

資料

鶏卵黄免疫グロブリン抗体を用いた豚流行性下痢に対する受動免疫賦与

梅田浩二¹⁾、鈴木 亨²⁾、大橋誠一²⁾、Seong-cheol Moon³⁾、Shofiqur Rahman¹⁾、Sa Van Nguyen¹⁾¹⁾(株)イーダブルニュートリション・ジャパン 岐阜免疫研究所、²⁾国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門、³⁾Komipharm International Co., Ltd.)

Umeda, K., Suzuki, T., Ohashi, S., Moon, S. C., Rahman, S. and Sa, V. N. (2019). Passive immunization by specific chicken egg yolk immunoglobulin antibodies against Porcine Epidemic Diarrhea.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 73, 25-31.

キーワード：豚流行性下痢 (PED)、鶏卵黄免疫グロブリン (IgY) 抗体、受動免疫、ウイルス中和作用

はじめに

豚流行性下痢 (Porcine Epidemic Diarrhea; PED) は、コロナウイルス科アルファコロナウイルス属の PED ウイルス (PEDV) を病原体とする急性伝染病である。PED は1970年代前半に英国で伝染性胃腸炎 (Transmissible gastroenteritis; TGE) とは異なるコロナウイルス様粒子が関与する豚の新しい下痢症として報告されて、1978年にはベルギーで初めて PEDV (CV777株) が分離された¹⁰⁾。その後、ドイツ、フランスなどの欧州各地で散発発生を繰り返し、1980年代にはアジアにも拡大した。1990年代には我が国で流行し、約4万頭の子豚が死亡するに至った¹⁷⁾。2013年に再び大流行し、1990年代の発生件数をはるかに上回る深刻な被害をもたらした^{8,12)}。その後、PED 防疫対策及び飼養衛生管理基準の見直しと徹底化により発生件数が著しく減少したが、5年経過した現在もまだ発生が継続している。

当社は、鶏卵黄免疫グロブリン (Immunoglobulin Yolk; IgY) 抗体を用いた受動免疫賦与により、幼若家畜の腸管感染症に対する予防対策の研究と実用化に取り組んでいる^{3,6,5,9,23,24,25)}。本稿では、抗 PEDV IgY 抗体の受動免疫賦与による発症軽減効果を紹介し、PED 防疫対策を補佐するための IgY 抗体活用法を提案する。

1. 鳥類の受動免疫と特異的 IgY 抗体の作用機序

豚は乳汁を子豚が摂取することにより免疫グロブリンの受け渡し (受動免疫) を成立させる。一方、鳥類の受動免疫は、親鳥が血清中の免疫グロブリンを卵黄

に蓄積してから産卵し、生まれてくる雛に卵黄を介して親鳥が持つ免疫グロブリンを受け渡す。この鳥類に備わっている「卵黄への抗体輸送機能」という生物学的な仕組みを利用して、家畜の腸管感染症の病原体に対する特異的 IgY 抗体を作製することができる。

不活化したターゲット抗原をオイルアジュバンドと混和して産卵系親鶏に接種することで、接種抗原に対する IgY 抗体を多く蓄積した卵をほぼ毎日回収することができる。また、一定期間の間隔にて追加接種することで、高抗体価の IgY 抗体を含有する卵の産卵を長期間維持させることができる。この卵を洗卵、割卵、低温殺菌、スプレードライ処理を経て、特異的 IgY 抗体を含有する鶏卵粉末を大量に製造する技術が確立されている。この特異的 IgY 抗体含有鶏卵粉末を飼料や混合飼料 (粉末サプリメント、ペースト材) に配合し幼若家畜に摂取させることで、腸管腔内のターゲットとする病原体に特異的 IgY 抗体が結合する。このことで病原体の腸管上皮細胞への付着阻害や増殖抑制により、感染を予防または発症を軽減する。これが特異的 IgY 抗体により受動免疫が賦与される作用機序である。

