1988年に確認された豚サーコウイルス2感染症

長谷川昌俊[†] 塩谷治彦 湯山祐子 大谷利之

神尾泰宏 丸山 崇 辻岡 孝

静岡県中部家畜保健衛生所 (〒426-0066 藤枝市青葉町1-2-45)

(2000年11月24日受付・2001年6月7日受理)

要 約

静岡県内への豚サーコウイルス2 (PCV-2) の侵入時期を調べる目的で、1981～1998年に病性鑑定を実施した県内38農場の豚180頭のホルマリン固定パラフィン包埋リンパ節からPCRによりPCV-2遺伝子の検出を試みた。その結果、21農場に由来する58頭の方法に、PCV-2特異遺伝子断片の増幅が認められ、そのうち、最も古い材料は1988年5月に一貫経営のA農場から採取したものであった。この農場では、1988年2～6月に、顕著な消瘦を示して死亡した発育不良豚が合計39頭認められ、それらの病理学的所見は離乳後全身性消耗症候群 (PMWS) を強く疑わせるものであった。このことから、わが国では、1988年にはすでにPCV-2が関与したPMWSの発生があったものと考えられる。——キーワード：ホルマリン固定パラフィン包埋リンパ節、豚サーコウイルス2、離乳後全身性消耗症候群。

日獣会誌 54, 757～760 (2001)

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のウイルスで、1974年に株化豚腎 (PK-15) 細胞の汚染ウイルスとして発見されたが、豚への病原性はないと考えられている [15]。一方、子豚で増体重の著しい減少、呼吸器症状、黄疸などの症状を示す豚の離乳後全身性消耗症候群 (post-weaning multisystemic wasting syndrome; PMWS) が報告され、血清学的にも遺伝子学的にも従来の非病原性PCVとは異なるPCVが関与することが判明したことから、前者をPCV-1、PMWS関連の後者をPCV-2と呼ぶことになった [1, 11]。

PMWSは、おもに5～12週齢の子豚に発生し、臨床症状としては増体重の著しい減少、呼吸器症状、黄疸などの症状を示し、病理学的所見としては肉芽腫性間質性肺炎、リンパ節腫大、リンパ球性肉芽腫性肝炎、腎炎などがみられる疾病で、1991年にカナダで最初に報告された [2, 7]、その後、北米、欧州、アジアなど世界各地で発生が報告されている。日本では、Kuboら [10] およびOnukiら [12] の報告がある。また、Satoら [13] は抗PCV-1血清を用いた免疫組織化学的検索により、1990年にすでに国内でPCV-1の感染とPMWS類似疾病の発生があったことを報告している。しかし、PMWSの病因として疑われているPCV-2のわが国での回顧的調査はこれまで報告がない。

そこで、著者らは静岡県へのPCV-2の侵入時期を調べる目的で、病性鑑定を実施した豚のホルマリン固定パラフィン包埋組織を材料としてPCRを試み、PCV-2を確認するとともにPMWSを疑う症例を確認したので報告する。

材 料 お よ び 方 法

検査材料：1981年4月～1998年12月に病性鑑定を実施した静岡県内38農場の豚180頭のホルマリン固定パラフィン包埋リンパ節を用い、後述の方法によりPCV-2遺伝子の検索を実施した。また、PCV-2遺伝子断片が増幅された症例については、改めて病理組織学および免疫組織化学的検索を行い、PMWSとの関連を調べた。

脱パラフィン処理：5μmに薄切したパラフィン切片5枚を1.5μl容量のチューブ (エッペンドルフ、マイクロチューブ、Safe-Lock) に入れ、キシレンを1ml加え、42℃で20分間振盪後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を除去する操作を3回繰り返した。さらに、100%エチルアルコールを1ml加え、10分間静置後、15,000rpmで3分間遠心分離し、上清を除去する操作を3回繰り返した。

DNAの抽出：脱パラフィン処理を施した薄切組織にプロテナーゼK溶液 (0.6% SDS, 10nmol/l Tris-HCl

[†] 連絡責任者：長谷川昌俊 (静岡県中部家畜保健衛生所家畜検査課)

