嘔吐は認められなかった。また、豚の外部導入は2年間なかった。2014

† 連絡責任者：本田光平 (山形県中央家畜保健衛生所)

〒990-2161 山形市大字漆山736 ☎023-686-4410 FAX023-686-5715
E-mail: hondak@pref.yamagata.jp

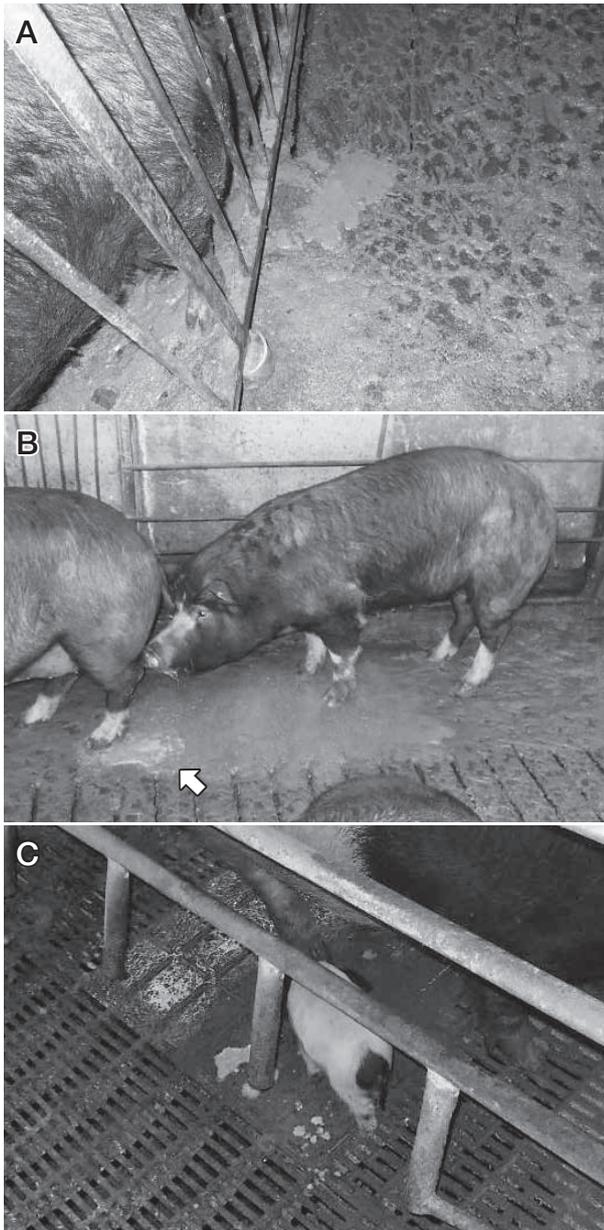


図1 発生時の臨床症状
 (A) 母豚の下痢
 (B) 母豚の嘔吐。矢印が嘔吐物
 (C) 哺乳豚の下痢

年12月22～24日、2015年1月5及び7日に隣県の食肉流通センターへ、2015年1月6日に県内の食肉流通センターへそれぞれ肥育豚を出荷していた。衛生管理は農場入口、豚舎入口の消石灰散布、豚舎ごとに踏込み消毒槽及び従業員長の靴、紙つなぎの設置、外部立入者の制限を実施しており、また2014年5月以降繁殖母豚全頭に豚流行性下痢 (PED) / 伝染性胃腸炎 (TGE) 混合生ワクチンを接種していた。病性鑑定を実施するため、嘔吐または下痢を呈した豚13頭 (母豚10頭、種雄豚1頭、哺乳豚2頭) から糞便を採材した。

細菌学的検査及び生化学的検査：細菌学的検査はサル

モネラ属菌の分離培養及びPCRによる大腸菌の病原遺伝子検査 (哺乳豚のみ) を行った。サルモネラ属菌の分離はハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 (栄研化学(株), 栃木) を用いて42℃、24時間の増菌培養を行った後、ノボビオシン加DHL寒天培地で37℃ 24時間の好気培養を行った。大腸菌の病原遺伝子検査はZhangら [12] の方法に従って実施した。生化学検査はドライケムにより中毒関連検査 (GOT, BUN) を実施した。