2. 抗 PEDV IgY 抗体の症状軽減効果

当社では1980年代に我が国で発生した PED 発症子豚の下痢便材料から分離した PEDV G1a 80年代株を Vero 細胞で大量培養した。その PEDV を不活化して産卵鶏に接種し抗 PEDV G1a IgY 抗体を含有する鶏卵粉末を作製し、子豚を用いた PEDV 攻撃試験によってその症状軽減効果を検証している⁴⁾。

PED、TGE、ロタウイルス、腸管毒素原性大腸菌の病原体が陰性で抗 PEDV 抗体陰性の繁殖農場で、PED ワクチン未接種母豚より生まれ、初乳を摂取させた1日齢の新生豚を当研究施設に導入した。導入日より

表1. 抗PEDV IgY抗体投与によるPEDV攻撃後の症状軽減効果に関する検証

試験群	供試頭数	給与IgY抗体の中和抗体価	死亡率 (%)	下痢発症日数	累積下痢スコア ^a	増体重 (%) ^b
I	4	0 (無給与)	100	6.5 ± 0.5	37.3 ± 3.0	- 18.5 ± 3.0
II	4	80倍/1g/ドーズ	25	3.3 ± 1.3 **	15.0 ± 9.1 **	- 7.9 ± 14.3
III	4	160倍/1g/ドーズ	0 *	2.3 ± 0.4 **	7.3 ± 3.5 **	3.9 ± 4.0 **
IV	4	320倍/1g/ドーズ	0 *	1.3 ± 1.3 **	4.5 ± 4.7 **	7.8 ± 4.9 **

I 群に対して、* : P<0.05 ** : P<0.01

a 累積糞便スコア (正常便0、軟便1、泥状便2、水様便3、1日朝夕の2回記録)

b 増体重は、ウイルス投与日の感染前体重に対して7日間給与終了の翌朝または、死亡時の体重より算出した。

SPF Lac 代用乳を1日3回給与・飼育した子豚を本試験に用いた。各試験群は均一に4頭を割り振り、3日齢時に下痢便材料から分離したPEDV G1a 80年代株のウイルス培養液 (1×10^6 TCID₅₀/頭) を全頭に経口投与した (表1)。中和抗体価80倍/g、160倍/g 及び320倍/gの抗PEDV G1a IgY抗体含有鶏卵粉末1gを1回あたりの給与量とした。各1gを代用乳に溶解し、ウイルス経口投与日より1日3回、7日間連続給与して臨床症状を観察した。評価項目は、死亡率、下痢発症日数、累積糞便スコア (正常便0、軟便1、泥状便2、水様便3、1日朝夕の2回記録) 及び観察期間の増体重とした。増体重は、ウイルス経口投与日の投与前体重に対して7日間給与終了の翌朝または、死亡時の体重より算出した。

IgY抗体無給与対照の第I群では、激しい水様性下痢を呈して観察期間中に全頭が死亡したのに対して、IgY抗体給与の第II群では4頭中1頭の死亡、第III群及び第IV群は全頭生残した。下痢発症日数及び累積下痢スコアでは、IgY抗体を給与した全ての群で有意な効果が確認された。下痢症状を反映する増体重においても、第I群は $-18.5 \pm 2.6\%$ であったのに対して、第III群は $3.9 \pm 4.0\%$ 、第IV群は $7.8 \pm 4.9\%$ であり、有意な増加が確認された (表1)。これらの結果はIgY抗体が中和抗体価依存的にPEDV発症軽減効果をもたらすことを示していた⁴⁾。

3. 近年流行株の北米型 G2b に対する IgY 抗体の作製

1) PEDV の遺伝学的特徴

PEDVはプラス一本鎖のRNAウイルスであり、エンペロープの表面に放射状のスパイク(S)蛋白を有する。S蛋白は、宿主細胞への侵入に重要であるとともに、中和抗体の産生を誘導する。また、PEDVを含むコロナウイルス全般において病原性に関わっていることが知られている^{7,14)}。そのため、本ウイルスの遺伝的特徴を知るために、S蛋白をコードする遺伝子(S遺伝子)の系統樹解析が行われており、少なくともこれまでに

