

先天性豚痘の病理学的及びウイルス学的解析

是枝輝紀¹⁾ 藤岡 舞¹⁾ 石黒典子²⁾ 内村江利子¹⁾ 宮里俊光¹⁾
 梁瀬 徹³⁾ 田中省吾³⁾ 猪島康雄^{4)†}

- 1) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒899-2201 日置市東市来町湯田1678)
 2) 鹿児島県始良家畜保健衛生所 (〒899-5241 始良市加治木町木田1641-1)
 3) ㈱農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所九州支所 (〒891-0105 鹿児島市中山町2702)
 4) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

(2013年3月5日受付・2013年5月14日受理)

要 約

鹿児島県内の大型一貫経営農場において、全身の皮膚に丘疹や膿疱を呈した新生豚6頭が出生し、そのうち5頭について病理学的及びウイルス学的に解析した。皮膚病巣が大型で多発していた個体は、舌にび爛も観察された。病変部の皮膚及び舌では、有棘細胞の風船様膨化を伴った増生がみられ、核の空胞化や好酸性細胞質内封入体も認められた。免疫組織化学的に封入体に一致して豚痘ウイルス抗原が検出され、電子顕微鏡下でポックスウイルス粒子が認められた。病変部の皮膚切片から抽出したDNAを用いたPCRにより、2頭から塩基配列が同一の豚痘ウイルス遺伝子が検出され、海外で検出されたウイルスと遺伝学的に近縁であった。以上から、本症例を豚痘ウイルス感染によるきわめてまれな先天性豚痘と診断した。豚痘ウイルスを分子遺伝学的に比較解析した国内初の報告である。

——キーワード：先天性豚痘，新生豚，丘疹，豚痘ウイルス。

----- 日獣会誌 66, 468～473 (2013)

豚痘は、豚の皮膚の発痘を特徴とする急性ウイルス性疾病で、豚にのみ感受性を示すポックスウイルス科シポックスウイルス属の豚痘ウイルスが原因とされている [1]。本病は、接触感染やブタジラミなどの昆虫による機械的伝播により感染し、発痘は全身の皮膚にみられ、なかでも下腹部、内股部、腋窩部に好発する。発痘は、紅斑に始まり、丘疹、水疱、膿疱と経過し、痂皮を形成した後に落痂する。そのため、通常1カ月程度で皮膚病巣は回復し、混合感染がなければ致死率はきわめて低いとされている [1]。

わが国では、豚痘は散発的に発生しているにも関わらず、詳細に解析した報告は少ない [2-6]。その理由として、致死率が高くないことからあまり重要視されていないことや、特徴的な症状から肉眼的に診断し、検査室内での確定診断に至らない症例が多いためと思われる。今回、新生豚の全身の皮膚に発痘を認めた、きわめてまれな先天性豚痘に遭遇した。多数の新生豚が死亡し、経済的損失が大きいため、従来のように放置することはでき

ない。そこで、病理学的に詳細に解析するとともに、国内で初めて豚痘ウイルスを分子遺伝学的にも比較解析した。

材料及び方法

2011年6月、鹿児島県内で母豚2,000頭以上を飼養する大型一貫経営農場において、デュロック種の母豚から産まれた新生豚12頭のうち6頭の全身の皮膚に発痘が認められた。発痘がみられた5頭について病理学的及びウイルス学的に解析した。発痘がみられた6頭のうち1頭は死産で、2頭は娩出後6時間以内に死亡した。なお、母豚は2産目で、著変は認められなかった。他の同腹産子6頭に外見上の著変は認められなかったが、うち2頭は死産であった。

当該農場は、飼養衛生管理基準を適正に遵守した、衛生状態の良好な農場で、繁殖豚に豚オーエスキュー病生ワクチン、日本脳炎生または不活化ワクチン、豚丹毒生ワクチン、豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン、豚サーコ

† 連絡責任者：猪島康雄 (岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科食品・環境衛生学研究室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎058-293-2863 FAX 058-293-2840 E-mail: inoshima@gifu-u.ac.jp

