

原 著

豚エンテロウイルス性脳脊髄炎の発生と血清学的調査

西 大輔^{1)†} 山口博之¹⁾ 宮崎綾子²⁾ 恒光 裕²⁾

1) 佐賀県中部家畜保健衛生所 (〒849-0928 佐賀市若楠2-7-4)

2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2011年3月9日受付・2011年8月11日受理)

要 約

2010年2月、繁殖母豚60頭飼養規模の一貫経営農場において、約40日齢の子豚42頭中6頭に発育不良が確認され、4日後に6頭中2頭が神経症状を呈して起立不能となった。起立不能豚2頭と発育不良豚1頭の計3頭について病性鑑定を行った結果、非化膿性脳炎がすべてに認められ、うち2頭の脳病変部から豚テシオウイルス-1 (PTV-1) 遺伝子が検出され、CPK細胞によりPTV-1が分離された。また、3頭の扁桃、体表及び腸間膜リンパ節から豚サーコウイルス2型 (PCV2) 抗原が検出された。一方、直腸内容からは豚エンテロウイルスB (PEV-B) とPTV-1が分離された。これらの結果から、本症例は、PCV2を発症要因とした豚エンテロウイルス性脳脊髄炎 (豚テシオウイルス性脳脊髄炎) と考えられた。本症例で分離されたPTV-1及びPEV-Bを使用し、佐賀県内49農場408頭の豚血清について中和試験を実施したところ、PTV-1、PEV-Bともに佐賀県内の養豚場において広く浸潤していることが確認された。

——キーワード：豚サーコウイルス2型、豚エンテロウイルス、豚テシオウイルス、豚エンテロウイルス性脳脊髄炎 (豚テシオウイルス性脳脊髄炎)。

----- 日獣会誌 65, 31～36 (2012)

豚エンテロウイルス性脳脊髄炎は、豚の伝染性神経疾患で、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。以前、本病の病原体は一括して豚エンテロウイルス血清型1-13として分類されていたが、近年の遺伝子解析の結果、血清型1-7及び11-13はピコルナウイルス科テシオウイルス属の豚テシオウイルス (PTV-1～PTV-11)、血清型8はピコルナウイルス科サペロウイルス属の豚サペロウイルス (PSV)、血清型9及び10はピコルナウイルス科エンテロウイルス属の豚エンテロウイルスB (PEV-9, PEV-10) として再分類された [1-3]。本疾病は古くはテッセン病及びタルファン病として知られていたが、原因ウイルスの再分類を機に、現在は国際的には豚テシオウイルス性脳脊髄炎と称されている [4]。PTV、PSV及びPEV-Bは国内外に広く分布していると考えられているが [5]、わが国における本病の報告は少なく、疫学実態は不明な点が多い [6]。

今回、佐賀県内の一養豚場で、約40日齢の子豚が神経症状を呈する事例が発生した。病性鑑定により、病理組織学的に非化膿性脳炎が共通所見として認められ、脳

病変部よりPTV-1、そして直腸内容よりPTV-1とPEV-Bが分離された。さらに、分離されたPTV-1及びPEV-Bに対する中和抗体保有状況を本県49養豚場において調査したので報告する。

材 料 及 び 方 法

発生状況及び検査材料：2010年2月、繁殖母豚60頭飼養規模の一貫経営農場において、約40日齢の子豚42頭中6頭に発育不良が確認され、4日後に6頭中2頭が振顫、運動失調等の神経症状を呈して起立不能となった。この起立不能となった2頭 (豚1及び豚2) と発育不良の同居豚1頭 (豚3) について病性鑑定を行った。

病理学的検査：剖検後、中枢神経及び各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、常法に従いパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い鏡検した。また、扁桃、脳、脊髄、リンパ節及び主要臓器について、抗PCV2ウサギ血清を用いた免疫組織化学的染色 (IHC) を実施した。