ウイルス検査：ウイルス検査として、PEDウイルス (PEDV)、TGEウイルス (TGEV)、ロタウイルスA (RVA)、ロタウイルスB (RVB)、ロタウイルスC (RVC) 及びPDCoVは既報 [3, 13-17] に従い、RT-PCR法によりウイルス遺伝子を検出した。10%下痢便乳剤から市販のRNA抽出キット (High Pure Viral RNA Kit, ロシユダイアグノスティックス(株), 東京) を用いてRNAを抽出し、市販のRT-PCR法キット (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit, (株)キアゲン, 東京) を用いて、ウイルス遺伝子増幅を実施した。得られたPCR産物は、2%アガロースゲルにて電気泳動し、目的サイズのバンドを確認した。また、発生後11日、41日、186日における発生母豚群の糞便をランダムに各8～11検体採材し、上記のRT-PCR法によりPDCoV遺伝子の検出を実施した。

ウイルス分離及び同定：ウイルス分離にはブタ腎臓由来株化細胞 (LLC-PK1細胞 (JCRB0060 [18])) を使用した [19]。細胞の培養はイーグル培地に5%牛胎血清 (FBS) を添加した培地を使用した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で糞便を10%乳剤に調製し、3,000rpm、10分間遠沈後、上清を0.45μmのフィルターでろ過したものを接種材料として使用した。ウイルス接種は単層に培養した細胞をFBSを含まない培地で2回洗浄後、調製した10%乳剤を接種した。37℃で1時間吸着した後、細胞をPBSで洗浄し、培養液を添加して静置培養を行った。吸着及び培養には培養液にトリプシン (GIBCO Trypsin, Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.) 10μg/mlまたはパンクレアチン (シグマ アルドリッチジャパン(株), 東京) 5μg/mlをそれぞれ添加した。細胞変性効果 (CPE) の有無を指標に3～5日ごとに3代まで継代した。分離ウイルスの同定は抗PDCoV免疫ウサギ血清を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) により実施した。免疫用抗原は、PDCoVアメリカ分離株 Michigan/8977/2014株 [20] をブタ精巢由来株化細胞 (ST細胞) で培養した上清を濃縮精製したものを使用した。抗PDCoV免疫ウサギ血清は、精製抗原とアジュバントとの混合物を2週間隔で3回ウサギに免疫し、最終免疫の2週間後に血清を採取した。作製した血清はPDCoV Michigan/8977/2014株、PEDV OKN-1/2013株及びTGEV TO-163株を抗原としたIFAによりその

表1 ウイルス学的検査の結果

検体 No.	用途	症状	PEDV RT-PCR	TGEV RT-PCR	PDCoV RT-PCR (N/Mgene)	RVA RT-PCR	RVB RT-PCR	RVC RT-PCR	ウイルス分離 ^{*1} (トリプシン/パンクレアチン)
1	雄豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	NT ^{*2}
2	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	-/-
3	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	+/+ ^{*3}
4	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	+/+
5	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	NT
6	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	+/+
7	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	NT
8	母豚	下痢	-	-	+/+	-	-	-	NT
9	母豚	嘔吐	-	-	+/+	-	-	-	+/-
10	母豚	嘔吐	-	-	+/+	-	-	-	-/-
11	哺乳豚	下痢	NT	NT	+/+	+	-	-	NT
12	哺乳豚	下痢	NT	NT	+/+	+	-	-	NT
13	母豚	下痢	NT	NT	+/+	+	-	-	NT

*1: LLC-PK1 細胞 (トリプシン 10 μ g/ml またはパンクレアチン 5 μ g/ml を添加), +: CPE 陽性, -: 3代継代で CPE 陰性

*2: NT (検査未実施)

*3: Yamagata/1/2015 株

特異性を確認した。

遺伝子解析: 分離されたウイルスから上記 RNA 抽出キットで RNA を抽出し、ヌクレオカプシド (N) あるいはスパイク (S) 遺伝子全長を RT-PCR 法で増幅した (PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit, タカラバイオ(株), 滋賀)。増幅 PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、目的サイズのバンドを確認するとともに、市販の PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, (株)キアゲン, 東京) で精製し、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。決定した分離ウイルスの塩基配列を既知の PDCoV 検出株の塩基配列と比較し、相同性を算出するとともに、遺伝子解析ソフト MEGA6 を用いて、近隣結合法により分子系統樹を作製した。

