

# 定量 PCR を用いた輸入豚のサーコウイルス 2 型 遺伝子量 調査

柴田明弘<sup>1)†</sup> 村田史郎<sup>2)</sup> 中尾哲也<sup>1)</sup> 井関 博<sup>3)</sup>

- 1) 農林水産省動物検疫所精密検査部 (〒 235-0008 横浜市磯子区原町 11-1)
- 2) 北海道大学大学院獣医学研究院 (〒 060-0818 札幌市北区北 18 条西 9 丁目)
- 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2017 年 2 月 9 日受付・2017 年 11 月 20 日受理)

## 要 約

2013 年に特定の農場から輸入され、豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) 感染が疑われた豚 112 頭について、リアルタイム PCR 法により血清中 PCV2 遺伝子量を測定し、豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) のリスクを評価した。これらの豚全頭は、輸出国で PCV2 ワクチンが接種されていたが、輸出のおよそ 1 カ月前にさまざまな週齢 (4~11 週齢) で接種されており、効果が得られているか不明であった。結果、112 頭中 84 頭で PCV2 遺伝子の増幅を認め、陽性豚の遺伝子量は  $10^3 \sim 10^8$  copies/ml、幾何平均遺伝子量は  $6.0 \times 10^4$  copies/ml であった。当該農場からは、血中 PCV2 遺伝子量が高くなる 10~15 週齢頃の豚の輸入が多く認められたものの、全体として PCVAD のリスクは抑制されていることが推察された。——キーワード：輸入豚、豚サーコウイルス 2 型、リアルタイム PCR。

-----日獣会誌 71, 135~139 (2018)

豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) は約 1,770 塩基の 1 本鎖環状 DNA をゲノムに持つ、エンベロープのない直径約 17nm の小型球形ウイルスで、複数の遺伝子型が報告されている [1, 2]。遺伝子型は Open Reading Frame 2 (ORF2) の塩基配列により北米型 (PCV2a) 及びヨーロッパ型 (PCV2b) に大別され、ともに世界的に発生が認められている [2-4]。遺伝子型の違いと病原性の関連については否定されており、いずれの遺伝子型も離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) や豚皮膚炎腎症候群 (PDNS) 等の豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) の原因と考えられている [4, 5]。複数の遺伝子型の混合感染、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) やマイコプラズマ等の病原体との混合感染は PCVAD 発症の要因とされ、血中や組織中の PCV2 遺伝子量が多い場合に発症のリスクが高まると考えられている [6-9]。

PCVAD は家畜伝染病予防法に基づく検疫対象疾病ではないが、豚コレラなどとの類症鑑別疾病として重要で

ある。近年では PCV2 ワクチン接種豚の輸入もあるが、輸入豚の PCV2 遺伝子保有状況は、これまで調査されてこなかった。このため、2012 年に輸入検疫が行われた豚 (輸入豚) 全 992 頭について、コンベンショナル PCR 法 (cPCR) により血清中の PCV2 遺伝子保有状況を調査したところ、特定の農場 (A 農場) 由来豚 376 頭のうち、113 頭から PCV2 遺伝子が検出され、他の農場由来豚と比較して高い陽性率であった。A 農場由来豚は、輸出国で PCV2 ワクチン (CircoFLEX, Boehringer Ingelheim, Germany) を、輸出のおよそ 1 カ月前に全頭接種されており、接種週齢は 6~15 週齢とさまざまであったことから、期待される効果が得られているかどうか不明であった。

翌 2013 年、A 農場から新たに 112 頭の輸入検疫が行われ、前年と同様に全頭が輸出のおよそ 1 カ月前にワクチンを接種 (4~11 週齢; 4 週齢 12 頭, 5 週齢 12 頭, 6 週齢 15 頭, 7 週齢 11 頭, 8 週齢 7 頭, 9 週齢 15 頭, 10 週齢 18 頭, 11 週齢 22 頭) されていたことから、当

† 連絡責任者(現所属)：柴田明弘 (農林水産省動物検疫所精密検査部海外病検査課)

