

愛知県における PCV2 流行株の遺伝子型調査と国内で初めて検出された PCV2e の塩基配列解析及びアミノ酸配列解析

中央家畜保健衛生所 おくむらたかき 奥村貴樹、くぼたかし 久保卓司

1. はじめに

豚サーコウイルス 2 型（以下 PCV2）は、環状の 1 本鎖 DNA ゲノムを有する DNA ウイルスであり、豚サーコウイルス関連疾病（以下 PCVAD）の原因ウイルスである。PCV2 は、ORF2 領域の解析により、PCV2a から PCV2e の 5 つの遺伝子型に分類される [1]。国内及び海外における PCV2 流行株は、PCV2a 及び PCV2b が主体であると報告されていた [2] [3] が、近年、アメリカや中国、韓国等の諸外国では、優勢な遺伝子型が PCV2d に変化していると報告されており [4-6]、国内でも PCV2d の浸潤が確認されている [7]。一方、県内における流行株の遺伝子型は不明である。そこで、県内流行株の遺伝子型を調査したので報告する。また、調査の結果、国内で初めて PCV2e を検出し、PCV2e の浸潤状況調査や塩基配列の解析、アミノ酸配列の解析等を実施したので、あわせて報告する。

2. 材料と方法

平成 24 年から平成 29 年の病性鑑定材料のうち、PCV2 の特異遺伝子を検出した 42 農場の 46 検体を検査材料とした。検体及び農場の内訳は、図 1 のとおりである。

核酸抽出は、核酸抽出キット（QIAamp MinElute Virus Spin Kit、(株)キアゲン、東京）を用いた。その後、ORF2 遺伝子の特異的に増幅させるプライマー及び PCR 試薬

（PrimeSTAR HS DNA Polymerase、タカラバイオ(株)、滋賀）、鋳型 DNA $1\mu\text{L}$ を用いて、最終液量を $25\mu\text{L}$ として PCR を行った。増幅した PCR 産物は、MinElute PCR Purification Kit ((株)キアゲン、東京) を用いて精製後、ダイレクトシーケンス法により ORF2 領域の塩基配列を決定した。なお、塩基配列の解読は、北海道システム・サイエンス株式会社に依頼した。

得られた ORF2 領域の塩基配列は、国際 DNA データベースに登録されている検体とともに、MEGA7 ソフトを用いて分子系統樹解析を行い、各検体の遺伝子型を決定した。

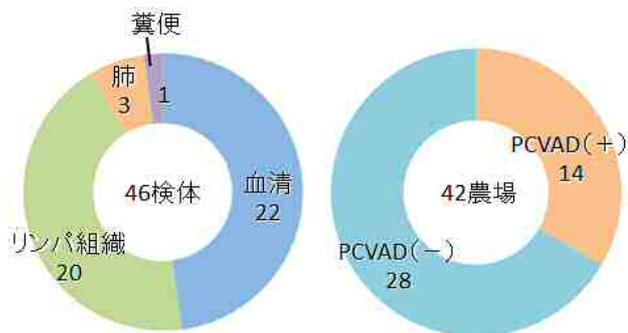


図1 検体及び農場の内訳

3. 結果

遺伝子型別の結果、PCV2a が 6 検体 (3 農場)、PCV2b が 12 検体 (12 農場)、PCV2d が 27 検体 (27 農場)、PCV2e が 1 検体 (1 農場) 検出された (図 2)。

