

2009～2016年に国内の健康豚から検出された 豚サーコウイルス2型の遺伝子型の変化

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)

(2018年3月11日受付・2019年4月16日受理)

要 約

豚サーコウイルス2型 (PCV2) は、豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) としてさまざまな疾病の原因となる。PCV2の遺伝子型dは2つのグループPCV2d-1とPCV2d-2に分けられ、mPCV2が属するPCV2d-2は、他の遺伝子型に比べ豚体内での増殖能及び感染豚からのウイルス排泄が高く、世界的に優勢な遺伝子型となりつつある。著者らは、2015年に採取した健康な豚の血清よりmPCV2と同じグループであるPCV2d-2 (前回の著者らの報告ではPCV2d-1に相当) に属する株を3株確認し、すでに報告した。そこで、国内におけるPCV2d-2の浸潤状況を調査するため、2009～2016年に青森県、千葉県、栃木県、神奈川県、広島県、熊本県の19農場を対象として、健康な豚から採取・保存した血清を用いて、PCV2を検出するPCR法で調べるとともに、検出ウイルスの塩基配列解析から遺伝子型を分類し、各遺伝子型の検出地域と経時的な変化をみた。その結果、PCV2d-2が少なくとも2012年には国内に存在していたことが確認され、それ以降国内に広がっていることが推定された。さらに、2016年には、これまで国内で報告されていないPCV2eが初めて検出された。PCV2d-2及びPCV2eの検出時期及び遺伝子型の変動は、アメリカでの報告とほぼ一致しており、今後の侵入経路を考える有用な情報であると考えられた。

——キーワード：遺伝子型別、豚サーコウイルス2型、PCV2d-2、PCV2e。

-----日獣会誌 72, 481～486 (2019)

養豚場において、豚サーコウイルス2型 (porcine circovirus type2: PCV2) による感染は、さまざまな疾病を引き起こす、豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) [1] として、重要な疾病の一つとなっている。

PCV2は、おもに2つのopen reading frame (以下、ORF)、ORF1とORF2から成る環状一本鎖DNAウイルスで、ORF1はウイルスの複製に関わるレプリガーゼをコード、ORF2はカプシドタンパク質をコードし、ORF2の塩基配列の違いにより、PCV2は現在a～eの5つの遺伝子型に分類されている [2-4]。

2007年頃、おもにPCV2bによるPCVADの発生が世界的に報告されていたが、PCV2aを抗原としたPCV2ワクチンの開発により、その後の発症数は減少した [5, 6]。

しかし、2012年に北米のPCV2ワクチン接種農場でPCVADが報告され [7]、その原因はmutant PCV2

(mPCV2) と呼ばれるPCV2dに属する遺伝子型であった [8]。mPCV2は、他の遺伝子型と比較して、豚への病原性に違いはないが、その増殖能力及び感染後早い時期からのウイルス排泄があることが分かっている [9]。そして、PCV2dはPCV2d-1とPCV2d-2の2つのグループに分けられ、mPCV2と同じグループに属するPCV2d-2が、これまでのPCV2bに代わって世界的に優勢な遺伝子型となりつつある [9-11]。

著者ら [12] は、2015年春に採取した健康な豚の血清からPCRで検出したPCV2において、分子系統学的にmPCV2と同じグループであるPCV2d-2に属する株が国内に存在することを初めて報告した。なお、その既報では、mPCV2に属する株をPCV2d-1と記していたが、PCV2dがPCV2d-1とPCV2d-2に分かれることが判明し、mPCV2はPCV2d-2に属することになったことから [9]、本論文でもPCV2d-2に変更した。