〒 479-0881 常滑市セントレア 1-2 中部検査・診断センター内

☎ 0569-38-8515 FAX 0569-38-8517 E-mail : akihiro\_shibata280@maff.go.jp

表 1 PCV2 遺伝子検出に用いたプライマー及びプローブ

名称	塩基配列 (5'-3')	遺伝子領域	増幅サイズ (bp)	引用文献	
VF-2	GAAGAATGGAAGAAGCGG	62-79	1,494	[10]	
Nest-R	ACAGTCAGAACGCCCTCCT	1537-1555			
2a-F	AACAATCCACGGAGGAAGG	916-934	568		
2a-R	GGGACCAACAAAATCTCY	1466-1483			
2b-F	CTGTTTTCGAACGCAGTG	1121-1138	360		
2b-R	CTCAAACCCCGCTCTG	1464-1480			
FW	GAGCAGGGCCAGAATCAAC	1409-1428	179		本稿
RV	TCCCGCACCTTCGGATATACT	1567-1587			
Probe	FAM-TCTGTAGTATTCAAAGGG-MGB	1444-1462	—		

該豚における血清中の PCV2 遺伝子量 (copy/ml) をリアルタイム PCR 法 (qPCR) により測定し, PCVAD 発症のリスクについて評価した。

### 材料及び方法

**2012 年輸入豚の PCV2 遺伝子保有状況調査:** 調査材料には, 2012 年の輸入豚全 992 頭の血清を用いた。市販の遺伝子抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Germany) を用い, 100 $\mu$ l の血清から最終量 200 $\mu$ l の DNA を抽出した。抽出 DNA 液をテンプレートとし, 既報の Lyoo ら [10] のプライマーを用いた nested PCR により PCV2a, 2b 遺伝子の増幅を行った (表 1)。

各 PCR は市販の PCR 試薬 (Premix Taq (Ex Taq version 2.0), タカラバイオ(株), 滋賀) 12.5 $\mu$ l, 精製水 9.5  $\mu$ l, 1 $\mu$ M プライマー各 1 $\mu$ l に鋳型 DNA 1 $\mu$ l を加えた最終液量 25 $\mu$ l を, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) により, 既報の反応条件 [10] に従って反応を行った。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動し, 目的の遺伝子断片の増幅の有無を確認した。陽性個体について由来農場を特定し, 陽性農場ごとに陽性率を算出した。

**2013 年 A 農場由来豚の PCV2 遺伝子量調査:** 調査材料には, 2013 年の A 農場由来豚全 112 頭の血清を用いた。前述の方法で核酸を抽出し, qPCR により遺伝子量を算出した。標準遺伝子には, 増幅する遺伝子領域が含まれるよう設計した 326 塩基から構成される 2 本鎖合成 DNA (GeneArt Strings DNA Fragments, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) を用いた (図)。当該合成 DNA (凍結乾燥 200ng) は, 以下の計算式により, 含まれる遺伝子のコピー数を求めた。

計算式:

$$\text{合成 DNA コピー数} = \frac{(200\text{ng}(\text{合成 DNA 質量}) \times 6.022 \times 10^{23}(\text{アボガドロ係数}))}{(326(\text{合成 DNA 塩基対数}) \times 660(\text{DNA 一塩基対平均分子量}) \times 10^9 \text{ng})}$$

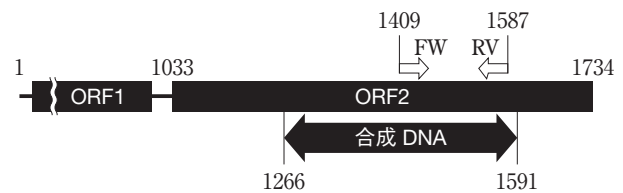


図 ORF2 領域における合成 DNA と qPCR プライマーの位置関係

702 塩基の ORF2 領域全長の内側に 326 塩基の合成 DNA を設計した (参照: J4446 株 (PCV2b), Accession No. AB361584)。