IFA による PDCoV 抗体検査: 農場内の感染状況を調査するため、IFA による抗体検査を実施した。発生豚舎の母豚群において発生後 1, 11, 41, 56, 186, 253 日に採血を行った。抗原は 96 ウェルプレートに培養した LLC-PK1 細胞にトリプシンを添加した培地で希釈した分離ウイルスを接種し、24 時間後、冷 80% アセトンで固定し、室温で乾燥させたものを用いた。まず、本試験の特異性を確認するため、PDCoV、PEDV 及び TGEV 実験感染耐過血清を用いてその交差性を確認した。PBS で被検血清を 10 倍から 10,240 倍まで 2 倍段階希釈して抗原プレートに加え、37°C で 1 時間反応した後、PBS で 5 回洗浄し、FITC 標識抗ブタ IgG ウサギ抗体 (ライフテクノロジーズジャパン(株), 東京) を加え、37°C で 30 分間反応させた。PBS で 5 回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察し、特異蛍光が観察された血清の最高希釈倍率の逆数を IFA 抗体価とした。

成 績

病性鑑定: サルモネラ属菌は分離されず、PCR による大腸菌の病原遺伝子検査はすべて陰性であった。母豚 4 頭の血液を用いた生化学検査では、GOT 及び BUN の顕著な上昇は認められず、中毒関連は否定された。ウイルス検査では、PDCoV に対する遺伝子検査で 13 頭全頭から N 及び M 遺伝子が検出された。また RVA の VP6 遺伝子が哺乳豚 2 頭と母豚 1 頭より検出されたが、PEDV、TGEV、RVB 及び RVC に対する遺伝子検査では全頭陰性を示した (表 1)。また、発生後の母豚糞便中には、発生後 0 及び 1 日に 11/11 頭 (100%)、11 日に 6/8 頭 (75%)、41 日に 3/8 頭 (38%)、186 日に 0/8 頭 (0%) から PDCoV の N 遺伝子が検出された。

ウイルス分離: ウイルス分離材料を接種した LLC-PK1 細胞は 1~2 代目で、細胞が球形化し、その後それら細胞が培養液中に遊離する明瞭な CPE が確認された (図 2)。ウイルス同定のために作製したウサギ血清は IFA において TGEV 及び PEDV とは反応しなかったが、PDCoV Michigan/8977/2014 株では細胞質に特異蛍光を確認した。分離ウイルスを抗原とした IFA においても細胞質に明瞭な特異蛍光を観察した (図 3)。以上のことから、LLC-PK1 細胞において分離されたウイルスは PDCoV (母豚 No. 3 からの分離株を Yamagata/1/2015 株と命名) であると同定した。

PDCoV の遺伝子解析: 分離された PDCoV 株の S 遺伝子及び N 遺伝子の塩基配列を香港株 (JQ065042, JQ065043)、米国株 (KJ481931, KM012168) 及び韓国株 (KM820765) のそれぞれの塩基配列と比較し、相同性を算出したところ、S 遺伝子では香港株と 96%、

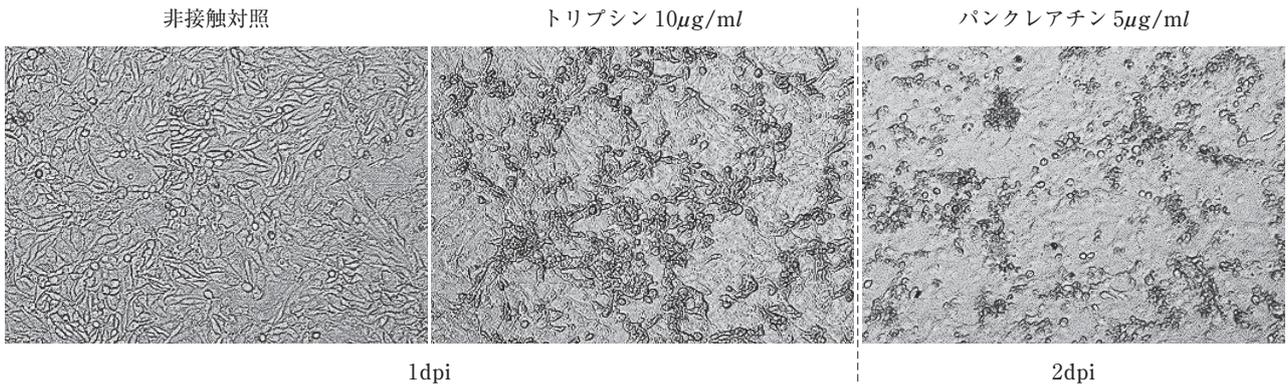


図2 LLC-PK1細胞（ブタ腎臓細胞由来）における PDCoV の細胞変性効果（CPE）
トリプシンまたはパンクレアチンを添加した LLC-PK1 細胞の接種後1日目または2日目に観察