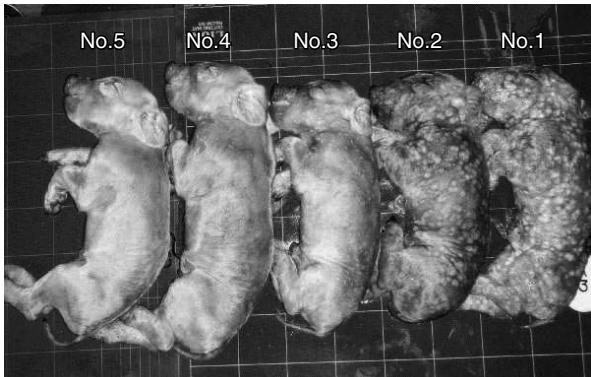


図1 全身に発痘のみられた新生豚5頭
特に2頭（豚No. 1, 2）では大型の発痘病巣が多発している。

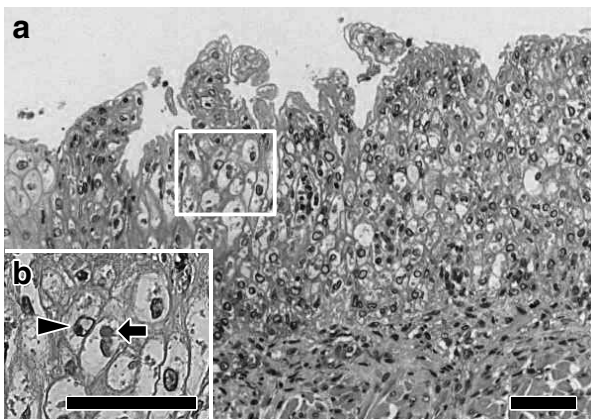


図2 皮膚（豚No. 1）のHE染色
a：有棘細胞の風船様膨化と増生がみられる
b：有棘細胞では核の空胞化（矢頭），好酸性細胞質内封入体（矢印）が観察される（Bar = 50μm）

ウイルス2型不活化ワクチンを接種していた。

病理学的検査：病理解剖及び病理組織学的検査として、死産胎子を除く、発痘のみられた新生豚5頭（No. 1～5）について、病理解剖学的検査を行い、皮膚や舌を含む主要臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して鏡検した。

免疫組織化学的検査として、病変形成の著しい1頭（No. 1）の皮膚及び舌のパラフィン包埋切片を用い、免疫組織化学的染色を実施した。一次抗体には、抗豚痘ウイルスsp22モノクローナル抗体（岡山大学山田雅夫教授より分与）[7]を用い、以後の操作は市販キット（ヒストファインシンプルステインMAX-PO（MULTI），ニチレイ株式会社，東京）の手順に従った。

電子顕微鏡検索として、ホルマリン固定後の1頭（No. 1）の皮膚と舌を4%オスミウム酸で後固定し、2%酢酸ウラニルでブロック染色を実施後、低粘度樹脂エポソ651（Quetol 651セット，日新EM株式会社，東京）に

表 新生豚5頭の解剖及び病理組織所見

		症 例				
		No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
解剖所見						
皮膚	丘疹	++	++	++	+	+
	膿疱	+++	+++	-	-	-
	痂皮	+	+	-	-	-
舌	び爛	++	++	-	-	-
病理組織所見						
皮膚	有棘細胞の風船様膨化・増生	+++	+++	++	+	+
	有棘細胞の核の空胞化	++	++	++	+	+
	有棘細胞の細胞質内封入体	++	++	++	+	+
	表皮・真皮の変性・壊死	++	++	-	-	-
	表皮・真皮の細胞浸潤	+	+	+	+	+
	有棘細胞の風船様膨化・増生	+++	+++	-	-	-
舌	有棘細胞の核の空胞化	++	++	-	-	-
	有棘細胞の細胞質内封入体	++	++	-	-	-
	上皮・固有層・筋層の変性・壊死	++	++	-	-	-
	上皮・固有層・筋層の細胞浸潤	+	+	-	-	-
	有棘細胞の風船様膨化・増生	+++	+++	-	-	-

+++：多発/重度， ++：やや多発/中等度，
+：散在/軽度， -：病変なし

包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラン及びクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡（JEM-1010型，日本電子株式会社，東京）で観察した。

ウイルス学的検査：ウイルス分離検査として、発痘のみられた新生豚5頭（No. 1～5）の皮膚及び舌を抗生物質添加粉末組織培地（Eagle's MEM，日本水産薬株式会社，東京）で10%乳剤とし、3,000rpm，10分間遠心後の上清をウイルス分離材料とした。材料は，CPK，MARC-145，Vero，PK-15の各細胞に接種し，37℃，5%炭酸ガス下で静置培養を行った。