凍結乾燥合成 DNA 200ng を 280 $\mu$ l の Tris-EDTA Buffer でけん濁し, 2 $\times 10^9$  copies/ $\mu$ l の標準遺伝子液とした。さらに本液を精製水で希釈し, 2 $\times 10^2$  から 2 $\times 10^8$  copies/ $\mu$ l までの 10 倍希釈系列の標準遺伝子液を作製した。また, PCV2a, 2b 遺伝子に共通して保存されている領域から 178 塩基を増幅して検出するプライマーペア及びプローブを作製し (表 1), 市販の PCR 試薬 (2 $\times$ TaqMan Universal PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) を用いて, TaqMan プローブ法による qPCR を行った。PCR 反応は 1 検体当たり 2 ウェルを使用し, 1 ウェルあたりの反応液の組成は, Master Mix 10 $\mu$ l, 精製水 3.85 $\mu$ l, 10 $\mu$ M プライマー各 0.95 $\mu$ l, 10 $\mu$ M TaqManProbe 0.25 $\mu$ l, 鋳型 DNA 4 $\mu$ l を加えた最終液量 20 $\mu$ l とした。10 倍希釈系列の各標準遺伝子液においても検体と同様に 4 $\mu$ l を使用して PCR を行い, 8 $\times 10^2$  から 8 $\times 10^8$  copies までの各鋳型量と Ct 値から検量線を作成した。PCR 反応は, リアルタイム PCR システム (Applied biosystems 7500 Real-Time PCR system, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) により, 50 $^{\circ}$ C 2 分間の UNG 処理, 95 $^{\circ}$ C 10 分間の初期変性後, 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 58 $^{\circ}$ C 1 分間のサイクルを 40 回繰り返した。検量線より測定される 2 ウェルの幾何平均値を検体の測定値とし, 次の計算式により血清 1ml 当りに含まれる PCV2 遺伝子量に換算した。

計算式：

$$\text{血清 } 1\text{ml 当たりの遺伝子量} = (\text{測定値} \times 2^* / 4\mu\text{l}(\text{鋳型 DNA 量})) \times (200\mu\text{l}(\text{DNA 抽出量}) / 100\mu\text{l}(\text{血清量})) \times 1,000\text{ml}$$

\*PCV2は、1本鎖DNAウイルスであるため、検体の遺伝子量は2本鎖合成DNAによる検量線から測定されるコピー数の2倍に相当するために補正する。

検量線の作成に合成DNAを利用した本手法は、プラスミドを用いた一般的な手法と同程度（誤差2倍未満）の検出感度であることを確認した（データ未掲載）。PCV2汚染農場における感染豚の血中PCV2遺伝子量は週齢により異なるとされていることから[11]、陽性率及び幾何平均遺伝子量を週齢別に示した。

成 績

**2012年輸入豚のPCV2遺伝子保有状況調査：**輸入豚992頭のnested PCRの結果、118頭の血清でPCV2a, 2b遺伝子の増幅を認めた。陽性個体は4農場由来であり、農場ごとの陽性率と遺伝子型は、陽性率の高い農場からA農場30.1% (113/376, PCV2a), B農場5.6% (2/36, PCV2b), C農場4.5% (2/44, PCV2a), D農場3.6% (1/28, PCV2a, 2b)であった(表2)。本稿では最も陽性率の高かったA農場由来豚について、翌2013年にqPCRによる調査を実施した。

**2013年A農場由来豚のPCV2遺伝子量調査：**qPCRの結果、112頭中84頭(75%)で遺伝子の増幅を認めた。増幅を認めた検体の遺伝子量と頭数は、 $10^3$ 以上 $10^4$ copies/ml未満が10頭、 $10^4$ 以上 $10^5$ copies/ml未満が47頭、 $10^5$ 以上 $10^6$ copies/ml未満が23頭、 $10^6$ 以上 $10^7$ copies/ml未満が3頭、 $10^7$ 以上 $10^8$ copies/ml未満が1頭であった。また、2013年に輸入したA農場由来豚の週齢は9～17週齢であったが、10～14週齢で陽性率は80%以上となり、12週齢で90.9%と最も高くなった(表3)。週齢別の幾何平均遺伝子量は、10週齢の豚が最も高く $16.9 \times 10^4$ copies/mlであった(表3)。