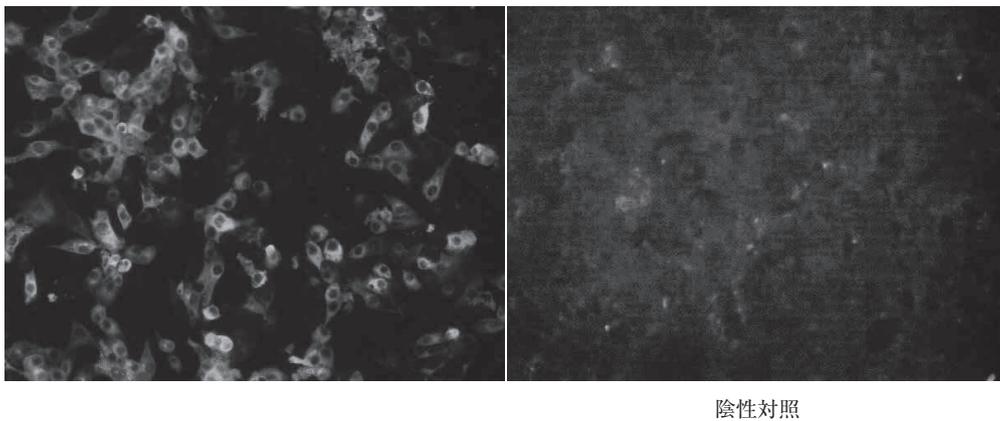


図3 PDCoV 特異的抗血清を用いた IFA 法による分離ウイルスの同定

表2 国内外の分離ウイルス間の塩基配列の相同性

分離株	塩基配列の相同性 (%)	
	スパイク遺伝子 (3483nt)	ヌクレオカプシド遺伝子 (1029nt)
香港株 vs. 日本株	96.1~96.9	98.9
北米株 vs. 日本株	97.7~98.0	99.5~99.7
韓国株 vs. 日本株	97.8~98.0	99.6
香港株 (JQ065042, JQ065043), 米国株 (KJ481931, KM012168), 韓国株 (KM820765)		

北米株及び韓国株と97%以上、N遺伝子では香港株と99%、北米株及び韓国株と99%以上の相同性を示した(表2)。さらにN遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析を行った結果、本分離株は米国株及び韓国株と遺伝的に近縁であることが示された(図4)。

PDCoVの抗体検査: 分離ウイルスは同じコロナウイルス科に属するPEDV及びTGEVに対する実験感染耐過血清を用いたIFAでは交差反応が認められなかったことから、IFAによる農場内の抗体調査を実施した。発生豚舎の母豚群におけるPDCoVに対するIFA抗体価の幾何平均値(GM値)は、それぞれ発生後1日で4.3倍(n=3)、11日で1,280倍(n=6)、41日で368倍(n

=5)、56日で143倍(n=6)、186日で90倍(n=6)、253日87倍(n=8)であった。

考 察

本事例では、嘔吐または下痢を呈した豚の糞便材料からPDCoV遺伝子が検出され、それらの材料を用いてわが国で初めてPDCoVが分離された。ウイルスが分離されたこと及び他の病原体が有意に検出されなかったことから、母豚を中心とした嘔吐及び下痢を引き起こした主原因はPDCoVであると考えられた。

米国で最初に報告されたPDCoV感染実験では母豚の水様性下痢あるいは子豚の死亡などPEDと類似した症状が確認されたが、子豚の死亡率はPEDと比べて低いという結果であった[3]。Chenら[21]が行った分離ウイルスによるPDCoV感染実験では、哺乳豚における症状は軽度で一過性の下痢を示したのみで、嘔吐及び食欲不振、死亡は認められていない。一方で、PDCoVを含む腸管内容物を子豚に投与し、激しい水様性下痢あるいは嘔吐を起こしたとする報告がある[22]。また、農場でのPDCoV遺伝子検出に関する報告はPEDVあるいは豚口ウイルス遺伝子が同時に検出される例が多いため[3, 4, 8-10]、PDCoV単独感染による病態は不明

嘔吐・下痢を認めた豚から分離された豚デルタコロナウイルス



図4 豚デルタコロナウイルスのヌクレオカプシド (N) 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析
* : GenBank accession No.