遺伝学的検査として、新生豚4頭（No. 1～4）の皮膚のパラフィン包埋ブロックから市販キット（QIAamp DNA FFPE Tissue Kit，Qiagen株式会社，東京）にてDNAを抽出し、市販のPCRキット（Taq PCR Core Kit，Qiagen株式会社，東京）を用い、PCRを実施した。プライマーSPV1（5'-ATAGCATCGTTTTTGTGTAATCTT）及びSPV2（5'-CGTATTAAACTAACGAACGCATG）は豚痘ウイルスKasza株のエンベロープ蛋白をコードするp42遺伝子の塩基配列（GenBank Accession No. AJ249689）[8]をもとにデザインした。条件は94℃3分で前熱変性を行った後、熱変性94℃30秒，アニーリ

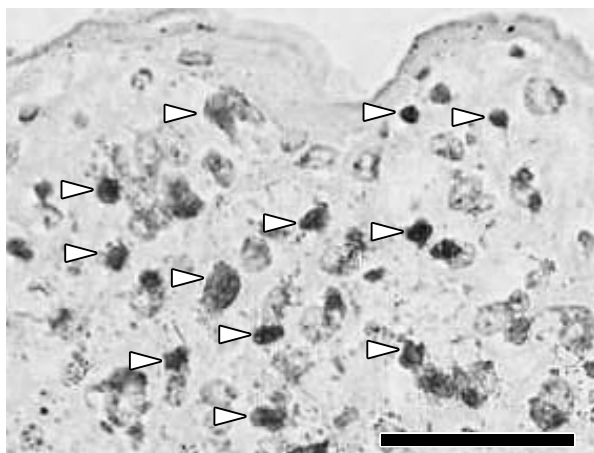


図3 皮膚(豚No. 1)の免疫組織化学的染色
細胞質内封入体に一致して、豚痘ウイルス抗原(矢頭)がみられる(Bar = 50 μ m)

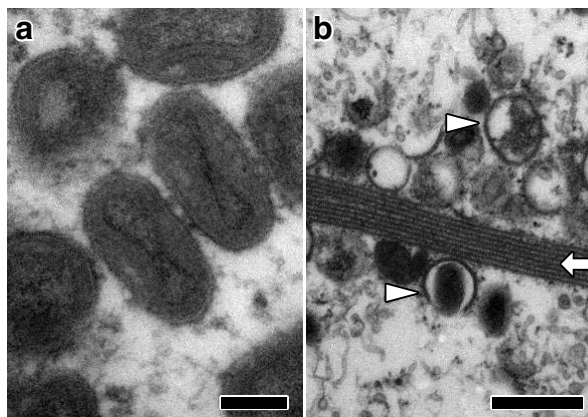


図4 皮膚(豚No. 1)の透過型電子顕微鏡像
a: 約250~300nm \times 150~200nmのレンガ状の成熟ウイルス粒子(Bar = 100nm)がみられる。
b: 一層の表層膜を有した未熟ウイルス粒子(矢頭)やラメラ構造(矢印)がみられる(Bar = 500nm 酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色)

Kagoshima11	1:	RTSEHGRIIMNMLKDAALTGKVTILVDYQSGHRDEEELKANNIDYIKVKIGKTDEPGVLLGSFWISDYT	70
Osaka06	1:	-----	67
Miyazaki12	1:	-----	63
Kasza	1:	-----	70
17077-99	1:	-----	70
Kagoshima11	71:	SCYIGNASLTGGSISNIKTLGIYSTYKPLATDLQRRFDTFRSFGNHSILNTLYMACCLPVSTQYHINNPI	140
Osaka06	69:	-----	137
Miyazaki12	64:	-----	133
Kasza	71:	-----K-----	140
17077-99	71:	-----K-----	140
Kagoshima11	141:	GGVFLSDSPDKLLGYSRTLDADVLSKLNKATKSIDLELLSLVPIIREDNKTTYWPNIYNAIICASINRG	210
Osaka06	139:	-----	207
Miyazaki12	134:	-----	203
Kasza	141:	-----	210
17077-99	141:	-----	210
Kagoshima11	211:	VKVRLLIGSWNKNDTYVMSVKSLSQIMCSNNDFSVKIFHDKNNTKLMIDGFEAHITPANFDGTHYLH	278
Osaka06	209:	-----	257
Miyazaki12	204:	-----	263
Kasza	211:	-----F-----	278
17077-99	211:	-----F-----	278