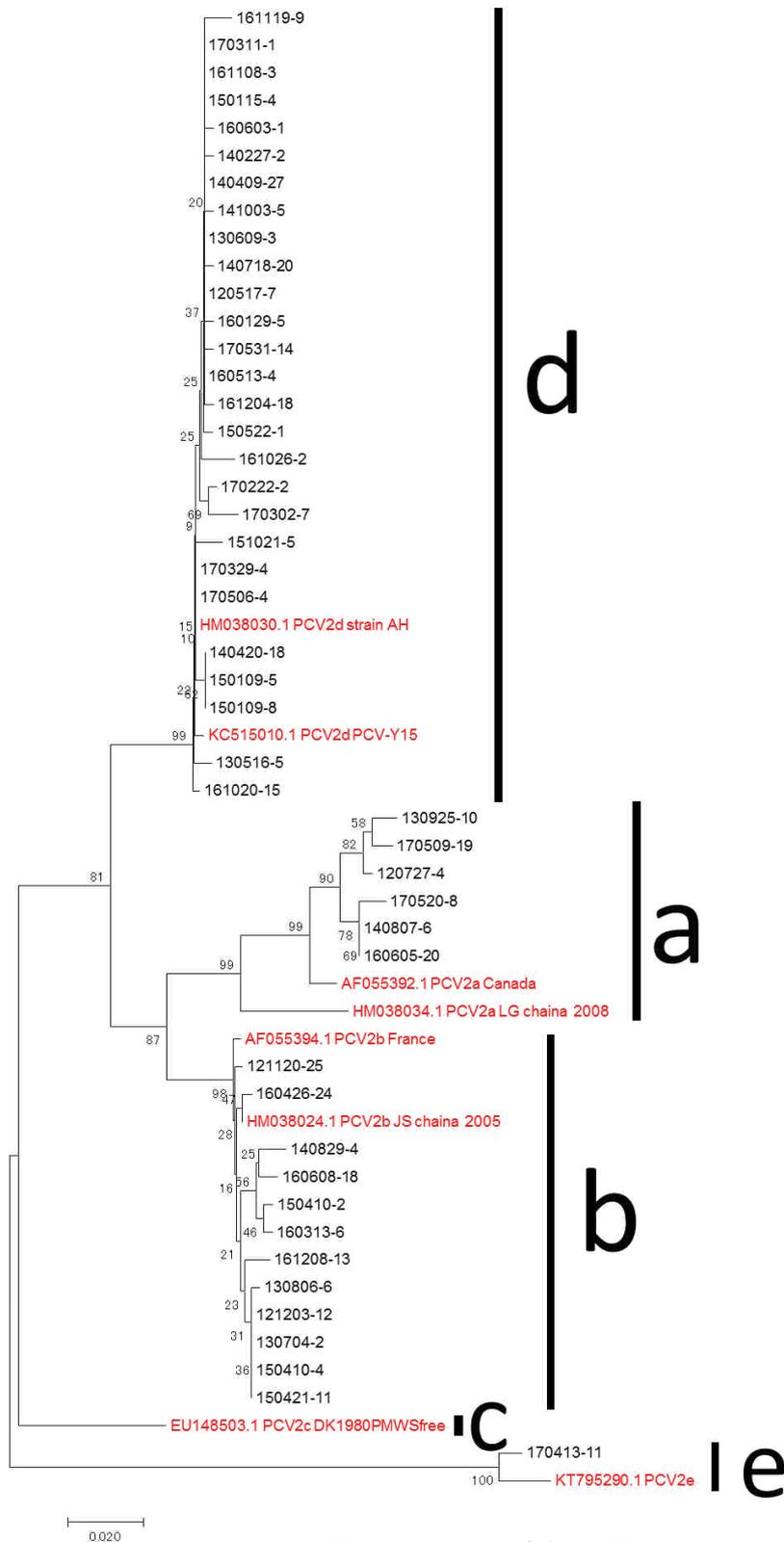


図 2 PCV2 の遺伝子型

(黒文字が検査検体、赤文字が国際 DNA データベース上の検体を示す)

PCVAD の発生を確認した 14 農場では、11 農場で PCV2d が、3 農場で PCV2b が検出され、PCVAD の原因として PCV2d が多数を占めた。なお、PCV2d を検出した 11 農場中 6 農場、PCV2b を検出した 3 農場中 1 農場は、ワクチン未接種もしくは、用量・用法を守らないなど不適切なワクチン接種を実施していた。

各遺伝子型の年度別検出状況は、図 3 のとおりである。いずれの遺伝子型も、特定の年度に集中して検出されることはなかったものの、PCV2d は、少なくとも平成 24 年度には県内に侵入していることが判明した。また、PCV2e は平成 29 年度に採材した糞便から検出された。

各遺伝子型の地域別浸潤状況は、図 4 のとおりである。検出された検体数の少なかった、PCV2a 及び PCV2e は、浸潤が確認された地域は限定的であった。一方、PCV2b 及び PCV2d は、県内に広く浸潤しており、特に PCV2d は、養豚農場が存在するほぼ全ての地域に浸潤していることが判明した。

4. PCV2e に関する追加調査

本調査において、PCV2e が国内で初めて検出されたため、当該農場における PCV2e の浸潤状況調査、検出された PCV2e の詳細な解析及び侵入経路の調査を実施した。

(1) 浸潤状況調査

当該農場は、母豚 400 頭規模の一貫経営養豚場である。本農場では、25 日齢の子豚に PCV2 ワクチンを接種しており、繁殖豚にはワクチンを接種していなかった。