のままである。

本事例でも、哺乳豚ではChenら [21] の報告と同様に軽度の下痢のみを示したが、母豚及び種雄豚など成豚では激しい嘔吐または下痢、食欲不振を示した。哺乳豚と成豚における病態の差はウイルス側の要因よりも宿主側の要因が強く影響している可能性が考えられ、成豚における病態は嘔吐及び食欲不振を伴った激しい症状を示すことが、本事例から明らかとなった。

発生後の抗体調査において、発症した母豚は発生後1日にすでにIFA抗体を保有していた。そのため、少なくとも発生1～2週間前にはウイルスに感染していたと考えられる。本農場では疫学調査から、農場入り口の消石灰の散布、豚舎ごとの長靴、紙つなぎの設置及び外部立ち入り者の制限等適切な衛生管理を実施し、豚の外部導入を2年間行っていなかった。しかし、発生1～2週間前の出荷作業後に分娩舎で作業したことから、その時にウイルスが分娩舎に持ち込まれた可能性が推察された。また、発生母豚群では発生8カ月後でもIFA抗体が検出され、感染豚では抗体が長期維持されることが示唆された。

遺伝子解析では、本分離株は米国株及び韓国株とS遺伝子では97%以上、N遺伝子では99%以上の相同性を示した。したがって、本分離株は近年米国及び韓国で流行していた株と遺伝的に近縁であり、これら株が日本国内に持ち込まれ、拡散された可能性が示唆された。

これまでの事例ではPDCoVはPEDVあるいはロタウイルスと同時に検出されることが多く [3, 4, 8-10]、本事例でも一部の個体からRVA遺伝子が検出された。しかし、RVAは農場に常在化していることが多いことから、今回の事例はPDCoV感染が主原因であり、またそれらの感染に伴う成豚及び哺乳豚の病態が明らかと

なった。今後は感受性の高い他の生産ステージの豚での感染実験及び疫学情報の集積により、発病メカニズムを明らかにしていく必要がある。

本研究により、分離したウイルスを用いたIFA抗体検査が可能となったため、今後はこれらを用いてPDCoV発生農場における抗体保有状況調査及び他地域での浸潤状況調査を実施していくことが、防疫対策として有効と思われる。養豚農家での下痢症の発生は経済的被害も大きく、早期の防疫対策が求められる。PEDを含めたウイルス性下痢症の類症鑑別において、本事例で得られた知見を活かし、PDCoVの診断を早期に確立させることが重要となってくる。

引用文献

- [1] Woo PC, Huang Y, Lau SK, Yuen KY : Coronavirus genomics and bioinformatics analysis, *Viruses*, 2, 1804-1820 (2010)
- [2] Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, Bai R, Teng JL, Tsang CC, Wang M, Zheng BJ, Chan KH, Yuen KY : Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus *Deltacoronavirus* supports bat coronavirus as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronavirus as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*, *J Virol*, 86, 3995-4008 (2012)
- [3] Wang L, Byrum B, Zhang Y : Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014, *Emerg Infect Dis*, 20, 1227-1230 (2014)
- [4] Wang L, Byrum B, Zhang Y : Porcine coronavirus HKU15 detected in 9 US states, 2014, *Emerg Infect Dis*, 20, 1594-1595 (2014)
- [5] Marthaler D, Jiang Y, Collins J, Rossow K : Complete genome sequence of strain SDCV/USA/Illinois121/