図5 豚痘ウイルスのアミノ酸配列の比較

Kagoshima 11株と、国内の異なる2地域で検出した豚痘ウイルス、及びデータベースに登録されている豚痘ウイルス Kasza株(AJ249689)と17077-99株(AF410153)との比較

ング50 $^{\circ}$ C 30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C 30秒を35サイクル実施した後、後伸長反応を72 $^{\circ}$ C 10分間実施した。得られたPCR産物は、1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、バンドを確認するとともに、市販の高純度核酸精製キット(High Pure PCR Cleanup Micro Kit, ロシユ・ダイアグノスティックス(株), 東京)で精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、BLAST検索にて相同性解析を行った。

細菌学的検査: 新生豚5頭(No. 1~5)の脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節を細

菌分離材料とした。これらについて、5%綿羊血液加トリプトソイ培地とDHL寒天培地を用いた好気培養、チヨコレート寒天培地を用いた5%炭酸ガス培養、5%綿羊血液加GAM寒天培地を用いた嫌気培養を実施した。

成 績

病理学的検査: 病理解剖では、新生豚2頭(No. 1, 2)に直径5~15mmと大型で、不整円形、白~淡赤色を呈した丘疹や膿疱が全身の皮膚に多発し、中心部が陥没し痂皮を形成したものもみられた(図1, 表)。この2頭の

舌には複数のび爛が認められた。他の3頭 (No. 3~5) では、直径2~5mmと小型で、不整円形、白~淡桃色の丘疹が、全身の皮膚に散在、あるいはやや多発していた。その他の臓器に著変は認められなかった。

病理組織所見では、すべての検体で、皮膚に有棘細胞の風船様膨化及び増生による有棘層の著しい肥厚が認められ、有棘細胞の核の空胞化や好酸性の細胞質内封入体が多数認められた (表, 図2)。一部の皮膚では層状の変性・壊死や痂皮形成がみられ、真皮ではマクロファージや線維芽細胞が増生し、皮下組織では水腫性の粗鬆化が認められた。また、毛包上皮細胞でも風船様膨化が観察された。2頭 (No. 1, 2) の舌でも皮膚と同様の病変が観察され、さらに舌筋の変性、筋間質にマクロファージの浸潤及び線維芽細胞の増生が認められた (表)。1頭 (No. 1) の肺の一部に異物を含んだ小型巣状壊死が認められた。その他の臓器に著変は認められなかった。

免疫組織化学的検査では、発痘が認められた皮膚及び舌の有棘細胞の細胞質内封入体に一致して、塊状や顆粒状に多数の豚痘ウイルス抗原が認められた (図3)。また、皮膚の真皮及び皮下組織に浸潤したマクロファージ及び毛包上皮細胞においても陽性反応が認められた。

透過型電子顕微鏡検査では、細胞質内封入体が認められた皮膚及び舌の有棘細胞の細胞質内にボックスウイルス特有の構造を有する約250~300nm×150~200nmのレンガ状の成熟ウイルス粒子や一層の表層膜を有した未熟なウイルス粒子及びラメラ構造が観察された (図4)。

ウイルス学的検査: ウイルス分離検査では、それぞれの細胞で2代盲継代したがCPEは認められず、ウイルスは分離されなかった。

遺伝学的検査では、PCRにより2頭 (No. 3, 4) の検体から、豚痘ウイルスに特異的な880bpのPCR産物が得られた。シークエンスにより、プライマー結合部位を除く834bpの塩基配列は2検体で完全に一致したため、検出した豚痘ウイルスをKagoshima 11株とした (Accession No. AB793292)。BLAST検索によりアメリカで分離された豚痘ウイルスKasza株 (AJ249689) と塩基配列で98.6% (822/834塩基)、アミノ酸配列で99.3% (276/278アミノ酸残基) の一致率を有していた (図5)。また、今回のプライマーを用いたPCRによる診断の有用性を、国内の異なる2地域で発生した豚痘の病変部サンプルを用いて検証した。いずれのサンプルからもPCRにより、豚痘ウイルス遺伝子を検出し、これらの塩基配列を比較すると、Kagoshima 11株と一致していた (図5)。