〒426-0066 藤枝市青葉町1-2-45 ☎054-635-2437 FAX 054-636-3171

(pH 8.0), 100nmol/l NaCl, 10nmol/l EDTA, 500 μ g/ml プロテナーゼK) を500 μ l 加え, 50℃で12時間以上振盪し [3, 8, 14, 16], 等量の飽和フェノール・クロロホルムを加え, 1分間振盪攪拌後, 15,000rpmで10分間遠心分離し, 上清を他のチューブに移す操作を2回繰り返した. 上清に対して等量のクロロホルムを加え, 30秒間振盪攪拌後, 15,000rpmで5分間遠心分離し, 上清を他のチューブに移す操作を2回繰り返した. 次に, 1/10量の3M酢酸ナトリウムを添加, さらに2.5倍量の100%エチルアルコールを加え, 1分間振盪攪拌し, -20℃で1時間静置後, 15,000rpmで10分間遠心分離した. 80%および70%エチルアルコールで洗浄後, TE溶液 (10mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA) に溶解した.

Polymerase Chain Reaction (PCR): Ellisら [5] により報告されているプライマー (5'-CGGATATTG-TAGTCCTGGTCG-3') を用い, 481bpの特異増幅産物が検出されたものを, PCV-2陽性と判定した (図1). すなわち, パラフィン切片から抽出したDNA試料2 μ l にPCR反応液 (10 $\times$ Ex Taq buffer 5 μ m, dNTP 5 μ l, Taq DNAポリメラーゼ0.25 μ m, プライマー3 μ l, 滅菌蒸留水33 μ l) を加え (最終液量50 μ l), DNA増幅装置^{a)} で94℃・1分間, 61℃・1分間, 72℃・1分間の増幅サイクルを40回行った. 0.05 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により, 増幅されたPCR産物のバンドを検出した. 分子

量マーカーは市販の100bp DNA Ladderを使用した.

免疫組織化学的検索: 抗PCV-2血清はPMWS野外症例の免疫グロブリンをビオチン化したものを32倍に希釈して, 抗豚繁殖・呼吸障害症候群 (porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) ウイルス血清は家兔免疫血清を4,096倍に希釈して用いた.

成 績

PCRによるPCV-2遺伝子の検出: 1981年4月～1998年12月に病性鑑定を実施した38農場の豚180頭のうち, 21農場58頭のリンパ節組織切片に特異的なPCV-2遺伝子断片が増幅された (表1). 増幅遺伝子断片は, 塩基配列を調べた結果, 既報 [6] のPCV-2と98%の相同性を持ち, PCV-2特異増幅産物であることが確認された. このうち, 最も古い症例は, 1988年5月に病性鑑定を実施したもので, 表1の3頭 (*印) は同

表1 PCRによるPCV-2検出材料の年次別分布

年	検査材料		PCV-2 陽性	
	農場数	検体数	農場数	検体数
1981	1	2	0	0
1982	2	5	0	0
1985	1	3	0	0
1988	3	25	1	2*
1989	2	12	1	1*
1990	3	5	0	0
1991	2	4	0	0
1992	2	2	0	0
1993	3	11	3	8
1994	13	25	5	9
1995	7	15	4	8
1996	8	16	5	9
1997	9	13	4	5
1998	14	42	6	16
計	70 (38)	180	29 (21)	58

(): 重複しない農場数.

*: A農場.

表2 1988年にPCV-2の関与が認められたA農場の発育不良豚発生状況

年月	発生頭数	死亡頭数
1988. 2	16	16
3	25	8
4	10	7
5	6	4
6	21	4
7	不明	1
8	不明	4
9	不明	5
10	不明	4
11	1	0
計	79	53

図1 PCV-2遺伝子の検出.

レーンM: 分子量マーカー; レーン1: PK15細胞; レーン2: 1988年5月に病性鑑定を実施したA農場の豚のリンパ節パラフィン切片.

a) 宝酒造, 東京.

表3 A農場発育不良豚の剖検および組織所見

臓器	剖検所見	頭数*	組織所見	頭数
リンパ節	腫大	13	リンパ球数の減少	21
			肉芽腫性炎	8
腎臓	白色斑	10	肉芽腫性炎	10
	くさび形白斑	5	間質性リンパ球浸潤	17
			慢性梗塞	5
心臓	肥大	6		
	心嚢水増量	3		
脾臓			肉芽腫性炎	14
			中心動脈変性	15
			ろ胞萎縮	15
肝臓	黄疸	1	壊死	4