PCV2e は、平成 29 年 4 月に採材した肥育豚舎の糞便から検出されており、採材時には全

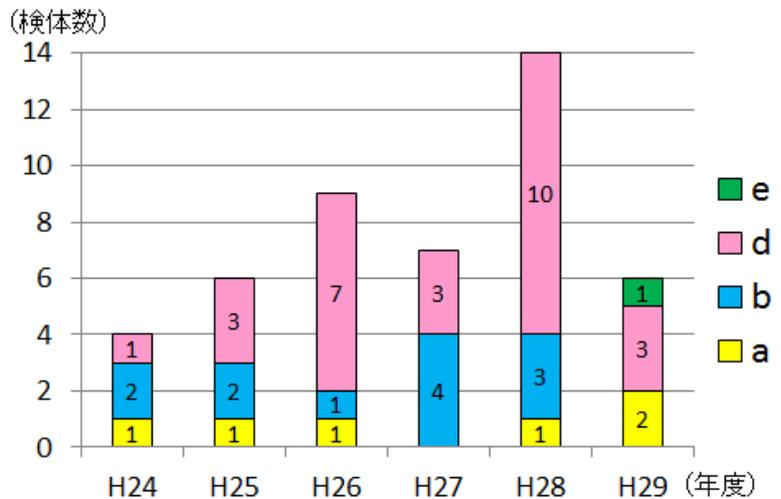


図 3 各遺伝子型の年度別検出状況

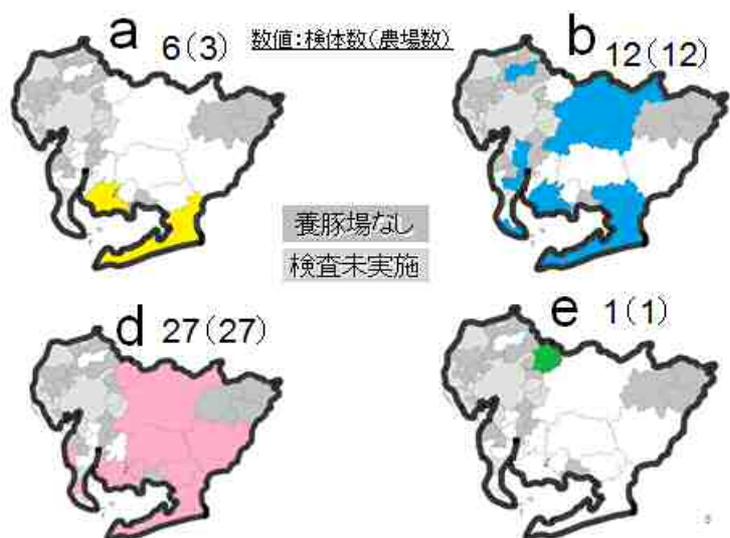


図 4 各遺伝子型の地域別浸潤状況
(各遺伝子型が検出された養豚場の市町村をカラーで示す)

豚舎において PCVAD を疑う症状は確認されなかった。本農場では、同時期に別の豚舎でも糞便を採材していたため、別豚舎の糞便材料を用いて PCV2e の浸潤状況を調査した。

その結果、分娩舎及び繁殖豚舎からも PCV2e が検出され（図 5）、それぞれの豚舎から検出された PCV2e の塩基配列は 100%一致した。なお、本調査により PCV2b が検出された豚舎も複数存在した。

(2) PCV2e の塩基配列解析及びアミノ酸配列解析

検出された PCV2e の塩基配列を他の遺伝子型と比較した結果、PCV2e は ORF2 領域のストップコドンの前に 15 塩基の挿入が確認された（図 6）。また、アミノ酸配列解析では、PCV2e は他の遺伝子型と比較して、ORF2 末端部に 4 個もしくは 5 個のアミノ酸の挿入が確認された（図 7）。

(3) 侵入経路の調査

検出された PCV2e の塩基配列を国際 DNA データベース上の検体と比較した結果、最も相対性が高い検体は、平成 27 年度に北米で検出された検体（アクセス番号 KT795288）であり、相対性は 98.8%であった。また、その他にも今回検出された PCV2e と 98%以上の相対性を持つ北米由来の検体が複数存在したため、北米からの侵入を疑ったが、本農場は北米との直接的な接点は無く、明確な侵入経路を特定するには至らなかった。