Group I と Group II の2つのグループが存在することが知られている¹⁾。さらに、1980年代及び1990年代の国内分離株は Group I a (G1a) に、2013年以降の大流行の主要株 (北米型) は Group II b (G2b) に、北米型とほぼ同時期に世界中で流行し、北米型と比較してS遺伝子に2箇所の欠損と1箇所の挿入を持つS INDELS型は Group I b (G1b) に分類される^{7,15,18,19,20)} (図1)。

2) 近年流行株北米型のウイルス分離

2014年に岐阜県下で発生したPED発症豚の空腸乳剤材料よりウイルス分離を実施した。分離の手順は、空腸乳剤をウイルス分離用イーグルMEMで懸濁し、遠心上清をVero細胞(Ky-5株)に接種し、PEDV特有の細胞変性効果(CPE)の出現を確認した後、さらに連続4継代した培養液を用いてブランク培養法によるクローニングを行った。

クローニングは、4継代培養液の遠心上清を $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 段階希釈し、6ウェルプレートに培養したVero細胞に接種して37°C CO₂インキュベーター内で1時間吸着させた。吸着後上清を除いて0.8%アガロース添加MEMを2mL/ウェル加えて5日間培養した後、さらに0.8%アガロースと0.02%ニュートラルレッド添加MEMを2mL/ウェル重層して1日間培養した。発現したブランクを採取して、96ウェル、48ウェル及び24ウェルプレートに培養したVero細胞を用いて連続継代培養後、RT-PCR法にて分離したウイルスがPEDVであることを確認した。このウイルス培養液($10^{3.5}$ TCID₅₀/mL)をオリジナルシードとした。また、オリジナルシードより6継代したウイルスについてS遺伝子の系統樹解析を行った結果、G2b北米型株(EW-PEDV/JPN/2014)と同定された (図1)。

3) 分離ウイルス株の大量培養方法の確立

中和抗体価の高い抗PEDV IgY抗体を作製するためには、高濃度の不活化ウイルスを鶏に接種する必要がある。そのため、分離ウイルス株を馴化させて高ウイルス力価が得られる大量培養方法を検討した。