細菌学的検査：脳、主要臓器、直腸内容及び落下糞便

† 連絡責任者：西 大輔 (佐賀県中部家畜保健衛生所検査課微生物担当)

〒849-0928 佐賀市若楠2-7-4 ☎0952-31-2211 FAX 0952-34-1046 E-mail : nishi-daisuke@pref.saga.lg.jp

表1 本研究でPCRまたはRT-PCRに使用したプライマーセット

ウイルス	プライマー名	配列 (5'-3')	増幅領域	増幅産物 サイズ	引用 文献	
ウイルス遺伝子検出						
PCV2	first	VF-2	GAAGAATGGAAGAAGCGG	ORF 1 and ORF 2	1494 bp	[10]
		Nest-R	ACAGTCAGAACGCCCTCCT			
	nested	2-aF	AACAATCCACGGAGGAAGG	ORF 1 and ORF 2	568 bp	[10]
		2-aR	GGGACCAACAAAATCTCY			
	2-bF	CTGTTTTCGAACGCAGTG	ORF 2	360 bp	[10]	
	2-bR	CTCAAACCCCCGCTCTG				
PTV	first	pev-1a	AGTTTTGGATTATCTTGTGCCC	5'-UTR	321 bp	[7]
		pev-1b	CCAGCCGCGACCCGTGTCAGGCAGCAC			
	nested	pev-1c	TGAAAGACCTGCTCTGGCGCGAG	5'-UTR	158 bp	[7]
		pev-1d	GCTGGTGGCCCCAGAGAAATCTC			
PSV	first	pev-8a	CCCTGGGACGAAAGAGCCTG	3D pol	383 bp	[7]
		pev-8b	CCTTTAAGTAAGTAGTAAAGGG			
	nested	pev-8c	CCAAGATTAGAAGTTGATTTG	3D pol	221 bp	[7]
		pev-8d	GGGTAGCCTGCTGATGTAGTC			
PEV-B	first	pev-9a	GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA	5'-UTR	491 bp	[7]
		pev-9b	ACCCAAAGTAGTCGGTTCGCG			
	nested	pev-9c	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	5'-UTR	313 bp	[7]
		pev-9d	GTTAGGATTAGCCGCATTCA			
PTV遺伝子解析						
PTV	1298F	CCNGCNGARACAGGHTGTG	VP 1	431 bp	[8]	
	1301R	TTCCANGTRAANGARGG				
PTV	Talfan VP2-337F-puff	CACCARYTGCTTAARTGYKGTGG	VP 2	375 bp	[9]	
	Talfan VP2-654R-puff	CACAGGGTTGCTGAAGARTTGT				

を材料とし、チョコレート寒天培地、5%羊血液寒天培地、DHL寒天培地及び卵黄加CW寒天培地に直接塗抹し、37℃で24～48時間、好気、微好気及び嫌気培養した。

ウイルス学的検査：豚1、豚2、豚3の脳及び豚1から3のプールした直腸内容の10%乳剤を作成し、CPK細胞及びHmLu-1細胞に接種後、5%炭酸ガス存在下で37℃7日間培養して細胞変性効果（CPE）の出現の有無を観察した。CPEが認められない場合、7日間隔での盲継代を5回実施した。PTV、PSV及びPEV-Bの遺伝子検出を目的として、上記乳剤及びCPEが確認された培養上清よりInvitrogen社 TRIzol LS Reagentを用いてRNAを抽出した後、表1に示したZellら [7] のプライマーペアを用い、市販キット（OneStep RT-PCR Kit, QIAGEN社、東京）でRT-nested PCR検査を行った。PTV特異遺伝子が検出された培養上清については、PTVの血清型を遺伝学的に分類するために、表1に示したプライマーペア1298F/1301R及びTalfan VP2-337F/654R-puffを用いてVP1及びVP2領域遺伝子を増幅し、得られたPCR産物の塩基配列をそれぞれ決定した [8, 9]。VP1領域131アミノ酸配列（PTV-1 F65株VP1の16番目から146番目アミノ酸領域）及び