† 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 : h-koike@azabu-u.ac.jp

そこで、本調査では過去に遡り、2009～2016年に国内の健康な豚から採血し保存していた血清を対象として、PCV2の遺伝子型の検出地域と経時的变化を調べた。

材料及び方法

ワクチン接種歴を確認している国内19農場（青森県1、千葉県6、栃木県1、神奈川県9、広島県1、熊本県1）（表）において、30、60、90、120及び150日齢の健康な肥育豚及び母豚から、2009～2016年の各年の春と秋の2回採血して血清分離を行った。検査に使用するまでは、これらの血清を-80℃フリーザーに保存した。保存した血清は、各農場で日齢及び母豚ごとに複数の血清を混和したものを1検体として、計1,120検体を用いた。国内での口蹄疫、農場での豚流行性下痢（porcine epidemic diarrhea、以下「PED」）発生の影響などにより検体数が少ない年もあったが、各年各農場10検体以上を用いた。

既報[12]に従ってDNA抽出、PCV2のORF2を検出するPCRを行い、増幅産物の塩基配列を解析して、PCV2遺伝子型を分類した。また、2015年のデータには、2015年春の調査で検出した既報[12]の10検体7株のPCV2も含めて解析した。

成績

PCV2 ORF2の塩基配列決定及び分子系統樹解析（図1）：調査した1,120検体中69検体（6.2%）がPCV2のORF2部位を含む領域のPCRで陽性となった。塩基配列決定及び分子系統解析により、既報[12]で検出された7株と本調査で検出された69検体を合わせ、2009～2016年に合計34株（Accession No. LC278320～LC278353）のPCV2株が確認された。69検体の遺伝子型の内訳は、PCV2aが25検体16株、PCV2bが30検体12株、PCV2dが13検体5株であり、さらに、これまで国内での報告がなかったPCV2eが1検体1株が検出された。

PCV2dの5株は、すべてmPCV2と同じグループであるPCV2d-2に属した。そして、同一の株が複数の農場で確認され、LC278340は千葉県の農場、熊本県のN農場、青森県のP農場で確認された。また、千葉県のV及びW農場は各年で違う株が確認された。

2016年の検体に、国内で初めて確認されたPCV2eは、2013年にアメリカで検出された株（KT867794）と100%の相同性を有していた。

ワクチン接種豚でのPCV2遺伝子型の経時的推移：PCV2遺伝子が検出された69検体のうち、PCV2ワクチン接種豚の由来材料は39検体（PCV2陽性検体の豚の56.5%）であった。各遺伝子型の割合は、PCV2aが33.3%、PCV2bが23.1%、PCV2d-2が41.0%、

PCV2eが2.6%であった。PCV2d-2及びPCV2eに属する株は、すべてPCV2ワクチン接種豚の由来材料からの検出であった（表）。

図2に示したようにPCV2d-2は、2012年に検出されて以降40～70%の割合でコンスタントに検出された。

国内の各地域における遺伝子型の検出状況：表に示したように、2009～2012年に東北、関東地方でPCV2a及びPCV2bが検出されていたが、千葉県のV農場と神奈川県のS農場の2農場で、2012年よりPCV2d-2が検出され始め、2015年には青森県のP農場、栃木県のAA農場、2016年には熊本県のN農場でもPCV2d-2が検出された。また、PCV2eが2016年の神奈川県のCC農場より検出された。

考察

本研究により、mPCV2と分子系統学的に同じグループであるPCV2d-2に属する株が、2012年に関東で確認された。2015年には関東だけでなく東北、2016年には九州と、広範囲に感染していることがわかった。また、2015年にアメリカで報告のあったPCV2eが、2016年に国内の豚にも感染していることを初めて確認した。

アメリカにおけるOpriessnigら[9]の2011年からの疾患豚及び正常豚の肺組織598検体の調査結果では、PCV2d-2は著者らの調査と同時期の2012年より、PCV2eは2015年より検出され始め、日本における著者らの調査とアメリカのPCV2d-2及びPCV2eの検出開始時期とその後の出現割合はほぼ一致していた。そして、同一の株が複数の農場で確認されたことから、ウイルスの農場への侵入経路の可能性を検討した。