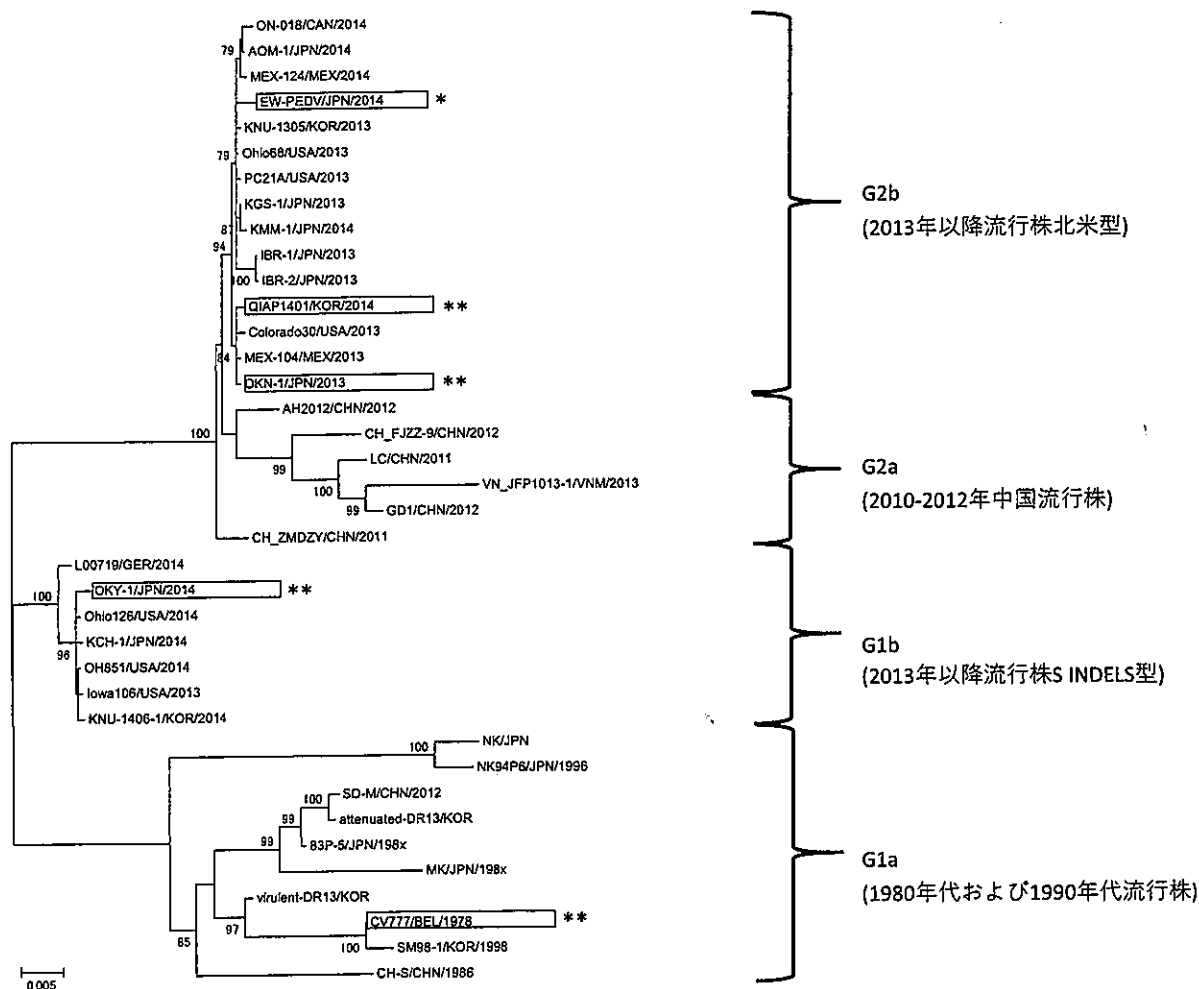


図1. PEDV S遺伝子のS1領域に基づく遺伝学的分類
 系統樹解析はMEGA6を用いて行った。遺伝学的分類はLeeの報告に基づいて実施した⁷⁾。
 各数値は遺伝的に近縁であることの確からしさ(%)あるいは信頼度(%)を示す。
 各株は株名、国、年の順で表記されている。
 *は本研究での分離株 **は本研究のウイルス中和活性評価試験に用いた株

はじめに、分離ウイルス株を175 cm²サイズの細胞培養フラスコに培養した Vero 細胞に接種して連続継代にてウイルス力価を高めていった。その結果、オリジナルシードより 6 継代目では 10^{5.5} TCID₅₀/mL、27 継代目では 10^{6.9} TCID₅₀/mL のウイルス力価が確認された。次に、22 継代目のウイルス液 10^{6.5} TCID₅₀/mL を用いて、ローラーボトルによる培養方法に切り替えた結果、オリジナルシードより 30 継代以内で 10^{7.3} TCID₅₀/mL のウイルス液を得ることに成功した。

4) ウイルス中和活性評価試験の抗 PEDV IgY 抗体作製

PEDV G1a 80年代株及び G2b 北米型株のウイルス培養液を限外ろ過膜濃縮して、両株を同じウイルス力価に調整した後、終濃度0.2%のホルマリンにて不活化した。不活化ウイルス抗原をオイルアジュバントと混

和して産卵鶏に2回接種して、その後3週目から5週目の期間に産卵した卵より、IgY 分画を粗精製し、凍結乾燥粉末化して、抗 PEDV G1a IgY 抗体及び抗 PEDV G2b IgY 抗体を作製した。陰性対照 IgY 抗体は、PEDV の非接種鶏が産卵した卵を用いて、同様に作製した。それぞれの IgY 抗体を同一条件とするために、総 IgY 濃度として 10mg/mL 濃度溶液に調整して 0.45µm フィルターろ過滅菌したものを試験に用いた。