VP2領域104アミノ酸配列（PTV-1 F65株VP2の107番目から210番目アミノ酸領域）について、フリープログラムMEGA4を用いてGenBankに登録されているPTV 46株、2002年及び2007年に富山県及び千葉県で分離された2株のPTV-1と分離株との多重整列を行い、近隣結合法により分子系統樹を作製した。系統樹の信頼性を得るため、ブーツストラップ解析を1,000回反復で行った。アミノ酸配列の相同性解析にはDNASTAR Lagergene 7を使用した。また、豚サーコウイルス2型（PCV2）の検査を目的として、上記脳及び直腸内容の乳剤及びCPEが確認された細胞上清より市販キット（DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN社、東京）を用いてDNAを抽出し、表1に示したLyoら [10] のプライマーペアを用いて市販のキット（AmpliAq Gold PCR Master Mix, Applied Biosystems社、東京）でPCR検査を行い、PCV2遺伝子型PCV2a及びPCV2bの特異遺伝子の検出を行った。

その他、扁桃から蛍光抗体法による豚コレラウイルス抗原検索及び血清のラテックス凝集反応によるオーエスキー病ウイルス抗体検査を実施した。

血清学的調査：2010年9月から10月に県内の49農場から採材した54～180日齢の肥育豚317頭及び繁殖

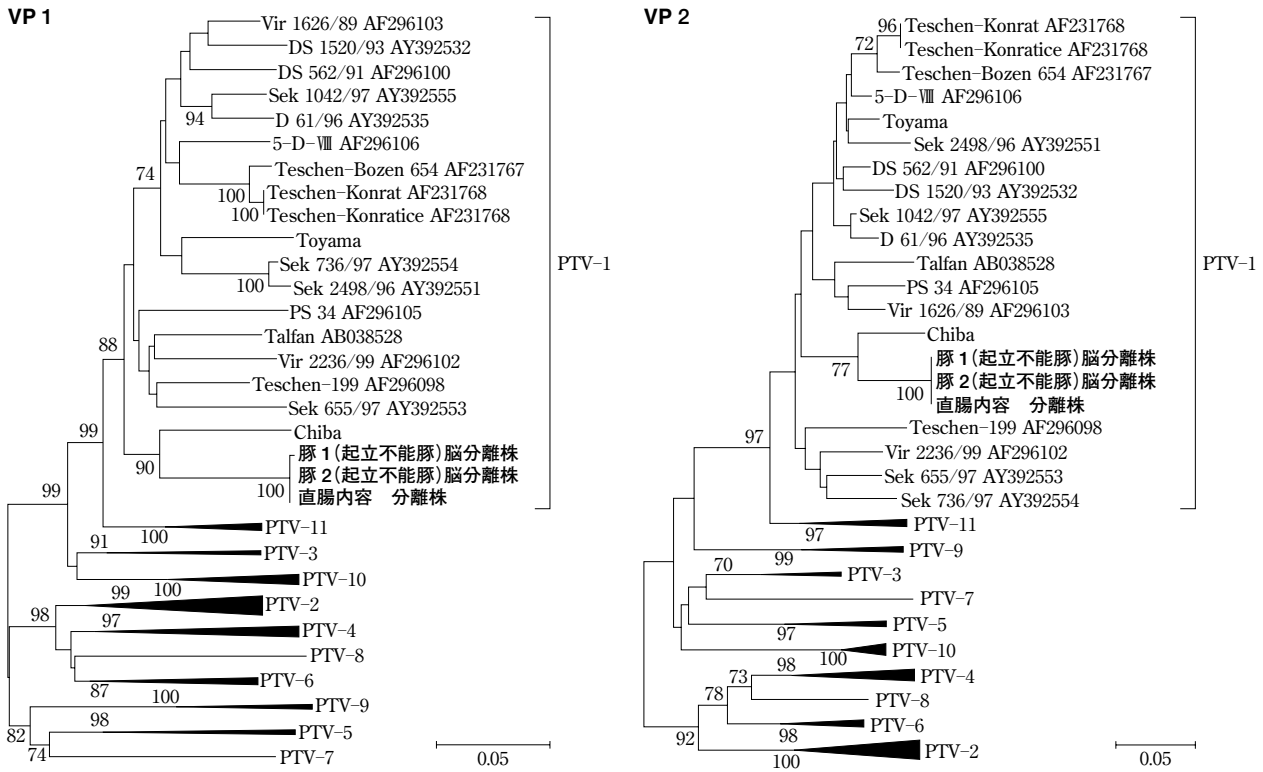


図1 PTV VP1領域131アミノ酸配列 (PTV-1 F65株VP1の16番目から146番目アミノ酸領域, 左) 及びVP2領域104アミノ酸配列 (PTV-1 F65株VP2の107番目から210番目アミノ酸領域, 右) に基づく分子系統樹。70%以上のブーストラップ値が得られた枝についてのみブーストラップ値 (%) を示した。

表2 ウイルス遺伝子検出及びウイルス分離成績

豚	材料	ウイルス遺伝子検出					ウイルス分離			
		PCV2a	PCV2b	PTV	PSV	PEV-B	CPK	HmLu-1		
