

2015年に日本の健康豚から検出された 豚サーコウイルス2の遺伝子型

小池郁子^{1),2)†} 村田 知²⁾ 大井宗孝²⁾ 村上 賢¹⁾

1) 麻布大学獣医学部 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71)

2) エス・エム・シー(株) (〒243-0215 厚木市上古沢1816)

(2016年10月23日受付・2017年6月16日受理)

要 約

2015年に、国内21農場の健康豚530頭から採取した血清を各農場の日齢ごとに混和して163検体とし、PCRにより豚サーコウイルス2(PCV2)の検出を行った。その結果、7農場由来10検体がPCV2陽性となった。PCV2産物を用いたORF2領域(702または705bp)の塩基配列解析により7種類の株が確認され、4株は遺伝子型PCV2a(神奈川県3農場由来、広島県1農場由来)に、3株は遺伝子型PCV2d(青森県1農場由来、千葉県2農場由来)に型別された。また、PCV2dの3株は2008年に国内で検出された株とは異なり、2012年に北米で検出された増殖能力が高いとされるmPCV2株と同じクラスターに属した。国内において優勢なPCV2は時とともに変化している可能性が考えられた。——キーワード：遺伝子型別、豚、豚サーコウイルス2。

-----日獣会誌 70, 650~654 (2017)

豚サーコウイルス(porcine circovirus: PCV)は、サーコウイルス科サーコウイルス属に属するエンベロープを持たない小型ウイルスであり、約1.77kbの環状一本鎖DNAをゲノムとする。PCVは、PCV1とPCV2に区別され[1]、PCV1は一般的に非病原性であるが、PCV2の感染は、離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)や流死産、豚皮膚炎腎症症候群(PDNS)、肥育豚の呼吸器病などさまざまな症状を引き起こし、これらは豚サーコウイルス関連疾病(PCVAD)と総称される[2, 6]。PCVADの発生は、1990年代後半より世界中の養豚産業に深刻な経済的被害を与えている[2]。日本国内では、1980年代後半より血清中PCV2抗体陽性の豚が確認されており、1996年にはPMWSの豚が初めて報告された[3]。

PCV2のゲノムには複数のORF(open reading frame)が存在しており、ORF1(945bp)には複製に関わる2つのタンパク質が[4]、ORF2(702または705bp)にはカプシドタンパク質がコードされている[5]。PCV2の遺伝子型についてはいまだ議論があるが、ORF2の分子系統解析により塩基配列間の距離 $p < 0.035$ を同一の遺伝子型として、現在までにPCV2a、PCV2b、

PCV2c、PCV2d及びPCV2eの遺伝子型が報告されている[6-8]。

1990年代にPCVADの豚より検出されたPCV2の遺伝子型はPCV2aがほとんどであったが、世界的には2005年頃より、日本国内では2008年頃から、PCV2bが出現し優勢となった。流行株がPCV2aからPCV2bに置き換わるのにあわせてPCVADの発生被害が深刻になっていった[9]。2008年後半にPCV2ワクチン接種が開始されたことで、それ以降ワクチン接種した農場でPCV2ウイルスの検出率は減少し、PCVADの発生はPCV2ワクチン未接種農場や接種を中止した農場に限られるようになった。

2012年に、北米ではPCV2ワクチン接種農場でPCVAD発生が問題となった。その時検出された株は、それまでアジアでのみ確認されていた遺伝子型であったPCV2dに属しており、ORF2のストップコドンの前にCTTの挿入により、702bpが705bpとなったmPCV2と呼ばれるウイルスであった[10]。感染実験では遺伝子型による病原性の強さに違いは確認されていないが[11]、北米で検出されたこのmPCV2は、他の遺伝子型と比較してその増殖力の強さが示唆されている[12]。