PCV2は腸管内で増殖するほか、精液中への排泄もあることが知られている[13, 14]。国内へもアメリカより定期的に繁殖用豚または精液が輸入されているが、PCV2d-2及びPCV2eが検出された9農場では、海外から直接豚や精液を輸入しておらず、また生体の導入元も共通していないことから、感染源を特定することはできなかった。

海外において、PCV2遺伝子が検出された血漿蛋白の入った飼料を実験的に与えたところ、PCV2の感染が成立したとの報告[15]がある。飼料中へのPCV2の混入は今回調査していないが、すべての農場で血漿蛋白を配合した飼料がPCV2ワクチン接種前の子豚期に給与されていることから、PCV2の飼料からの侵入の可能性も考えられる。

PCV2d-2またはPCV2eが検出された9農場のうち8農場では、PEDウイルスの侵入も確認された（表）。一方、PCV2d-2及びPCV2eが検出されなかった残りの10農場では、PEDウイルスの侵入は調査期間中認められなかった。国内でのPEDウイルス侵入のリスクファ

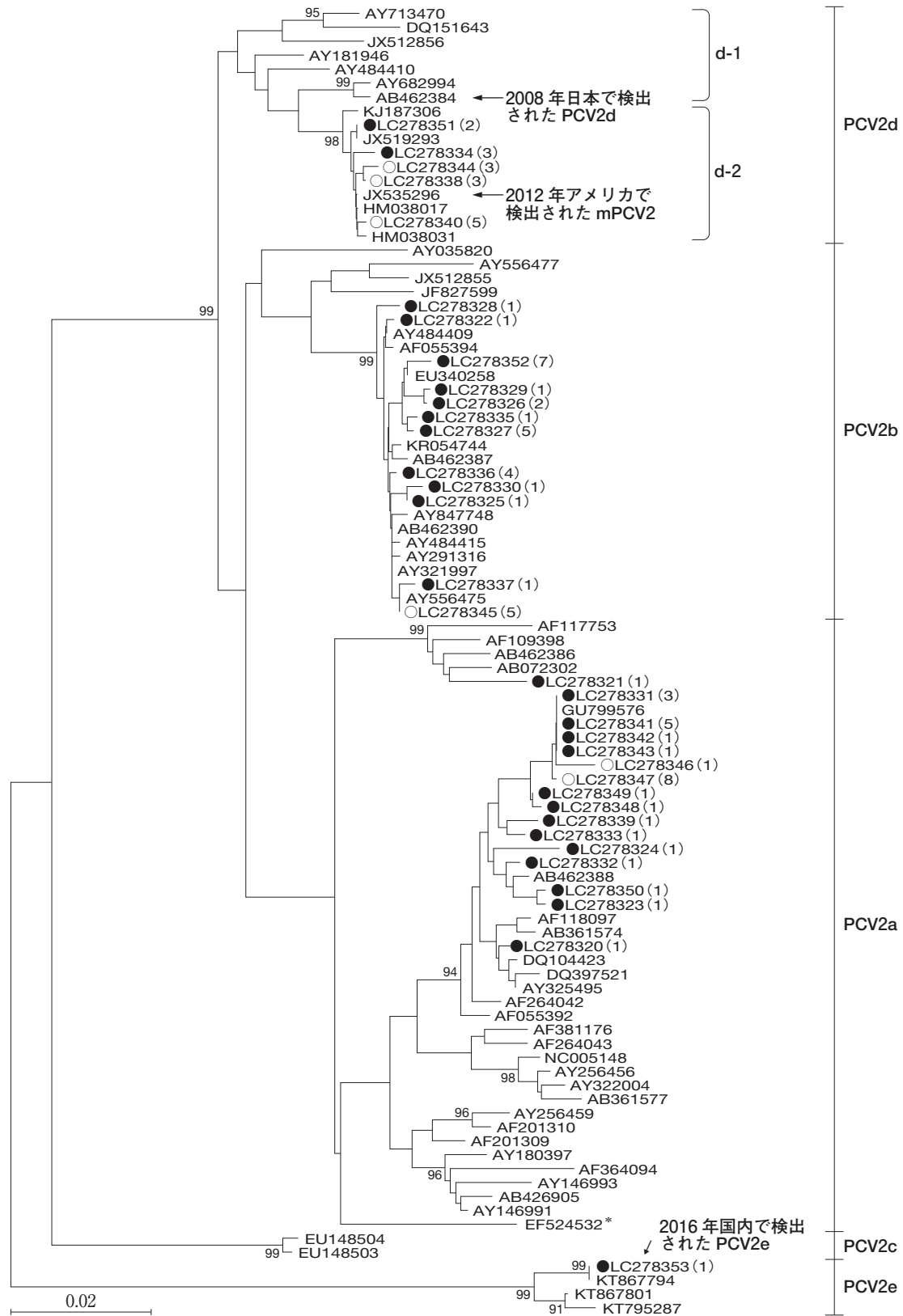


図1 PCV2ORF2領域の塩基配列に基づく近隣結合法を用いた分子系統樹