4. ウイルス中和活性評価試験

各種 PEDV 株を用いて、今回作製した 2 種類の PEDV IgY 抗体と陰性対照の IgY 抗体のウイルス中和抗体価を比較した。ウイルス中和抗体価の測定方法は、各 IgY 抗体 10mg/mL 溶液を抗体希釈液 (イーグル MEM に 0.295% Tryptose phosphate broth 及び 10 µg/mL トリプシン添加) にて 20 倍希釈から 2 倍階段希

積し、200 TCID₅₀ に調整したウイルス液と等量混和して、37℃ 1時間インキュベーションした。96ウェルプレートに培養した Vero 細胞へ混合液を100 μ L/ウェル接種して、37℃ 2時間インキュベーションした。その後、混合液を除き Vero 細胞を MEM で1回洗浄して抗体希釈液に交換後、37℃で3日間培養してCPEを観察して判定した。

抗 PEDV G1a IgY 抗体が G1a 株 (CV777/BEL/1978) に対して160倍、G2b 株 (OKN-1/JPN/2013) 及び G1b 株 (OKY-1/JPN/2014) に対して80倍を示した (表2)。一方、抗 PEDV G2b IgY 抗体は、G1a 株に対して80倍、G2b 株及び G1b 株に対して160倍を示した (表2)。また、2014年に各県で分離された PEDV 株 (遺伝学的解析は未実施) に対して、抗 PEDV G1a IgY 抗体が全株に対して160倍を示し、抗 PEDV G2b IgY 抗体は320倍を示した (表3)。

特に、近年流行株に対して、今回作製した抗 PEDV G2b IgY 抗体が、従来の抗 PEDV G1a IgY 抗体より2倍高い抗体価を持つことが示された。

韓国で2014年に分離同定された G2b 北米型株 (QIAP1401-P1/2014/KOR)²⁾ を用いて、上記と同様にウイルス中和抗体価を評価した結果、抗 PEDV G1a IgY 抗体は320倍、抗 PEDV G2b IgY 抗体は640倍を示した。韓国分離株でも抗 PEDV G2b IgY 抗体が、従来の抗 PEDV G1a IgY 抗体より2倍高い抗体価を持つことが示された。陰性対照 IgY 抗体は、代表的な遺伝学的分離グループ株、2014年各県分離株及び韓国分離株の全株に対して20倍以下を示した。

5. 子豚における IgY の体内動態

1) 消化管における IgY の経時的動態

抗体は水溶性の蛋白質であるため、経口摂取した場合、一般的には胃酸や消化酵素によって分解され抗原抗体結合活性が失われるとされているが、消化能力が十分でない若齢豚では抗体活性を維持したまま小腸から結腸まで到達して、受動免疫賦与が成立することを以下の試験で確認している²²⁾。

6日齢豚6頭に、精製 IgY 100mg/mL 濃度溶液を1頭あたり5mL 強制経口給与した。IgY 給与日から剖検時までには給餌なしとした。IgY 給与後2、6及び24時間目に2頭ずつ剖検し、胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸内容物を採材し、内容物中に含まれる総 IgY 濃度を定量した。

IgY 給与後2時間目は、十二指腸で IgY 濃度が最も高く、内容物1gあたり IgY 0.66mg が含まれており、空腸でも0.38mg/g の IgY が到達していることが確認された。6時間目では、胃、十二指腸にはほぼ残留せず、回腸 (0.7mg/g) を中心として結腸まで到達していた。さらに24時間目では、結腸において0.57mg/g が確認されたが、回腸より上部では検出されなかった (図2)。本稿では詳細は示さないが、採材した腸内容物の特異的 IgY の抗体価測定結果と総 IgY 濃度の間に相関があることを確認している。さらに21、28日齢豚で同様な試験を行った結果、回腸及び結腸内容物から特異的 IgY の低い抗体価と総 IgY の検出を確認している。これらの結果から、若齢豚では経口摂取した IgY の一部は抗体活性を維持したまま小腸から結腸まで到達すると考えられる²²⁾。