豚1 (起立不能豚)	脳	-	+	+	-	-	+	(PTV-1)	-	
豚2 (起立不能豚)	脳	-	+	++	-	-	+	(PTV-1)	-	
豚3 (発育不良豚)	脳	-	+	-	-	-	-	-	-	
3頭プール	直腸内容	-	+	++	-	++	+	(PTV-1)	+	(PEV-B)

母豚91頭の計408頭の豚血清を用い、今回分離したPTV-1及びPEV-Bを供試ウイルスとした血清中和試験を実施した。中和試験は、マイクロプレート法により、血清を56℃で30分間非働化後2倍階段希釈し、各希釈液に200TCID₅₀に調整した各ウイルス液を等量加えて37℃で1時間感作後、PTV-1はCPK細胞を、PEV-BについてはHmLu-1細胞を各ウェルに0.1mlずつ加え、5%炭酸ガス存在下で37℃7日間培養してCPEの出現を観察した。CPEを抑制した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とし、中和抗体価4倍以上を陽性とした。

成 績

病理学的検査: 剖検では、豚1及び豚2で肺の退色・脆弱化や肝変化、空腸近位部の軽度充出血・ひ薄化及び肺門リンパ節の軽度腫大がみられ、豚3では肺の肝変化

のみが認められた。組織学的検査では、豚1、豚2の2頭で非化膿性脳脊髄炎及び肉芽腫性肺炎、豚3で非化膿性脳炎がみられ、3頭に共通して、非化膿性間質性腎炎、体表及び腸間膜リンパ節の肉芽腫性炎、リンパ節における著しいリンパ球の枯渇及びサーコウイルス性封入体形成が認められた。また、IHCでは、3頭に共通して、扁桃、リンパ節、肺及び腎からPCV2抗原が検出され、脳及び脊髄からは検出されなかった。

細菌学的検査: 有意菌は分離されなかった。

ウイルス学的検査: ウイルス遺伝子検出成績及びウイルス分離成績を表2に示した。豚1、豚2の2頭の脳及び直腸内容をCPK細胞に接種後、継代2代目で円形集族化を特徴とするCPEが観察され、3株のウイルスが分離された。このウイルス培養上清と接種乳剤よりPTV特異遺伝子が検出された。PTV血清型を遺伝学的に検討するために、分離ウイルスのVP1及びVP2領域遺伝