塩基配列データベース (GenBank) に登録されているPCV2株をアクセッション番号で示した。著者らが検出した34株については、既報 [12] の7株を含む株を○、本研究でのみ得られた株を●で記し、()内の数字は同一の株が検出された検体の数を示した。系統樹内の数字はブートストラップ値 (90以上) を示した。

今回、Daviesら [18] の報告を基に、国内で確認されたLC278353を含めた4株をPCV2eとした。なお、既報 [12] においてAccession No. EF524532*をZhaiら [17] の報告に基づきPCV2eと表記していた。

国内の健康豚から検出された PCV2 遺伝子型の推移

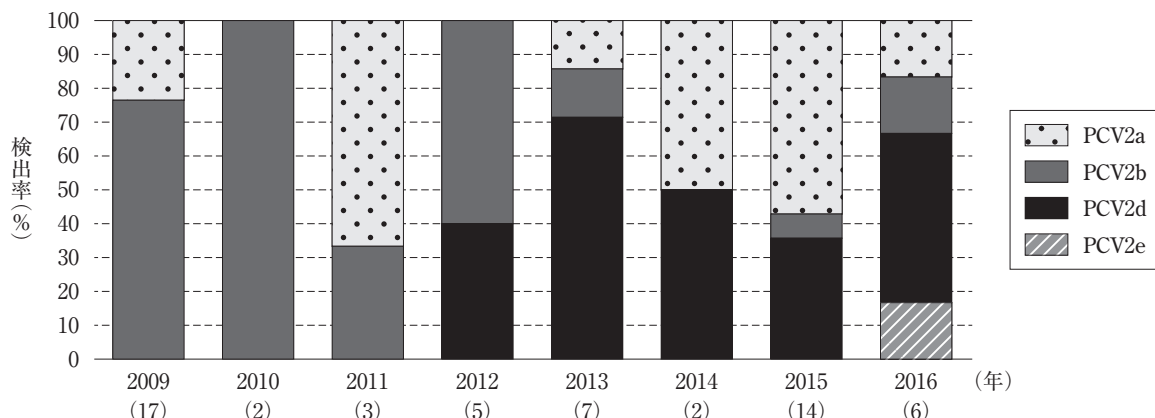


図2 PCV2 遺伝子型の検出率の推移

ワクチン接種豚から検出された PCV2 遺伝子型の検出率

2009 年は国内でのワクチン販売前のため、ワクチン非接種豚での割合を示す。2010 年以降はワクチン接種豚での検出率を示し、2015 年のデータには既報 [12] の 10 検体 7 株の結果を含む。横軸の () 内の数字は PCV2 検出数を示す。

クターとして、飼料トラックの運搬回数が挙げられており [16]、このことからウイルスが国内の農場間に広がる要因として、飼料運搬容器や運搬トラックを介する可能性も考えられた。