- 2014, a porcine deltacoronavirus from the United States, *Genome Announcements*, 2, e00218-14 (2014), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3983293/>), (accessed 2016-03-08)
- [6] Li G, Chen Q, Harmon KM, Yoon KJ, Schwartz KJ, Hoogland MJ, Gauger PC, Main RG, Zhang J : Full-length genome sequence of porcine deltacoronavirus strain USA/IA/2014/8734, *Genome Announcements*, 2, e00278-14 (2014), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3983307/>), (accessed 2016-03-08)
- [7] Lee S, Lee C : Complete genome characterization of Korean porcine deltacoronavirus strain KOR/KNU14-04/2014, *Genome Announcements*, 2, e01191-14 (2014), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246158/>), (accessed 2016-03-08)
- [8] Marthaler D, Raymond L, Jiang Y, Collins J, Rossow K, Rovita A : Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus, *Emerg Infect Dis*, 20, 1347-1350 (2014)
- [9] Dong N, Fang L, Zeng S, Sun Q, Chen H, Xiao S : Porcine deltacoronavirus in Mainland China, *Emerg Infect Dis*, 21, 2254-2255 (2015)
- [10] 小寺 文, 曾地雄一郎, 西 清志, 千葉直幸, 植木 洋, 矢島りさ, 竹田百合子, 結城瑞希 : 下痢を呈した豚群におけるデルタコロナウイルス遺伝子の検出と宮城県内浸潤状況, *家畜衛生学雑誌*, 41, 127-133 (2016)
- [11] 新楽和孝, 南 亜矢子, 平野佳世, 濱谷景祐, 阿部祥次, 宇佐美佳秀 : 豚デルタコロナウイルスの関与が疑われた下痢の発生事例, *家畜衛生学雑誌*, 42, 97-104 (2016)
- [12] Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D : Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US, *Vet Microbiol*, 123, 145-152 (2007)
- [13] Kim SY, Song DS, Park BK : Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR, *J Vet Diagn Invest*, 13, 516-520 (2001)
- [14] Fujii Y, Shimoike T, Takagi H, Murakami K, Todaka-Takai R, Park Y, Katayama K : Amplification of all 11 RNA segments of group A rotaviruses based on reverse transcription polymerase chain reaction, *Microbiol Immunol*, 56, 630-638 (2012)
- [15] Fukuda M, Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Tasei K, Aita T, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H : Development and application of one-step multiplex reverse transcription PCR for simultaneous detection of five diarrheal virus in adult cattle, *Arch Virol*, 157, 1063-1069 (2012)
- [16] Kuga K, Miyazaki A, Suzuki T, Takagi M, Hattori N, Katsuda K, Mase M, Sugiyama M, Tsunemitsu H : Genetic diversity and classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses, *Arch Virol*, 154, 1785-1795 (2009)
- [17] Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ : Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses, *Arch Virol*, 141, 705-713 (1996)
- [18] Hull RN, Cherry WR, Huseby RM, Clavin SA : Studies on tissue culture produced plasminogen activator. I. Preliminary observations and the enhancing effect of colchicine and other antimetabolic agents, *Thromb Res*, 10, 669-677 (1977)
- [19] Hu H, Jung K, Vlasova AN, Chepngeno J, Lu Z, Wang Q, Saif LJ : Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States, *J Clin Microbiol*, 53, 1537-1548 (2015)
- [20] Ma Y, Zhang Y, Liang X, Lou F, Oglesbee M, Krakowka S, Li J : Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States, *mBio*, 6, e00064-15 (2015), (online), (<http://mbio.asm.org/content/6/2/e00064-15.long>), (accessed 2016-01-26)
- [21] Chen Q, Gauger P, Stafne M, Thomas J, Arruda P, Burrough E, Madson D, Brodie J, Magstadt D, Derscheid R, Welch M, Zhang J : Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets, *Virology*, 482, 51-59 (2015)
- [22] Jung K, Hu H, Eyerly B, Lu Z, Chepngeno J, Saif LJ : Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs, *Emerg Infect Dis*, 21, 650-654 (2015)

Isolation of Porcine Deltacoronavirus from Pigs with Vomiting and Diarrhea

Kohei HONDA^{1)†}, Kaori HIRANO²⁾, Toru OJIMA¹⁾, Toru SUZUKI³⁾
and Seiichi OHASHI³⁾

- 1) *Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan*
- 2) *Yamagata Prefecture Okitama Livestock Hygiene Service Center, 444 Mitumadori, Nanyou, 999-2232, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

A disease characterized by vomiting and diarrhea was observed in a farrow-to-finish farm in Yamagata Prefecture in January 2015. Sows and boars developed severe vomiting, diarrhea, and anorexia, while suckling piglets only developed diarrhea. No piglets died during this occurrence. Using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the porcine deltacoronavirus (PDCoV) genome was detected in all 13 fecal samples tested. However, the porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus were not detected. PDCoV was isolated from the RT-PCR-positive samples inoculated onto LLC-PK1 cells originated from a pig kidney. The isolated virus has a high nucleotide identity at the spike (greater than 97%) and nucleocapsid (greater than 99%) regions with the U.S. and South Korean isolates available in GenBank. Serological surveillance using an immunofluorescent assay indicated that the infected sows had antibodies against the isolated virus for eight months following the occurrence. These data suggested that the diarrhea was associated with PDCoV infection. This is the first report in Japan describing the isolation of PDCoV from clinical diarrheal cases and its genetic characterization.

— Key words : diarrhea, LLC-PK1 cell, porcine deltacoronavirus, virus isolation.

† *Correspondence to : Kohei HONDA (Yamagata Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)
736 Urushiyama, Yamagata, 990-2161, Japan
TEL 023-686-4410 FAX 023-686-5715 E-mail : hondak@pref.yamagata.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 71, 354 ~ 360 (2018)