表3 中和抗体価の分布

ウイルス	用途	日齢/ 産歴	調査 頭数	陽性 頭数	陽性率 (%)	中和抗体価									幾何 平均	
						<2	2	4	8	16	32	64	128	256		
PTV-1	肥育	~60	61	32	52.5	15	14	6	11	8	4	3			4.3	
		~100	71	38	53.5	17	16	15	11	8	1	1	2		3.8	
		~120	119	104	87.4	7	8	19	28	24	11	11	3	8	12.4	
		~180	66	52	78.8	8	6	13	12	10	7	7	1	2	8.9	
		計	317	226	71.3	47	44	53	62	50	23	22	6	10	7.2	
	繁殖	未経産	4	4	100.0					2	1		1		32.0	
		1産	6	6	100.0					3	3				22.6	
		2産	12	10	83.3	2		1	1	2	2	2		2	19.0	
		3産	13	12	92.3	1		1	1	3	3	2	1	1	23.2	
		4産	14	14	100.0				1	1	3	3	5	1	60.9	
		5産	9	9	100.0				2		2	3	2		40.3	
		6産	3	3	100.0				1	1			1		20.2	
		7産	7	7	100.0					2	2	1		2	52.5	
		8産	2	2	100.0				1			1			16.0	
		9産	1	1	100.0							1			32.0	
		不明	20	19	95.0		1		2	6	6	2	3		26.0	
		計	91	87	95.6	3	1	2	9	20	24	14	12	6	30.3	
		合計	408	313	76.7	50	45	55	71	70	47	36	18	16	10.0	
		PEV-B	肥育	~60	19	19	100.0						6	6	3	4
	~100			29	29	100.0				1	6	1	8	6	7	70.4
~120	49			49	100.0						4	9	7	29	151.7	
~180	18			18	100.0								5	13	211.2	
計	115			115	100.0				1	6	11	23	21	53	117.6	
繁殖	未経産		4	4	100.0				1			1	1	1	64.0	
	1産		6	6	100.0								2	4	203.2	
	2産		12	12	100.0							3	2	7	161.3	
	3産		13	13	100.0							1	3	9	196.1	
	4産		14	14	100.0						1	2	7	4	128.0	
	5産		7	7	100.0								1	6	231.9	
	6産		3	3	100.0							2		1	101.6	
	7産		7	7	100.0						1	1	3	2	115.9	
	8産		2	2	100.0								1	1	181.0	
	9産		1	1	100.0									1	256.0	
不明	20	20	100.0							5	6	9	147.0			
計	89	89	100.0				1		2	15	26	45	151.9			
合計	204	204	100.0	0	0	0	2	6	13	38	47	98	131.5			

子の塩基配列を決定した。分離株3株における塩基（アミノ酸）配列一致率はVP1領域で99.7～100%（99.2～100%）、VP2領域で100%（100%）を示し、互いにごく近縁であった。分子系統樹解析では、VP1とVP2のどちらの領域においても分離株3株は既報のPTV-1株と同じ系統に属した（図1）。さらに、分離株は他血清型PTV株に対してVP1領域で64.1～84.7%、VP2領域で63.2～86.8%のアミノ酸配列一致率を示したが、既報のPTV-1株に対してはVP1領域で85.5～91.6%、VP2領域で83.0～91.5%とより高い一致率を示した。以上のことから、CPK細胞により分離されたウイルスは遺伝学的にPTV-1に相当するものと考えられた。

また、直腸内容を接種したHmLu-1細胞継代2代目で円形集族化を特徴とするCPEが観察され、1株のウイルスが分離された。ウイルス培養上清と接種乳剤よりPEV-B特異遺伝子が検出された。

PCV2a及びPCV2b遺伝子を標的としたPCRでは、3頭の脳及び直腸内容がPCV2b陽性を示した。

なお、豚コレラウイルス抗原検索及びオーエスキー病ウイルス抗体検査は、ともに陰性であった。

血清学的調査：個体の抗体陽性率は、PTV-1 76.7%（313/408）、PEV-B 100%（204/204）で、農場陽性率は、PTV-1 95.9%（47/49）、PEV-B 100%（34/34）であった。PTV-1抗体陰性豚の95.8%