表2 2012年PCV2陽性豚の由来農場別陽性率及び遺伝子型

陽性農場	輸入頭数	遺伝子型	
		PCV2a 陽性数 (%)	PCV2b 陽性数 (%)
A	376	113 (30.1)	0 (0)
B	36	0 (0)	2 (5.6)
C	44	2 (4.5)	0 (0)
D	28	1 (3.6)	1 (3.6)
計	484	116 (24.0)	3 (0.6)

表3 A農場輸入豚の週齢別qPCR陽性率及び幾何平均遺伝子量

	週 齢									
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	計
頭 数	7	15	8	11	10	19	8	24	10	112
陽性頭数	3	12	7	10	8	16	5	17	6	84
陽性率 (%)	42.9	80.0	87.5	90.9	80.0	84.2	62.5	70.8	60.0	75.0
平均遺伝子量 ( $\times 10^4$ copies/ml)	8.3	16.9	12.0	2.7	4.4	5.4	3.5	4.4	7.4	6.0

考 察

PCV2の野外感染には、移行抗体の減少が影響していると考えられ、PCVADは12～16週齢の豚で多く認められると報告されている[11]。また、Kixmüllerら[12]の報告によれば、PCV2感染豚では、およそ10～15週齢の豚で血中遺伝子量が最も高くなり、陽性個体の割合では11～16週齢頃の豚にピークが認められている。PCV2の陽性率が高かったA農場由来豚の遺伝子量は、10週齢の豚で血中幾何平均遺伝子量が最も高く( $16.9 \times 10^4$ copies/ml)、12週齢の豚で陽性率がピーク(90.9%)となり、これまでに報告される豚の週齢に応じたPCV2感染の特徴が輸入豚でも認められた。A農場由来豚では11～16週齢の豚が7割以上を占めたことも、全体として高い陽性率を示した要因と考えられた。しかし今回、こうした陽性率の高い週齢豚においても、平均遺伝子量は $10^6$ copies/ml未満であり、 $10^7$ copies/ml以上の遺伝子量を示した個体は10週齢の1頭( $1.9 \times 10^7$ copies/ml)のみであったことから、ワクチン接種により血中ウイルス量が抑制されていた可能性が唆された。

PCVADと血中PCV2量の関係では、特にPMWSで多くの調査が行われており、 $10^6 \sim 10^7$ copies/mlを超える個体でPMWSの発症リスクが高まると報告されている。また、Olveraら[13]の調査では、PDNS発症豚の平均遺伝子量は $2 \times 10^5$ copies/mlとPMWSより低いPCV2量でも発症が認められると報告している。しかし、PDNSではPCV2感染によるⅢ型アレルギーの関与が疑われており、発症の機序については不明な点が多く、血中PCV2遺伝子量との関係を示す報告は少ない[13, 14]。

これまでのところ、A 農場由来豚から PCVAD を疑う個体は認められていないが、背景にはワクチン接種に加え、A 農場が実施している自主的な疾病モニタリング検査も PCVAD の予防に寄与していると考えられた。PCV2 は PRRS、マイコプラズマ等の疾病と混合感染した場合に PCVAD 発症のリスクを増大させることが報告されているが、A 農場ではこうした疾病に対し、定期的なモニタリング検査による管理が行われていた。また、A 農場からこれまでに PCV2a のみが検出されていることから、複数の遺伝子型の混合感染による発症のリスクも低いと考えられた。

以上から、A 農場由来豚では高率に PCV2 遺伝子が検出されているものの、ワクチン接種による血中ウイルス量の抑制や農場における衛生管理による混合感染の防除により、PCVAD 発症のリスクは低く抑制されていることが推察された。しかし今回の調査で、 $10^5$ copies/ml 以上の遺伝子量を示した個体が 24.1% (27/112) 認められたことで、こうした豚の中から PDNS 発症豚が出現する可能性は否定できない。一般に汚染農場における子豚への PCV2 ワクチンは、移行抗体の影響を考慮し 3 週齢頃に接種するのが効果的と考えられており、今後も同様の週齢豚の輸入が見込まれることから、輸入検疫時には綿密な臨床観察を行うとともに、効果的なワクチン接種について啓発していきたい。