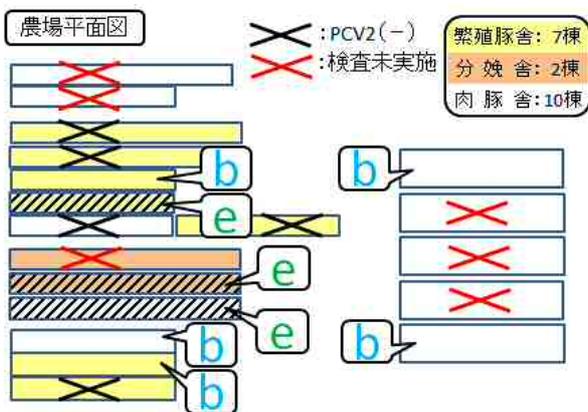


図 5 PCV2e の浸潤状況

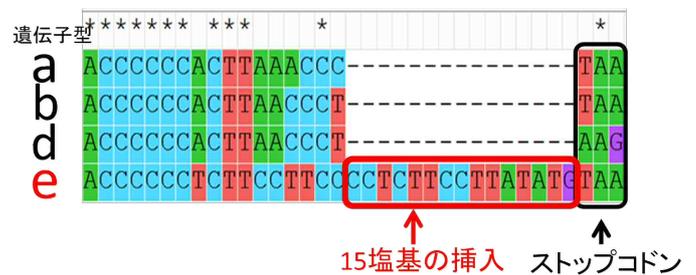


図 6 ORF2 末端部の塩基配列



図 7 ORF2 末端部のアミノ酸配列

5. まとめと考察

本調査により、愛知県では諸外国と同様に、PCV2d が優勢な遺伝子型として県内に広く浸潤していることが示された。また、PCV2d は平成 24 年度には既に県内に侵入しており、PCVAD の主要な原因となっていることも判明した。PCV2a に由来する現行のワクチンは、PCV2a のみならず、PCV2b や PCV2d にも有効であることが報告されている[8][9]が、遺伝子型が異なる場合は、同じ場合と比較して効果に差があることも報告されている[10]。県内では、ワクチン株と異なる遺伝子型が優勢となっており、ワクチンを適切に接種しなければ、PCVAD の発症リスクが高まると考えられるため、用量・用法を遵守したワクチン接種が重要である。

本調査により、国内で初めて PCV2e が検出された。当該農場における浸潤状況調査の結果、複数の豚舎から PCV2e が検出され、それぞれの塩基配列が 100%一致したことから、同一由来のウイルスが複数の豚舎に拡散した可能性が示されたものの、農場への侵入経路の特定には至らなかった。

PCV2e の塩基配列解析では、PCV2e は他の遺伝子型と比較して ORF2 末端部に 15 塩基の挿入があり、アミノ酸配列解析では、既報[11]と同様に 4 個もしくは 5 個のアミノ酸の挿入が確認された。当該農場は PCV2 ワクチンの接種農場であり、採材時及び過去に PCVAD を疑う症状は無かったため、PCV2e の病原性の程度は不明ではあるものの、PCV2e はアミノ酸の配列が他の遺伝子型と異なる特徴があるため、当該農場における PCV2e の影響を今後も注意深く観察する必要がある。

今後は、フルゲノムの解析等、PCV2e の更なる解析を進めていきたい。

最後に、本調査に多大なるご助言をいただいた動物衛生研究部門の高木道浩先生、新潟県中央家畜保健衛生所の羽入さち子先生、鹿児島県中央家畜保健衛生所の平島宣昌先生に深謝する。

引用文献

- [1] Xiao CT et al: J Gen Virol, 96, 1830-41 (2015)
- [2] Takahagi.Y et al: J Vet Med Sci, 72, 35-41(2010)
- [3] Opriessing T et al: J Gen Virol, 95, 2495-2503(2014)
- [4] Kwon T et al: Virus Res, 228, 24-29(2017)
- [5] Xiao CT et al: Vet Microbiol, 197, 72-77(2016)
- [6] Jiang CG et al: Arch Virol, 162(9), 2715-2726(2017)
- [7] 小池郁子ら, 日獣雑誌, 70, 650-654 (2017)
- [8] Park C et al: Clinical and Vaccine Immunology, 21(3), 399-406(2014)
- [9] Opriessing T et al: Vaccine, 35, 248-254(2017)
- [10] Opriessing T et al: Vaccine, 31(3), 487-494(2013)

[11]Karuppanan K et al:Viruses,9(5),99(2017)