† 連絡責任者：小池郁子(麻布大学獣医学部分子生物学)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

☎ 042-754-7111 FAX 042-769-1624

E-mail: dv1403@azabu-u.ac.jp

近年、中国をはじめとして北米、ブラジルなど世界的にこの株に近いPCV2dが優勢なPCV2として確認されている [10, 12, 13]. 著者らは、国内において2008～2015年の間に全国の死亡豚及び肺炎を呈した豚におけるPCV2感染の推移についてPCRを用いて調べたところ、2010～2013年にかけてPCV2感染は減少していたが、2014年よりふたたびPCV2の検出率の増加がみられた。さらに、PCV2ワクチン接種農場の健康豚においても定期的な血清中PCV2のモニタリング検査でPCV2ウイルス量の上昇が確認された（データは示していない）。

本調査では、2014年以降に国内でPCV2の検出率が増加していることに注目し、2015年にPCV2ワクチン接種農場の健康豚よりPCV2を検出して、検出株の遺伝子型別を行った。

材料及び方法

材料: 2015年5～6月に、PCV2ワクチン接種を行っている21農場（青森県1農場、福島県1農場、埼玉県1農場、千葉県5農場、神奈川県11農場、広島県1農場、熊本県1農場）において、健康な繁殖用母豚及び30, 60, 90, 120, 150日齢の離乳後子豚を選び、合計530個体から血清を採取した。そして各農場で日齢ごとに3～5個体ずつの血清を1グループとして混和したものを1検体として、30日齢20検体、60日齢21検体、90日齢21検体、120日齢21検体、150日21検体、繁殖用母豚59検体の計163血清検体を用いた。

DNA抽出とPCR: 核酸抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit, 株式会社キアゲン, 東京）を用い、血清検体からDNA抽出を行った。PCRは、PCV2のORF2を含む領域を増幅するプライマー配列（5'-CCATGCCCTGAA TTTCCATA-3' と 5'-GGGCACCAAAATACCACTTC-3'）を設計し、PCR試薬（Emerald Amp PCR Master Mix, タカラバイオ株式会社, 滋賀）、鋳型DNA1.0 μ lを用いて、最終液量を25 μ lとしてPCRを行った。反応条件は、94 $^{\circ}$ C 3分の熱変性後、94 $^{\circ}$ C 30秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 1分30秒間のサイクルを35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C 10分間の伸長とした。アガロースゲル電気泳動により目的のサイズである約1,080bpの増幅産物の確認をした。

塩基配列決定と分子系統樹解析: 増幅産物を精製用試薬（EXO SAP-IT, Affymetrix/USB社, 東京）で処理して精製したのち、シーケンシング試薬（BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing キット, Applied Biosystems社, 東京）及びシークエンサー（ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems社, 東京）を用いて、ダイレクトシークエンシング法により両鎖から塩基配列を決定した。

得られたORF2全領域の塩基配列データと国際DNA

表 本調査で得られたPCV2の採材場所と遺伝子型

採材県	農場名	株名	採材時期 (2015年)	遺伝子型	ORF2 塩基数
神奈川	B	SMC288-6	5月	a	702
神奈川	K	SMC289-4	5月		
神奈川	G	SMC297-10	6月		
広島	U	SMC295-5	5月		
千葉	Z	SMC294-4	5月	d	705
千葉	V	SMC296-21	5月		
青森	P	SMC251-1	6月		

データベースに登録されているPCV2の遺伝子型a～eの代表的な66株（国内検出株15株を含む）[7, 9-12]のORF2配列データを基にして、MEGA version6.0ソフトを用いてClustalW法と近隣結合法（2000ブートストラップ）により分子系統解析を行った。

成績

調べた血清163検体中10検体が、PCRによりPCV2陽性であった。内訳は30日齢が1検体、60日齢が4検体、90日齢が1検体、120日齢が2検体、150日齢が2検体であった。繁殖用母豚からはPCV2陽性検体は確認されなかった。これらの陽性検体は、7農場（神奈川県3農場、広島県1農場、青森県1農場、千葉県2農場）からの検体であった。これら10検体のORF2全領域（702または705bp）の塩基配列を決定したところ、7農場からおのおの異なる7株の配列情報が得られた（表）。