#### 引用文献

- [1] Takahagi Y, Toki S, Nishiyama Y, Morimatsu F, Murakami H : Differential effects of porcine circovirus type2 (PCV2) vaccination on PCV2 genotypes at Japanese pig farms, *J Vet Med Sci*, 72, 35-41 (2010)
- [2] Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwincq H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk 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)
- [3] Segalés J, Allan GM, Domingo M : Porcine circovirus diseases, *Anim Health Res Rev*, 6, 119-142 (2005)
- [4] Gillespie J, Opriessnig T, Meng XJ, Pelzer K, Buechner-Maxwell V : Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease, *J Vet Intern Med*, 23, 1151-1163 (2009)
- [5] Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, Patterson AR, Pal N, Carman S, Meng XJ, Halbur PG : Differences in virulence among porcine circovirus type2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection, *J Gen Virol*, 89, 2482-2491 (2008)
- [6] Harding JC, Ellis JA, McIntosh KA, Krakowka S : Dual heterologous porcine circovirus genogroup 2a/2b infection induces severe disease in germ-free pigs, *Vet Microbiol*, 145, 209-219 (2010)
- [7] Rovira A, Balasch M, Segalés J, García L, Planadurán J, Rosell C, Ellerbrok H, Mankertz A, Domingo M : Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2, *J Virol*, 76, 3232-3239 (2002)
- [8] Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng XJ, Halbur PG : Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2, *Vet Pathol*, 41, 624-640 (2004)
- [9] Segalés J : Porcine circovirus type2 (PCV2) infections : Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Res*, 164, 10-19 (2012)
- [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] Shen HG, Loiacono CM, Halbur PG, Opriessnig T : Age-dependent susceptibility to porcine circovirus type 2 infections is likely associated with declining levels of maternal antibodies, *J Swine Health Prod*, 20, 17-24 (2012)
- [12] Kixmöller M, Ritzmann M, Eddicks M, Saalmüller A, Elbers K, Fachinger V : Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2, *Vaccine*, 26, 3443-3451 (2008)
- [13] Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M : Comparison of porcine circovirus type2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs, *J Virol Methods*, 117, 75-80 (2004)
- [14] Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJ, Elbers AR : Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trigger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study, *Vet Microbiol*, 99, 203-214 (2004)



## Analysis of Porcine Circovirus Type 2 Load in Serum from Pigs Recently Imported into Japan Using Quantitative Real-Time PCR

Akihiro SHIBATA<sup>1)†</sup>, Shiro MURATA<sup>2)</sup>, Tetsuya NAKAO<sup>1)</sup> and Hiroshi ISEKI<sup>3)</sup>

- 1) *Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 11-1 Haramachi, Isogo-ku, Yokohama, 235-0008, Japan*
- 2) *Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Nishi 9, Kita 18, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan*
- 3) *Division of Viral Disease Epidemiology, National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

### SUMMARY

We measured porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA loads in 112 pigs to evaluate the risk of porcine circovirus associated disease (PCVAD) using quantitative real-time PCR. The pigs had been imported into Japan from a farm in 2013 and were suspected of having acquired a PCV2 infection during the previous survey. They were unsystematically inoculated with PCV2 vaccine at four to 11 weeks old, in other words, approximately one month prior to import. It was uncertain if the unsystematic vaccination had effectively prevented the development of PCVAD symptoms. Subsequently, PCV2 was detected in 84 serum samples. PCV2 DNA loads were detectable at the range of  $10^3$  to  $10^8$  copies/ml, and the geometric mean value was  $6.0 \times 10^4$  copies/ml. Although the pigs evaluated in this study were mostly 10 to 15 weeks old and generally exhibited a high viral load, the results suggested that PCV2 replication in pigs was relatively restricted, which prevented the development of PCVAD symptoms.

— Key words : imported pig, porcine circovirus type 2, real-time PCR.

† Correspondence to (Present address) : Akihiro SHIBATA (Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

1-2 Centrair, Tokoname, 479-0881, Japan

TEL 0569-38-8515 FAX 0569-38-8517 E-mail : akihiro\_shibata280@maff.go.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 135 ~ 139 (2018)