は肥育豚で、抗体価の幾何平均値も、繁殖豚（91頭）30.3に対し肥育豚（317頭）は7.2と低かった。また、PEV-Bの抗体価はPTV-1に比べ、全体的に高く、幾何平均値は肥育豚（115頭）117.6、繁殖豚（89頭）151.9であった（表3）。

考 察

本病の診断は、国際獣疫事務局（OIE）の診断マニュアル [4] に基づいて行われており、わが国の病性鑑定指針もこれに準じている。すなわち、①臨床的に神経症状が認められること、②中枢神経組織に非化膿性炎が認められること、③中枢神経病変部からPTVが分離されること、この三条件の充足を診断基準としている。今回、神経症状を呈し脳脊髄炎を認めた脳病変部からPTV-1が分離された2頭を豚エンテロウイルス性脳脊髄炎（豚テシオウイルス性脳脊髄炎）と診断した。ウイルスが分離され確定診断にいたった事例は、国内初発例である2002年の富山県 [11]、2008年の千葉県（未発表）に次ぐ国内3例目となる。

今回、本症例で分離されたPTV-1株を用いて血清学的調査を行った結果、佐賀県内養豚場に広くPTV-1株が浸潤していることが示唆された。しかし、繁殖母豚と肥育豚で抗体陽性率と抗体価に差が認められたことから、PTV-1の疫学を理解するために、今後より詳細な調査を行う必要があると考えられた。

本症例ではPTV-1による非化膿性脳炎に加えて、非化膿性間質性腎炎、体表及び腸間膜リンパ節の肉芽腫性炎、リンパ節におけるリンパ球の枯渇及びサーコウイルス性封入体形成などのPCV2感染の病理組織所見が解剖した3頭に共通して認められ、脳及び直腸内容からPCV2b遺伝子が検出された。PCV2感染等による免疫抑制状態はPTVの脳への感染、病変形成を促進する可能性が報告されている [12]。本症例においても、先行感染したPCV2によってリンパ球の枯渇が引き起こされ、その免疫抑制状態がPTV-1による神経症状の発症要因となったと推察された。しかし、先行感染があったと考えられる発育不良豚6頭のうちの2頭が発症したものの、他の4頭及び農場全体への発症拡大は認められなかったことから、PTV-1が農場に広く浸潤しており、ほとんどの豚が発症防御レベルの抗体を保有していること、そして今回分離されたPTV-1の病原性が比較的低いことが示唆された。今回のように、PCV2等の複合感染等によって病原性の低いPTV-1株であっても強い病原性が引き起こされる可能性も危惧されることから、本症の発生防除法の確立にむけて、国内におけるPTV-1の浸潤状況調査等によりPTV-1の疫学を解明するとともに、本症の病理発生機序も明らかにする必要があると考えられた。

また、今回、神経症状を示した豚を含めた直腸内容ボール材料を接種したHmLu-1細胞よりPEV-Bが分離され、血清学的調査により分離PEV-B株が佐賀県内に広く浸潤していることが示唆された。PEV-Bの病原性については、豚に皮膚病変を形成する可能性は指摘されているものの、脳炎への関与は不明で、その詳細は明らかにされていない [5]。本症例では脳からPEV-Bは分離されておらず、脳炎への関与や豚への病原性は明らかにすることはできなかった。今後、PEV-Bの疫学を解明するとともに、脳炎への関与や豚への病原性についても明らかにする必要があると考えられた。