表2. 代表的な遺伝学的分離グループ株に対するウイルス中和抗体価測定結果

遺伝学的分類グループ ^a	ウイルス株名	試験IgY抗体(総IgY濃度 10mg/mL)		
		抗PEDV G1a IgY抗体	抗PEDV G2b IgY抗体	陰性対照IgY抗体
G1a	CV777/BEL/1978	160	80	<20
G2b	OKN-1/JPN/2013	80	160	<20
G1b	OKY-1/JPN/2014	80	160	<20

^a遺伝学的分類グループは図1に基づいている。

表3. 2014年に各県で分離された株に対するウイルス中和抗体価測定結果

分離都道府県	家畜衛生微生物 株名	試験IgY抗体(総IgY濃度 10mg/mL)		
		抗PEDV G1a IgY抗体	抗PEDV G2b IgY抗体	陰性対照IgY抗体
鹿児島県	H26-02	160	320	<20
大分県	H26-03	160	320	<20
広島県	H26-08	160	320	<20

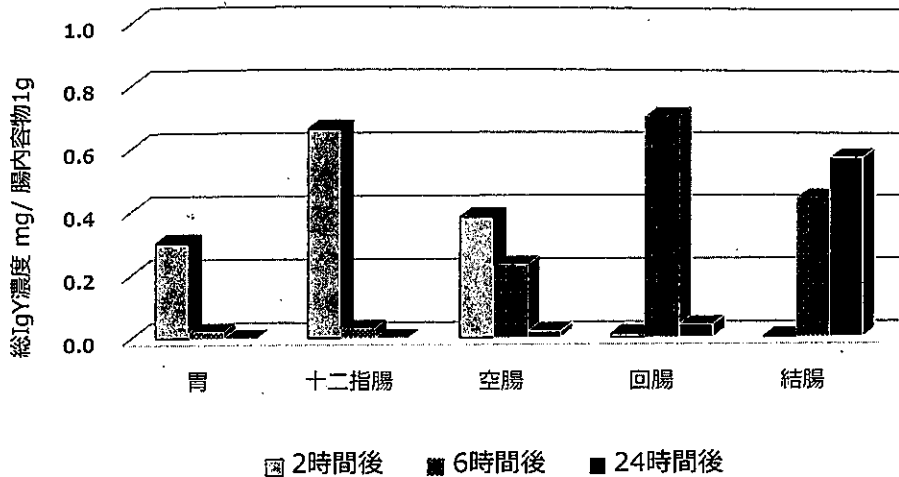


図2. 消化管におけるIgYの経時的動態

2) 新生豚におけるIgYの血中移行と経時的推移

新生豚は、初乳に含まれる抗体（主にIgG）を小腸より摂り込み血中に移行させる。しかし、抗体は分子サイズが大きい蛋白質であるため、新生豚が小腸から抗体を血中に移行できるのは出生後24時間のみである。

IgYは7SタイプのIgGであり、鶏の血清中IgGが卵黄に移行したものである。哺乳類のIgGはH鎖不変領域が3個で分子サイズ160kDaに対して、鳥類はH鎖不変領域が4個からなり180kDaと分子サイズが大きいことが特徴である。

そこで、新生豚へのIgY給与後の血中への移行確認及び移行IgY血清中濃度の経時的推移をモニターするため、以下の試験を実施している²²⁾。本試験は、同一母豚より出生した新生豚を用いて一般生産農場で飼育・管理し、供試子豚は母豚に付け初乳、常乳ともに自由摂取させた。出生後10時間目に新生豚4頭、34時間目に2頭に精製IgY 12.9mg/mL濃度溶液を1頭あたり5mL経口給与した。IgY給与後2時間、2、4、6、14、21日に採血して血清中の総IgY濃度を定量した。

出生後10時間目にIgYを給与した子豚の血清中よりIgYが検出でき、経口給与したIgYは血中移行することが確認された。出生後34時間目にIgYを給与した子

豚の血清中からは、僅かなIgYが検出された。これらは血中への移行は主に24時間以内である知見を再現する結果であった。一方、10時間目に給与して血中移行したIgYの経時的変化は、2日目の98.1μg/mLをピークに日数の経過に伴い減少し、6日目では16.5μg/mL、14日目で0.9μg/mLであった（表4）。