以上の調査結果より、① 2015 年に確認されていた PCV2d-2 は 2012 年の時点ですでに国内に侵入していたこと、② PCV2 ワクチン接種農場においても、2012 年以降継続的に PCV2d-2 は存在し、国内に広まっていたこと、③ また 2016 年には PCV2e が存在したことも、新たに確認された。

国内だけでなく海外での発生状況も監視し、導入豚や精液のほか、輸入飼料及び運搬経路中の PCV2 の検査と PCV2 遺伝子型のモニタリング等、今後も継続して侵入経路の調査を行う必要がある。

引用文献

[1] 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)

[2] 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, 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] Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM : Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China, *Virology*, 7, 273 (2010)

[4] 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)

[5] Fort M, Sibila M, Allepuz A, Mateu E, Roerink F, Segalés J : Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins, *Vaccine*, 26, 1063-1071 (2008)

[6] Opriessnig T, Patterson AR, Madson DM, Pal N, Halbur PG : Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-months post vaccination, *Vaccine*, 27, 1002-1007 (2009)

[7] 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)

[8] Guo L, Fu Y, Wang Y, Lu Y, Wei Y, Tang Q, Fan P, Liu J, Zhang L, Zhang F, Huang L, Liu D, Li S, Wu H, Liu C : A porcine circovirus type 2 (PCV2) mutant with 234 amino acids in capsid protein showed more virulence *in vivo*, compared with classical PCV2a/b strains, *Plos One*, 7, e41463, 1-10 (2012), (online), (<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041463>), (accessed 2016-12-23)

[9] 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)

[10] Xiao CT, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T : PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016, *Vet Microbiol*, 197, 72-77 (2016)

[11] 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 multisys-

表 2009～2016年に国内の各農場で検出されたPCV2の遺伝子型

| 農場 | 県 | ワクチン 接種有無 | PED 侵入有無 | 2009年 | 2010年 | 2011年 | 2012年 | 2013年 | 2014年 | 2015年 | | 2016年 | |
|-------|----|--------------|-------------|-------|----------|----------|-------|----------|-------|-------|----|----------------|----|
| | | | | | | | | | | 春* | 秋 | | |
| 1 P | 東北 | 青森 | 有 | 有 | — | — | 2a | — | — | — | 2d | — | — |
| 2 SA | | 千葉 | 無 | 無 | 2a | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 X | | 千葉 | 有 | 無 | 2b | — | — | 2a | — | — | — | — | — |
| 4 V | | 千葉 | 有 | 有 | — | 2b | — | 2b 2d | 2d | — | 2d | 2d | — |
| 5 W | | 千葉 | 有 | 有 | 2a | — | — | — | 2d | 2d | — | — | 2d |
| 6 L | | 千葉 | 有 | 有 | 2b | — | — | — | — | — | — | — | 2d |
| 7 Z | | 千葉 | 有 | 有 | — | — | — | — | — | — | 2d | — | — |
| 8 AA | | 栃木 | 有 | 有 | — | — | — | — | — | — | — | 2a 2b 2d | — |
| 9 Y | 関東 | 神奈川 | 有 | 無 | — | — | 2a | — | — | — | — | — | — |
| 10 A | | 神奈川 | 有 | 無 | — | — | — | — | — | 2a | — | — | — |
| 11 K | | 神奈川 | 有 | 無 | 2a 2b | — | 2b | 2b | 2b | — | 2a | 2a | 2b |
| 12 B | | 神奈川 | 無 | 無 | 2b | 2b | — | — | 2a | 2a | 2a | 2a | 2a |
| 13 G | | 神奈川 | 無 | 無 | 2b | 2a 2b | — | 2a 2b | 2a | — | 2a | — | — |
| 14 HA | | 神奈川 | 無 | 無 | — | 2b | — | — | — | — | — | — | — |
| 15 E | | 神奈川 | 無 | 無 | — | — | — | 2b | 2b | — | — | — | — |
| 16 S | | 神奈川 | 有 | 無 | 2b | — | — | 2d | 2d | — | — | — | — |
| 17 CC | | 神奈川 | 有 | 有 | — | — | — | — | — | — | — | — | 2e |
| 18 U | 中国 | 広島 | 有 | 無 | — | — | — | — | — | — | 2a | 2a | 2a |
| 19 N | 九州 | 熊本 | 有 | 有 | — | — | — | — | — | — | — | — | 2d |