*：23頭検査

図2 1988年5月に病性鑑定を実施したA農場の扁桃における細胞質内封入体 (HE染色 ×400)。

一農場に由来する豚であった。

PCV-2 遺伝子検出症例の病理組織学的検索：最も古いPCV-2の感染が確認されたA農場は、静岡県西部の種雌豚75頭飼育の一貫経営農場であった。当時の病性鑑定記録に基づく発生の経過を表2に示した。1988年2月に50～60日齢の16頭が、元気消失、体毛の逆立などを呈し、1～2日の経過で呼吸促迫、鼻汁、目やに、発咳などを呈して、数日以内に全頭が死亡した（致死率100%）。また、同年3～6月に、40日齢の62頭が、体毛の逆立、削瘦、蒼白などを呈し、1～2週間後に、23頭が死亡した（致死率14.3%）。同年7月以降は、発症豚の死亡率は低下したが、体重50kg程度で発育の顕著な停止が認められた。

病理学的検索を行ったA農場の23頭のおもな剖検ならびに組織所見を表3に示した。剖検所見では、23例中リンパ節の腫大を示すものが13例、全面に粟粒大～大豆大の白色斑を呈する腎臓が10例、くさび形白斑を呈する腎臓が5例認められた。また、1例に黄疸がみられた。

組織所見では全身性の肉芽腫性炎を特徴としていた。また、1988年にPCRによりPCV-2遺伝子が検出された2例のうち1例には、扁桃およびリンパ節の単核性食細胞内にPMWSの特徴病変の一つであるブドウ房状の好塩基性細胞質内封入体が確認され（図2）、免疫組織化学的検索でPCV-2抗原が観察された。肉芽腫性炎は、23例中腎臓では間質性に10例、脾臓ではリンパ球中心性に14例、リンパ節ではリンパ洞付近に8例観察された。そのほかのリンパ節ではリンパ球の減少が21例、腎臓では間質性リンパ球浸潤が17例、脾臓では中心動脈周囲の結合組織増生およびリンパ球の萎縮各15例、肝臓では肝細胞の空胞変性、重度の壊死が4例認められた。

なお、1988年当時のA農場における症例の免疫組織化学的検索では、PRRSウイルス抗原は検出されなかった。また、肉芽腫性炎が重度であった症例についてのギムザ、PAS、チール・ネールゼンおよびワルチン・スタリー染色による原虫、真菌、抗酸菌およびブルセラ菌の検出結果は、いずれも陰性であった。また、主要臓器の一般細菌（好気性、嫌気性）、抗酸菌、ブルセラ菌および真菌培養では有意な菌は分離されなかった。

考 察

病性鑑定を実施後、保存されていたパラフィン切片を材料として、PCRによりPCV-2の検索を実施したところ、いずれも同一農場で、1988年に2症例および1989年に1症例からPCV-2が確認された。また、1988年の2症例の扁桃およびリンパ節には、PCV-2によって形成された細胞質内封入体が単核性食細胞に確認され、免疫組織化学的検索でPCV-2抗原が検出された。さらに、この症例の臨床および病理学的検査から本症例はPMWSであったことが推察された。今回の成績は、日本におけるPCV-2の最も古い感染例であるとともに、最も古いPMWSの発生と考えられ、わが国におけるPCV-2の浸潤とPMWSの発生時期を論議するうえできわめて重要な知見であると考えられる。

Kennedyら[9]は、初乳未接種豚を用いて、PCV-2および豚パルボウイルス（PPV）の感染実験を行い、肝臓、腎臓などの肉芽腫性病変を報告しており、今回の症例の肉芽腫性炎は、PCV-2によるものと考えられた。また、Ellisら[4]は、ノトバイオードの豚を用いた感染実験の結果、PCV-2の単独感染では臨床症状を示さなかったが、PCV-2とPPVの同時感染によりPMWSの再現に成功している。これらの報告などより、PMWSの発生は、PCV-2単独ではなくPPVをはじめとする他の微生物との複合感染による可能性が示唆されている。今回のPMWSの発生はPCV-2の感染とともに、PMWSの好発時期である離乳豚の飼育密度が著しく高

い状況であったことから、密飼などによるストレスが誘因になっていたものと考えられた。

パラフィン切片を用いたPCRは、長期間のホルマリン固定によるDNAの断片化、Taqポリメラーゼに対する阻害物質の存在などにより、新鮮組織に比べ検出率が低下した可能性も考えられる [8]。しかし、臨床、剖検および病理組織学的所見などの背景をもとに、病因学的な回顧的調査を行う場合にきわめて有用な方法であると考える。