本試験より、血中移行したIgYは約1～2週間子豚の体内を循環していることが確認された²²⁾。

まとめ

これまで当社では、PEDV G1a 80年代株に対するIgY抗体を製造し、混合飼料としてPED予防対策を補佐するIgY抗体の活用法の確立に取り組んできた。しかしながら、近年流行株のS遺伝子変異^{14,18)}に対応するために、今回新たにG2b北米型株のウイルス分離を行い、分離より約30継代以内で高力価のウイルス培養液の大量製造法を確立した。このウイルスで作製した抗PEDV G2b IgY抗体について、子豚への近年流行株攻撃試験を通じた症状軽減効果の検討及びフィールドにおけるPED予防効果の検証は今後の課題である。

本研究のウイルス中和活性評価試験で、従来の抗PEDV G1a IgY抗体と比較して、新たに作製した抗

表4. 新生豚に経口投与したIgYの血中移行に関する経時的推移

IgYの経口投与 タイミング	IgY投与後 採血ポイント					
	2時間後	2日後	4日後	6日後	14日後	21日後
出生後 10時間目 (n=4)	85.2	98.1	38.3	16.5	0.9	0.1
出生後 34時間目 (n=2)	0.5	0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

単位：血清1mLあたりの総IgY濃度 (μg/mL)

PEDV G2b IgY 抗体は、近年流行株に対して2倍高い抗体価を示すことが確認された。この抗体価の2倍の違いは、子豚を用いたPEDV 攻撃試験結果(表1)で示した通り、死亡率、下痢症状、増体重に反映されると考えられる。

PEDV の感染により著しい被害を受ける哺乳豚は、抗 PEDV 抗体による受動免疫賦与が必要であり、そのために母豚への適切なワクチン接種は有効である。2回ワクチン接種した母豚の初乳は抗体価が32倍から4096倍、分娩後の5~7日後の常乳の抗体価も平均20倍を維持すると報告されている¹¹⁾。しかしながら、母豚による免疫応答の差や多産のために全子豚が十分な初乳や常乳が摂取出来ないケースもある。それを補うためにIgY抗体を活用した受動免疫賦与は有効であると思われる。

Wardら²¹⁾は、新生豚において初乳から血中移行した抗体によりウイルス性下痢症の症状軽減効果を実験的に証明した。ロタウイルスに対して免疫を保有する母豚の初乳、ロタウイルスに対して免疫のない母豚の初乳を出生後12時間以内の新生豚に投与し、その後代用乳で給与・飼育し、3日齢時にロタウイルスを経口投与した結果、血中抗ロタウイルス抗体の抗体価に依存して下痢及び増体重に有意な症状軽減効果を示した。当社が作製した抗 PEDV IgY 抗体により同様な効果が得られるかは検証しなければならないが、我々が示した新生豚におけるIgY給与後の血中移行と長期循環及びWardらの報告を合わせて考慮すると、新生豚への高力価な抗 PEDV IgY 抗体給与により、本疾病の発症軽減効果が得られることが期待された。

具体的には、抗 PEDV G2b IgY 抗体含有鶏卵粉末(現在抗体価1280倍/g が得られている)を高濃度に配合した中鎖脂肪酸ベースのペースト材を出生後12時間以内の給与と、代用乳や慣らし人工乳(餌付け飼料)に鶏卵粉末を添加して給与することがあげられる。農場全体としては、日頃より離乳豚及び分娩前後母豚の飼料にも添加することで、発生予防または常在型 PEDV の水平伝播への対策に貢献できると考えられる¹³⁾。

PED 防疫対策は、衛生管理、消毒剤の適切な使用¹⁶⁾、飼養管理、母豚ワクチン接種を徹底することである。さらに、これらの基本対策を補足する資材としてIgY抗体の活用も視野に入れていただきたい。