次に、この新たに得られた7株の配列情報と過去に報告されているPCV2の配列情報について、分子系統解析を行ったところ、ヌクレオチド配列レベル（図）、及び推定アミノ酸配列レベルのいずれの系統樹においても、4株（神奈川県3農場由来、広島県1農場由来）は遺伝子型PCV2a、3株（青森県1農場由来、千葉県2農場由来）は遺伝子型PCV2dに型別された。また、PCV2aの4株はPCV2a内で1つのクラスターを形成しており（図のクラスターa-1）、2001～2009年に国内で報告されたPCV2a株 [9] とは区別された。さらに、PCV2dに型別された3株は、2012年に北米で報告されたmPCV2（アクセッション番号JX535296）と同じクラスター（図のクラスターd-1）に区別され、2008年に国内で検出された株（アクセッション番号AB462384）とは異なっていた。

考察

今回のPCV2遺伝子調査において、2008年以前に優位に認められていたPCV2aと、2012年以降世界的に増加傾向にあるPCV2dの2つの遺伝子型が確認された。いっぽう、国内でPCVADの被害が増大した2008～

2015年に国内で検出されたPCV2の遺伝子型

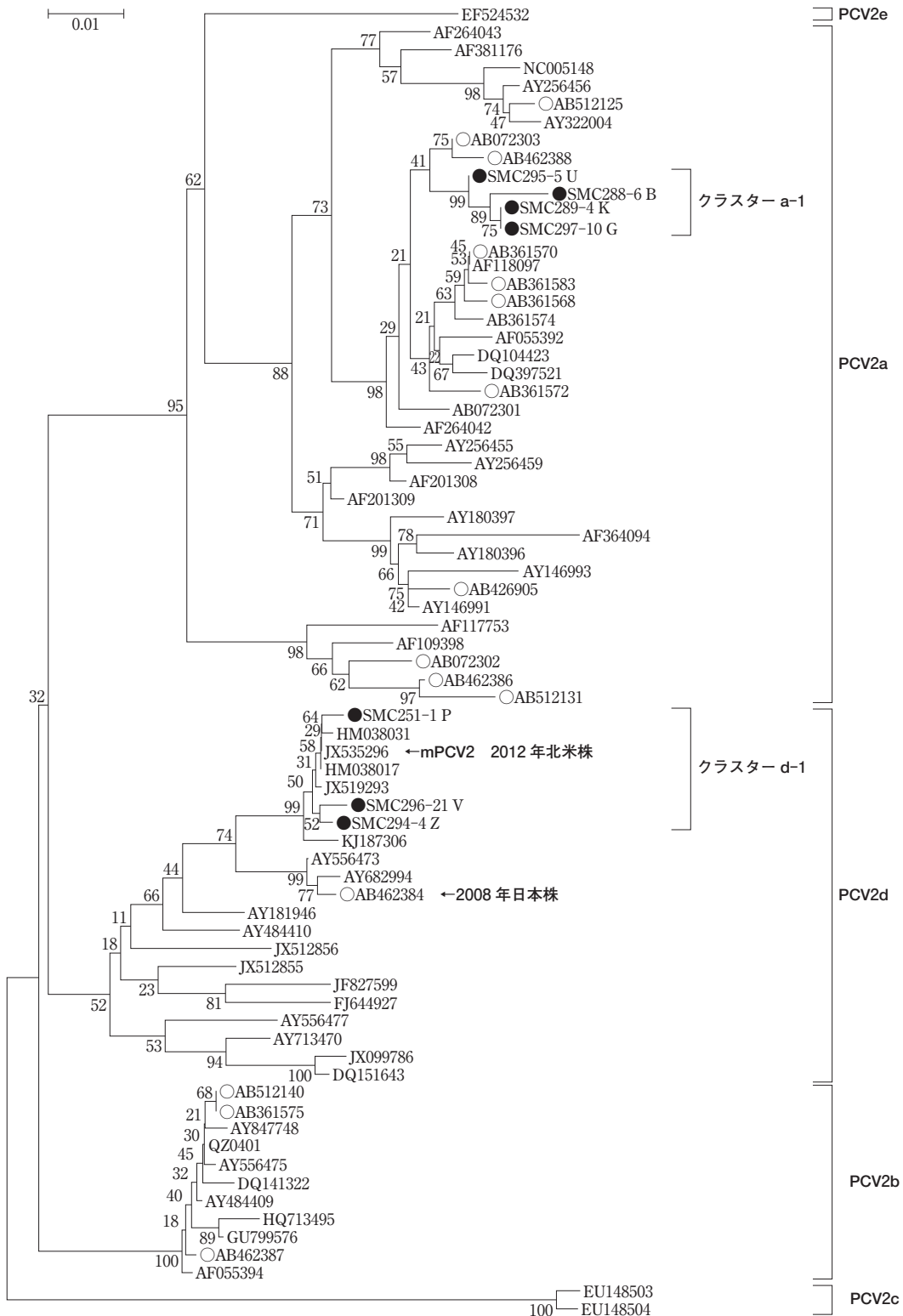


図 PCV2-ORF2領域のヌクレオチド配列に基づくClustalWによる近隣結合法を用いた分子系統樹

国際DNAデータベースに登録されているPCV2株をアクセッション番号で示した。

本研究で得られた7株の配列に●で記した(神奈川県B農場: SMC288-6B, 神奈川県G農場: SMC297-10G, 神奈川県K農場: SMC289-4K, 広島県U農場: SMC295-5U, 青森県P農場: SMC251-1P, 千葉県V農場: SMC296-21V, 千葉県Z農場: SMC294-4Z)。

○は2001~2009年に国内で検出された株であることを示す。