*2015年春は既報 [12] のデータを引用した。

—: PCV2 未検出

temic wasting syndrome outbreak, Genome Announcements, 2, e00163-00164 (2014), (online), (<https://mra.asm.org/content/2/2/e00163-14>), (accessed 2016-12-23)

- [12] 小池郁子, 村田 知, 大井宗孝, 村上 賢: 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型の遺伝子型, 日獣会誌, 70, 650-654 (2017)
- [13] Madson DM, Ramamoorthy S, Kuster C, Pal N, Meng XJ, Halbur PG, Opriessnig T: Infective of porcine circovirus type 2 DNA in semen from experimentally-infected boars, Vet Res, 40, 10 (2009)
- [14] Shibata I, Okuda Y, Yazawa S, Ono M, Sasaki T, Itagaki M, Nakajima N, Okabe Y, Hidejima I: PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole blood, serum, oropharyngeal swab, nasal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases, J Vet Med Sci, 65, 405-408 (2003)

- [15] Patterson AR, Madson DM, Opriessnig T: Efficacy of experimentally produced spray-dried plasma on infectivity of porcine circovirus type2, J Anim Sci, 88, 4078-4085 (2010)
- [16] Sasaki Y, Alvarez J, Sekiguchi S, Sueyoshi M, Otake S, Perez A: Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan, Prev Vet Med, 123, 161-167 (2016)
- [17] Zhai SL, Chen SN, Wei ZZ, Zhang JW, Huang L, Lin T, Yue C, Ran DL, Yuan SS, Wei WK, Long JX: Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China, Virol J, 8, 517 (2011)
- [18] Davies B, Wang X, Dvorak CM, Marthaler D, Murtaugh MP: Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster, Virus Res, 217, 32-37 (2016)

Genotypic Change of Porcine Circovirus Type 2 Detected in Healthy Pigs in Japan from 2009 to 2016

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

Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes a variety of diseases in pigs, collectively known as porcine circovirus-associated diseases (PCVAD). PCV2d is one of the five genotypes (a to e) and can be divided into two clusters, PCV2d-1 and PCV2d-2, the latter of which includes a mutant strain of PCV2 (mPCV2) identified in the U.S. mPCV2 proliferates at a high rate in pigs and is excreted from infected pigs more profusely than other PCV2 genotypes. Consequently, PCV2d-2 has become the predominant cluster worldwide. We previously reported three new PCV2 strains detected in serum samples from healthy pigs in Japan in 2015. These strains are closely related to mPCV2 and belong to the same PCV2d-2 cluster. To investigate the prevalence of PCV2d-2 strains in Japan, the incidence of PCV2 in rural areas and genotypic changes over time were evaluated using PCR and nucleotide sequence analysis of serum samples from healthy pigs collected from 19 different farms in 6 prefectures from 2009 to 2016. The results showed that PCV2d-2 strains have existed in Japan since at least 2012 and are now the predominant strains distributed among Japanese pig farms. Moreover, the PCV2e strain was detected for the first time in Japan in 2016. The genotypic change of PCV2d-2 over time and the date the strain was first detected in Japan were almost identical to those in the U.S. The data could provide useful information about the spread of PCV2 into Japan. — Key words : genotype, porcine circovirus type 2, PCV2d-2, PCV2e.

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

1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara-shi, 252-5201, Japan

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

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 481 ~ 486 (2019)