細菌学的検査: いずれの臓器でも有意菌は分離されなかった。

考 察

本症例は、出生時に全身の皮膚に発痘を呈していたこと、病理学的及びウイルス学的解析の結果から、胎子期に豚痘ウイルスに感染、発症して、出生した先天性豚痘と診断した。本症例で認められた皮膚における有棘細胞の風船様膨化及び増生、核の空胞化、好酸性細胞質内封入体などの病理組織学的特徴は、海外の先天性豚痘症例 [9-12] や子豚で発生した豚痘の症例 [2-6]、豚痘ウイルスの子豚実験感染例 [13] と類似していた。オルソポックスウイルス属のワクシニアウイルスも豚痘様疾患を引き起こすとされている [14] が、本症例では、豚痘ウイルスによる病変の特徴所見とされる有棘細胞の核の空胞化、及び透過型電子顕微鏡下で観察されるラメラ構造のいずれも確認された [3-6, 12, 13]。また今回、免疫組織化学的染色に使用した抗豚痘ウイルスsp22モノクローナル抗体は、豚痘ウイルス以外のボックスウイルスと交差反応を示さないこと [7]、及び皮膚のパラフィン包埋切片から豚痘ウイルス遺伝子が検出されたことから、皮膚病巣の原因は豚痘ウイルスであると証明された。

先天性豚痘の発生事例の報告はきわめて少ないが、その特徴として、1) 同腹産子の一部の個体が発症し、高い致死率を示す一方、母豚には臨床的な異常はみられない。2) 新生豚の全身に発痘がみられるが、四肢末端部や舌に膿疱やび爛を形成することが多いとされている [9-12]。本事例では同腹産子12頭中6頭に全身性の発痘がみられ、6頭のうち3頭が死産、あるいは死亡し、母豚には外見上異常は観察されなかった。また、死亡した2頭は皮膚病巣以外に舌のび爛が認められ、既知の特徴と一致していた。Thibaultら [12] は、先天性豚痘は母豚で低レベルのウイルス血症が起こった後に、胎子に経胎盤感染して発症し、胎膜の区画化により、同腹産子で発痘の有無や病変の程度に差が生じると推測している。実際、他の先天性豚痘の胎盤において、免疫組織化学的染色で豚痘ウイルス抗原が検出されている (木原, 平成18年度家畜衛生研修会病性鑑定ウイルス部門事例報告)。また、Patonら [11] は、他のウイルス感染などにより、子宮内が傷害されているときに、経胎盤感染が起こりやすくなるのではないかと推察している。本症例も発生状況などから豚痘ウイルスの経胎盤感染が考えられるが、母豚や同一豚舎内の繁殖豚にブタジラミの寄生は認められず、母豚への感染時期や感染経路については不明であった。

これまで豚痘の確定診断には、皮膚病巣を材料とした病理組織学的検査やウイルス分離検査、電子顕微鏡検査等が実施され、長い時間を要している [3-6]。遺伝子解析の結果、PCRのターゲットとした領域は、海外の豚

痘ウイルスの塩基配列と相同性が高く、国内の豚痘ウイルスでは塩基配列が一致していたことから、豚痘ウイルスでよく保存されており、PCRのターゲットとして適した領域であることが示唆された。また、今回用いたプライマーは、従来の確定診断方法と比べて、豚痘の迅速かつ容易なPCRによる遺伝子診断に有用であると思われる。

先天性豚痘については、感染経路を含めいまだ不明な点が多く残されている。今後も病態解明のため、さらなる解析が必要と思われる。

免疫組織化学的染色にご協力いただいた(株)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所九州支所の木村久美子主任研究員、遺伝子解析にご協力いただいた大阪府家畜保健衛生所、宮崎県宮崎家畜保健衛生所の皆様に深謝する。また、本研究の一部は科学研究費補助金の支援を受けた。