利益相反状態の有無

全ての著者は開示すべき利益相反はない。

謝辞

本研究を進めるにあたり、PED 発症豚の空腸乳剤の提供とご協力していただきました岐阜県中央家畜保健衛生所の長谷部技師はじめ職員の方々及び、PEDV 2014年各県分離株を提供していただきました農林水産省動物医薬品検査所の方々に深謝いたします。

本内容の一部は、農研機構 動物衛生研究部門及び株式会社イーダブルニュートリション・ジャパンの平成29年度共同研究にて実施されたものである。

引用文献

- 1) Chen Q. (2014) Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 Disease outbreak among swine in the United States. *J Clin Microbiol*, 52: 234-243.
- 2) Dong-Kun Y, et al. (2018) Isolation and characterization of a new porcine epidemic diarrhea virus variant that occurred in Korea in 2014. *J Vet Sci*, 19: 71-78.
- 3) Ikemori Y, et al. (1997) Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet Microbiol*, 58: 105-111.
- 4) 児玉義勝 (2014) 豚流行性下痢症 (Porcine Epidemic Diarrhea; PED) ウイルスに対するニワトリ卵黄免疫グロブリンを用いた経口受動免疫の応用. *Pig J*, 10月号. 60-65.
- 5) 児玉義勝 (2011) 海外で実施した機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk: IgY) を含有する鶏卵粉末の野外評価試験. *Pig J*, 2月号. 1-6.
- 6) Kuroki M, et al. (1993) Passive protection against bovine rotavirus-induced diarrhea in murine model by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. *Vet Microbiol*, 37: 135-146.
- 7) Lee C. (2015) Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology*, 12: 193.
- 8) 宮崎綾子ら (2014) 豚流行性下痢 (PED) の現状と学術的知見. *豚病会報*, 64: 15-24.
- 9) Nguyen S, et al. (2005) Hyperimmunized chicken egg protein improves performance of piglets.

- Asian pork magazine, April/May: 18-19.
- 10) Pensaert MB, et al. (1978) A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. Arch Virol, 58: 243-247.
 - 11) 佐藤哲郎 (2016) 生ワクチンを利用した豚流行性下痢対策の現状と今後の展望. 日本 SPF 豚研究会, 49:13-21.
 - 12) 末吉益雄 (2015) 我が国内における1990年代と2013-14年における豚流行性下痢の発生背景. 豚病会報, 65:6-12.
 - 13) 園田昭浩 (2015) PED 清浄化を支えた検査の実例. 養豚界, 10月号:27-34.
 - 14) Suzuki T, et al. (2018) S1 Subunit of spike protein from a current highly virulent porcine epidemic diarrhea virus is an important determinant of virulence in piglets. Viruses, 30:10. pii: E467.
 - 15) Suzuki T, et al. (2015) Molecular characterization of pig epidemic diarrhea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. Infect Genet Evol 36:363-368.
 - 16) 鈴木亨ら (2018) PED ウイルスの物理化学的性状に関する研究. 豚病会報, 71:17-20.
 - 17) 津田知幸 (1997) 豚流行性下痢 (PED). 豚病会報, 31:21-28.
 - 18) Van Diep N, et al. (2018) Molecular characterization of US-like and Asian non-S INDEL strains of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) that circulated in Japan during 2013-2016 and PEDVs collected from recurrent outbreaks. BMC Vet Res, 14:14(1):96. doi: 10.1186/s12917-018-1409-0.
 - 19) 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.
 - 20) Wang L, et al. (2014) New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. Emerg Infect Dis, 20: 917-919.
 - 21) Ward LA, et al. (1996) Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A Rotavirus. J Infect Dis, 174: 276-282.
 - 22) Yokoyama H, et al. (1993) Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. Am J Vet Res, 54: 867-872.
 - 23) Yokoyama H, et al. (1992) Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. Infect Immun, 60: 998-1007.
 - 24) Yokoyama H, et al. (1997) Effect of oral egg antibody in experimental F18+ *Escherichia coli* infection in weaned pigs. J Vet Med, Sci, 59: 917-921.
 - 25) Yokoyama H, et al. (1998) Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. Am J Vet Res, 59: 416-420.