アクセッション番号JX535296は、2012年に北米で検出されたmPCV2株を、アクセッション番号AB462384は、2008年に国内で検出されたPCV2d株を示す。

系統樹中に示した数字はブートストラップ値を示す。

2010年に優勢な遺伝子型であったPCV2bはまったく認められなかった。

分子系統解析により、今回検出されたPCV2dの3株はいずれも2008年に日本で確認されたPCV2d株とは異なり、2012年に北米で検出されたmPCV2株と同じクラスターに位置した。今回検出されたPCV2aの4株においても、2001～2009年に国内で報告されたPCV2a株とは区別された。これらのことから、国内に優勢なPCV2は時間の経過とともに変化している可能性が考えられた。

mPCV2株が検出された北米の農場では、PCVADの顕著な増加が報告されているが[10]、今回の調査で検出されたPCV2dの株はすべて健康豚由来であり、これらの株が検出された農場で、PCVADは認められなかった。

今回PCV2dの株が検出された青森県1農場と千葉県2農場において交流は確認されず、農場間はそれぞれ80km以上離れていた。よってPCV2dの株が豚、人、餌、糞便などを介して各農場間を伝播した可能性は低いと考えられた。一方、各農場の繁殖候補豚はいずれも外部から導入されており、導入豚がPCV2d株の侵入に関与した可能性は残されている[14]。なお、PCV2aの株が検出された4農場においても、農場間の関連は認められなかった。

本調査では、2012年に北米で検出されたmPCV2株と同じクラスターに属するPCV2dの株が国内に存在することを初めて明らかにした。今後もPCV2の遺伝子学的な変化について注視する必要があると考える。

現在、遺伝子型PCV2dの株の起源を明らかにするため、過去に採取した血清検体を用いてPCV2の遺伝子解析を実施している。また、PCV2ワクチン接種をしたにもかかわらず、早い日齢の豚からPCV2が検出されたことから、ワクチン接種と遺伝子型の関連も調査していく。