引用文献

- [1] 森田千春：豚痘，豚病学，柏崎 守，久保正法，小久江栄一，清水実嗣，出口栄三郎，古谷 修，山本孝史編，第4版，213-214，近代出版，東京（1999）
- [2] 五藤精知，中松正雄，森田迪夫：豚に認められた痘瘡の自然発生例について，日本獣医学雑誌，28，89-92（1966）
- [3] Goto M, Nakamatsu M, Morita M, Fukui T : An outbreak of swine pox-like disease in Tottori Prefecture, Japan, *Jpn J Vet Sci*, 30, 61-71 (1968)
- [4] 界外 昇，山中進吾，山川 晃，佐藤佳久，杉山 明，庄山重好，播谷 亮，杉山公宏，磯田政恵：豚痘の集団発生について，日獣会誌，34，262-267（1981）
- [5] 大内紀章，藤原三男，秦野好博，矢尾正博，宇野文夫，吉田まり子，山田雅夫，新居志郎：岡山県下の一地区における豚痘の集団発生，日獣会誌，41，870-874（1988）
- [6] 杉山公宏，一瀬賢夫，石原 実，佐藤洋三郎，吉田成夫，吉田 勲，藤原 弘：豚痘の集団発生例について—臨床形態学および原因学的検査成績—，日獣会誌，22，209-214（1969）
- [7] Ouchi M, Fujiwara M, Hatano Y, Yamada M, Nii S : Analysis of swinepox virus antigens using monoclonal antibodies, *J Vet Med Sci*, 54, 731-737 (1992)
- [8] Bárcena J, Lorenzo MM, Sánchez-Puig JM, Blasco R : Sequence and analysis of a swinepox virus homologue of the vaccinia virus major envelope protein P37 (F13L), *J Gen Virol*, 81, 1073-1085 (2000)
- [9] Borst GHA, Kimman TG, Gielkens ALJ, van der Kamp JS : Four sporadic cases of congenital swinepox, *Vet Rec*, 127, 61-63 (1990)
- [10] Neufeld JL : Spontaneous pustular dermatitis in a newborn piglet associated with a poxvirus, *Can Vet J*, 22, 156-158 (1981)
- [11] Paton DJ, Brown IH, Fitton J, Wrathall AE : Congenital pig pox : A case report, *Vet Rec*, 127, 204 (1990)
- [12] Thibault S, Drolet R, Alain R : Congenital swine pox : A sporadic skin disorder in nursing piglets, *Swine Health Prod*, 6, 276-278 (1998)
- [13] Cheville NF : The cytopathology of swine pox in the skin of swine, *Am J Pathol*, 49, 339-352 (1966)
- [14] 吉田 勲：豚の衛生（12）豚痘，日獣会誌，24，31-33（1971）

A Pathological and Virological Analysis of Congenital Swinepox

Terunori KOREEDA¹⁾, Mai FUJIOKA¹⁾, Noriko ISHIGURO²⁾, Eriko UCHIMURA¹⁾,
Shunkou MIYAZATO¹⁾, Tohru YANASE³⁾, Shogo TANAKA³⁾
and Yasuo INOSHIMA^{4)†}

- 1) *Kagoshima Prefectural Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichikicho, Hioki, 899-2201, Japan*
- 2) *Kagoshima Prefectural Aira Livestock Hygiene Service Center, 1641-1 Kida, Kajikicho, Aira, 899-5241, Japan*
- 3) *Kyushu Research Station, National Institute of Animal Health, 2702 Chuzan, Kagoshima, 891-0105, Japan*
- 4) *Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*

SUMMARY

Six piglets with cutaneous lesions were born on a farm in Kagoshima Prefecture, Japan. The lesions manifested as papules and pustules over the entire body of each piglet. A pathological and virological analysis was performed on 5 of the affected piglets. Piglets with large multiple cutaneous lesions also showed tongue erosions. We observed hyperplasia, ballooning degeneration, eosinophilic cytoplasmic inclusions, and intranuclear vacuoles in the prickle cells of the skin and tongues of the piglets. Upon performing immunohistochemistry and electron microscopy, swinepox virus antigens and poxvirus particles were detected, respectively, in the lesions. Moreover, a polymerase chain reaction helped detect an identical sequence in the gene encoding the swinepox virus envelope protein in 2 piglets; this sequence was closely related genetically to that observed in viruses previously isolated from the United States. Based on these results, the disease was concluded to be congenital swinepox. To the best of our knowledge, this is the first report on a genetic comparison of swinepox virus in Japan. — Key words : congenital swinepox, newborn piglets, papules, swinepox virus.

† Correspondence to : Yasuo INOSHIMA (*Laboratory of Food and Environmental Hygiene, Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University*)
1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan
TEL 058-293-2863 FAX 058-293-2840 E-mail : inoshima@gifu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 468 ~ 473 (2013)