本稿を終えるにあたり免疫組織化学的検索を実施していただいた農林水産省家畜衛生試験場病態研究部感染病理研究室播谷亮博士、シーケンスを実施していただいたウイルス病研究部病原ウイルス研究室加来義浩氏に深謝する。

引用文献

- [1] Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Hardinf J, Espuna E, Botner A, Charreyre C : Vet Rec, 142, 467-468 (1998)
- [2] Ckark EG : Proc Am Assoc Swine Pract, 28, 499-501 (1997)
- [3] 土橋 洋, 福島純一, 梶村晴彦 : 検査と技術, 23, 301-307 (1995)
- [4] Ellis J, Bratanich A, Clark EG, Allan G, Meehan B, Haines DM, Harding J, West KH, Krakowka S, Konoby C, Hassard L, Martin K, McNeilly F : J Vet Diagn Invest, 12, 21-27 (2000)
- [5] Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Haines D, Bratanich A, Clark E, Allan G, Konoby C, Hassard L, Meehan B, Martin K, Harding J, Kennedy S, McNeilly F : J Vet Diagn Invest, 11, 3-14 (1999)
- [6] Hamel AL, Lin LL, Nayar GP : J Virol, 72, 5262-5267 (1998)
- [7] Harding JCS : Proc Am Assoc Swine Pract, 282, 503 (1997)
- [8] 林 伸信 : 実験医学, 8, 89-97 (1990)
- [9] Kennedy S, Mofectt D, McNeilly F, Meehan B, Ellis J, Krakowka S, Allan GM : J Comp Pathol, 122, 9-24 (2000)
- [10] Kubo M : All About Swine, 15, 31-38 (1999)
- [11] Meehan B, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst V, Ellis J, Hassard L, Clark E, Haines M, Allan G : J Gen Virol, 79, 2171-2179 (1998)
- [12] Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H : J Vet Med Sci, 61, 1119-1123 (1999)
- [13] Sato K, Shibahara T, Ishikawa Y, Kondo H, Kubo M, Kadota K : J Vet Med Sci, 62, 627-633 (2000)
- [14] 島田信子, 戸田年総 : 遺伝子操作技術マニュアル, 日本臨床科学会関東支部遺伝子分科会, 第1版, 36-49, 医学書院, 東京 (1995)
- [15] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G : Zbl Bart Mikrobiol Hyg, A226, 153-167 (1974)
- [16] 宇原 久, 向井 清, 佐藤雄一, 赤尾一郎, 古谷修一郎 : 実験医学, 8, 84-88 (1990)

Pigs Confirmed to be Infected with Porcine Circovirus 2 as Early as 1988

Masatoshi HASEGAWA[†], Haruhiko SHIOYA, Yuko YUYAMA, Toshiyuki OTANI,
Yasuhiro KAMIO, Takashi MARUYAMA and Takashi TSUJIOKA

*Shizuoka Chubu Livestock Health & Hygiene Service Center, 1-2-45 Aoba-cho,
Fujieda 426-0066, Japan*

SUMMARY

To determine the time at which infection with the porcine circovirus 2 (PCV-2) invaded Shizuoka Prefecture, we performed retrospective detection of the PCV-2 genome on PCR from formalin-fixed, paraffin-embedded lymphonodi from 180 pigs on 38 farms. The specimens were collected for intra-prefectural disease diagnosis from 1981 to 1998. The specific PCV-2 genome fragment was amplified from the lymphonodi of 58 pigs on 21 farms. The earliest PCR-positive cases occurred in May 1988 on a farrow-to-finishing farm (Farm A), where a chronic wasting disease caused remarkable loss of growing pigs. Reexamination of samples from Farm A collected during the period from February to June 1988 showed strong histopathological evidence characterizing the disease entity as the postweaning, multisystemic wasting syndrome (PMWS). We therefore concluded that, as early as 1988, PMWS caused by the PCV-2 already existed in Japan. — Key words : formalin-fixed paraffin-embedded lymphonodi, porcine circovirus 2, postweaning multisystemic wasting syndrome.

[†] Correspondence to : Masatoshi HASEGAWA (Shizuoka Chubu Livestock Health & Hygiene Service Center)

1-2-45 Aoba-cho, Fujieda 426-0066, Japan TEL 054-635-2437 FAX 054-636-3171

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 54, 757 ~ 760 (2001)