引用文献

- [1] Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R: Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: Molecular and evolutionary aspects, *J Virol*, 75, 1620-1631 (2001)
- [2] Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R: Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups, *J Virol*, 76, 5813-5821 (2002)
- [3] Tseng CH, Tsai HJ: Sequencing analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus, *Virus Res*, 129, 104-114 (2007)
- [4] Knowles NJ: Teschovirus encephalomyelitis (previously enterovirus encephalomyelitis or Teschen/Talfan disease), *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 6th ed, 1146-1152, Office International des Epizooties, Paris (2008)
- [5] Knowles NJ: Porcine enteric picornaviruses, *Disease of Swine*. Straw BE, et al eds, 9th ed, 337-345, Blackwell Publishing, Iowa (2006)
- [6] 加来義浩: 豚エンテロウイルス性脳脊髄炎をめぐる近年の状況について, *日本豚病研究会報*, 43, 4-6 (2003)
- [7] Zell R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Honey E, Dauber M, Prager D, Wurm R: Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III with specific primer sets, *J Virol Methods*, 88, 205-218 (2000)
- [8] La Rosa G, Muscillo M, Di Grazia A, Fontana S, Iaconelli M, Tollis M: Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses, *J Vet Med Sci*, 53, 257-265 (2006)
- [9] Kaku Y, Murakami Y, Sarai A, Wang Y, Ohashi S, Sakamoto K: Antigenic properties of porcine teschovirus 1 (PTV-1) Talfan strain and molecular strategy for serotyping of PTVs, *Arch Virol*, 152, 929-940 (2007)
- [10] Lyoo KS, Kim HB, Joo HS: Evaluation of a nested

- polymerase chain reaction assay to differentiate between two genotypes of porcine circovirus 2, *J Vet Diagn Invest*, 20, 283-288 (2008)
- [11] Yamada M, Kozakura R, Ikegami R, Nakamura K, Kaku Y, Yoshii M, Haritani M : Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus, *Vet Rec*, 155, 304-306 (2004)
- [12] Takahashi M, Seimiya YM, Seki Y, Yamada M : A piglet with concurrent polioencephalomyelitis due to porcine teschovirus and postweaning multi-systemic wasting syndrome, *J Vet Med Sci*, 70, 497-500 (2008)

Teschovirus Encephalomyelitis in Pigs and Serological Survey of Porcine
Teschovirus and Porcine Enterovirus B in Saga Prefecture

Daisuke NISHI ^{*†}, Hiroyuki YAMAGUCHI, Ayako MIYAZAKI and Hiroshi TSUNEMITSU

** Chubu Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of Saga, 2-7-4 Wakakusu, Saga, 849-0928, Japan*

SUMMARY

Growth retardation and wasting were observed in 6 of 42 pigs at approximately 40 days of age in a herd with 60 sows. Of these, two pigs developed severe neurological signs and became recumbent four days after the onset. The two pigs with neurological signs and one with wasting were examined to diagnose the disease. On pathological examination, nonsuppurative encephalomyelitis was observed in all three pigs examined, and the histological features and viral antigen of porcine circovirus type 2 (PCV2) were detected in the tonsils, subcutaneous lymph nodes, and mesenteric lymph nodes of all three pigs examined. On microbiological examination, porcine teschovirus (PTV) was isolated from the cerebrum of the two pigs with neurological signs, and porcine enterovirus B (PEV-B) was isolated from the pooled rectum content of the three pigs. The final diagnosis was Teschovirus encephalomyelitis (previously known as enterovirus encephalomyelitis or Teschen/Talfan disease) associated with PCV2 infection, based on the neurological signs, histological features, and virological evidence. In addition, a serological survey by virus neutralization test in 408 porcine sera sampled randomly from 49 farms in Saga prefecture showed that both PTV-1 and PEV-B isolates were highly prevalent among the pig populations in Saga prefecture. — Key words : porcine circovirus type 2, porcine enterovirus, porcine teschovirus, Teschovirus encephalomyelitis (enterovirus encephalomyelitis).

[†] *Correspondence to : Daisuke NISHI (Chubu Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of Saga)*
2-7-4 Wakakusu, Saga, 849-0928, Japan

TEL 0952-31-2211 FAX 0952-34-1046 E-mail : nishi-daisuke@pref.saga.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 31 ~ 36 (2012)