引用文献

- [1] Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, Espuna E, Saubi N, Riera P, Bøtner A, Charreyre CE : Isolation and characterization of circovirus from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland, *Vet Microbiol*, 66, 115-123 (1999)
- [2] Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG : Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies, *J Vet Diagn Invest*, 19, 591-615 (2007)
- [3] Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H : Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan, *J Vet Med Sci*, 61, 1119-1123 (1999)
- [4] Mankertz A, Çaliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, Finsterbusch T : Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication, *Vet Microbiol*, 98, 81-88 (2004)
- [5] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS : Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, *J Gen Virol*, 81, 2281-2287 (2000)
- [6] Grau-Roma L, Crisci E, Sibila M, López-Soria S, Nofrarias M, Cortey M, Fraile L, Olivra A, Segalés J : A proposal on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and their relation with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) occurrence, *Vet Microbiol*, 128, 23-35 (2008)
- [7] Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmus S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P, Allan G : PCV-2 genotype definition and nomenclature, *Vet Rec*, 162, 867-868 (2008)
- [8] Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM : Porcine circovirus type 2 (PCV2): Genetic variation and newly emerging genotypes in China, *Virol J*, 7, 273 (2010)
- [9] Takahagi Y, Toki S, Nishiyama Y, Morimatsu F, Murakami H : Differential effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2 genotypes at Japanese pig farms, *J Vet Med Sci*, 72, 35-41 (2010)
- [10] Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG : Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2, *Vet Microbiol*, 163, 177-183 (2013)
- [11] Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, Patterson AR, Pal NS, Carman S, Meng XJ, Halbur PG : Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection, *J Gen Virol*, 89, 2482-2491 (2008)
- [12] Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ : Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs, *J Gen Virol*, 95, 2495-2503 (2014)
- [13] Salgado RL, Vidigal PM, de Souza LF, Onofre TS, Gonzaga NF, Eller MR, Bressan GC, Fietto JL, Almeida MR, Silva Júnior A : Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak, *Genome Announc*, 2, e00163-00164 (2014)
- [14] Franzo G, Tucciarone CM, Dotto G, Gigli A, Ceglie L, Drigo M : International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy, *Infect Genet Evol*, 32, 409-415 (2015)

Genotypes of Porcine Circovirus 2 Detected from Healthy Pigs in Japan, 2015

Fumiko KOIKE^{1),2)†}, Satoshi MURATA²⁾, Munetaka OI²⁾
and Masaru MURAKAMI¹⁾

1) *Azabu University School of Veterinary Medicine, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara-shi, 252-5201, Japan*

2) *SMC Co., Ltd., 1816 Kamifurusawa, Atugi-shi, 243-0215, Japan*

SUMMARY

We evaluated the incidence of porcine circovirus type 2 (PCV2) by conventional PCR in 163 serum samples which were pooled at each stage of 530 healthy pigs from 21 farms in Japan in 2015. Subsequent sequence analysis of the open reading frame 2 region of the PCV2 DNA (702 or 705 bp) from the PCR products showed that seven different PCV2 strains were present. Four PCV2 strains (from three farms in Kanagawa Prefecture and one in Hiroshima Prefecture) belonged to genotype PCV2a, while three (from one farm in Aomori Prefecture and two in Chiba Prefecture) belonged to the PCV2d group. Moreover, the PCV2d strains were closely related to the mPCV2 strain described as a rapidly proliferating strain in the U.S. in 2012, but not to the Japanese strains reported among PCV2d in 2008. In conclusion, it is probable that the dominance of PCV2 strains change with the progression of time in Japan. — Key words : Genotyping, pigs, porcine circovirus type 2.

† *Correspondence to : Fumiko KOIKE (Azabu University School of Veterinary Medicine)*

1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara-shi, 252-0206, Japan

TEL 042-754-7111 FAX 042-769-1624 E-mail : dv1403@azabu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 650 ~ 654 (2017)