PCRによるホルマリン固定パラフィン包埋組織 から豚サーコウイルス遺伝子の検出

今井邦俊^{1)†} 佐藤研志²⁾ 芝原友幸¹⁾ 門田耕一¹⁾

1) 農林水産省家畜衛生試験場北海道支場 (〒060-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

2) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-6)

(2000年4月17日受付・2000年9月21日受理)

要 約

1993～1999年に北海道の3養豚場(B, C, D)において、病理学的に豚サーコウイルス(PCV)感染を伴う発育不良豚と診断された豚のパラフィン包埋組織材料(35検体)から、PCRによりPCV遺伝子の検出を試みた。検出率が高かったのはN1fとN2rプライマー組であり(85.7%), PCR産物にPCV-1には存在しない制限酵素(*Ava* II, *Nsp* I)切断部位が認められた。また、C農場の7検体は*Sac* Iにより切断されなかったが、D農場の4検体は切断された。B農場では、*Sac* I切断部位を有する15検体と切断されない4検体が混在していた。この結果は、北海道には制限酵素切断パターンで識別できるPCV-2が少なくとも2タイプ存在することを示唆している。

——キーワード：パラフィン包埋組織, PCR, 豚サーコウイルス。

----- 日獣会誌 54, 260～264 (2001)

環状一本鎖DNAを有する小型球形ウイルスである豚サーコウイルス (porcine circovirus : PCV) [22] は、1974年、Tischerら [23] によって豚腎株化細胞 (PK-15細胞) の迷入ウイルスとして初めて発見された。このPCVは豚に対して非病原性で、飼育豚に広く不顕性感染していることが報告されている [5, 12, 21]。一方、1991年、カナダにおいて増体重の著しい減少、呼吸器症状、貧血、黄疸などを特徴とする豚の離乳後全身性消耗症候群 (postweaning multisystemic wasting syndrome : PMWS) が報告された [4, 11]。その後アメリカ合衆国、ヨーロッパ諸国でもPMWSの発生が認められ、罹患豚から従来のPCVとは抗原的、遺伝学的性状の異なるPCVが分離された。このPCVは豚に対して実験的に病原性を示すことからPMWSの発生に関与することが示唆されている [1, 2, 7, 8]。また、Allenら [3] は、従来の非病原性PCVをPCV-1、新たに分離された病原性PCVをPCV-2と呼称することを提案している。

わが国でも1996年からPMWS類似疾病が報告されている [14]。また、諸外国で分離されているPCV-2と同様のウイルスが検出されている [17, 24]。すでに外国分離株のPCV-1とPCV-2の全塩基配列が報告されているが、相同性は高くない [10, 15, 16]。したがって、制限酵素切断部位も大きく異なっていることから、遺伝学的にも両者の識別は可能である。特に、polymerase

chain reaction (PCR) によりウイルス遺伝子の特定の領域を増幅し、その領域における制限酵素切断パターンの違いに基づいて両型を識別する方法は、迅速で簡便な診断法の一つと思われる。

1999年、北海道においてもPMWSが疑われる病豚の発生が認められたが、PCVの浸潤状況など詳細な調査はなされていない。Satoら [18] は、1985～1999年に病性鑑定に供された豚のPCV感染状況を免疫組織化学および病理組織学的に調べた結果、1990年以降に認められたPMWSを伴う症例にPCVが関与していることを示唆した。

ウイルス感染症の診断に際して、ウイルス分離に必要な生材料の入手が時として困難なこともあるので、Shibataら [19] は、40年前のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片 (パラフィン標本) から、PCRによりパピローマウイルス遺伝子を検出した。PCRによるパラフィン標本からのウイルス遺伝子の検出は、病理組織学的検査を同時に行うことができるために、ウイルス感染症のより確実に迅速な診断法となりうる。また、過去に保存された病理標本が広範囲に利用できるために、いわゆる回顧的疫学研究にも威力を発揮する。

今回、北海道の養豚場において1993～1999年に病理学的にPCV感染を認めたPMWS症例のうち、ウイルス分離に必要な生材料を入手できなかったものについて、

† 連絡責任者：今井邦俊 (農林水産省家畜衛生試験場北海道支場)

〒060-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4 ☎011-851-2132 FAX 011-853-0767

PCRによりパラフィン標本からPCV遺伝子の検出を試み、PCV感染の回顧的、疫学的考察を行った。

材 料 お よ び 方 法

材料：1993～1999年に北海道の同一管内の3養豚場（B, C, D）において、PCV感染を伴うPMWSと病理学的に診断された合計35例の40～80日齢豚（表1）について、個体別にリンパ節（気管支、腸管膜、肝）、脾臓あるいは扁桃腺のいずれかのパラフィン標本を用いた。PCV感染は、リンパ組織（リンパ節、パイエル板、扁桃腺、脾臓）における病変および封入体の確認、免疫組織化学的検査によるPCV抗原の検出、電子顕微鏡によるPCV粒子の観察により確認した[18]。また、陰性対照として健康豚4頭の気管支リンパ節のパラフィン標本を用いた。

DNA抽出：パラフィン標本（1検体当たり厚さ5μmの切片を4枚使用）からImaiら[13]の方法に従ってDNAを抽出した。PCV-1 DNAは、PCV-1が持続感染している豚腎由来CPK細胞[6]から抽出した。

PCR：PCRによるPCV遺伝子の検出には、Hamelら[10]がPCVの塩基配列の決定に使用したプライマーのうち、上流プライマーとしてN1f（AGCG-CACTTCGGCAGCGGC）、N3f（GTGAAGTG-GTATTTGGGTGCCCGCTG）、N5f（TGGCC-CGCAGTATTCTGATTACCAGCAATC）、4F（GGAA-GACTGCTGGAGAACAATCCACGG）、および7F

（TGGGGGTGAAGTACCTGGAGTGG）を用いた。また、下流プライマーとしてN2r（TATCTTTATTCT-GCTGATCAGTTCCTTTGGC）、N4r（ATTGCTG-GAATCAAAATACTGCGGGCC）、N6r（CCACTCC-CGTTACTTCACACCCAAACC）、9R（CACTGACGCT-GCCGAGGTGC）、15R（CCACTCCAGGTACTTCAC-CCCCA）、および16R（GTTACCGCAGAAGAAG-GACCCGC）を用いた。

PCRにおけるDNA合成酵素には、REDTaq DNA polymerase^{a)}を用いた。PCRの反応条件は、94℃・30秒、58℃（N1fとN4rおよびN3rとN4rのプライマー組）あるいは60℃（その他のプライマー組）・30秒および72℃・45秒を1サイクルとして40回繰り返した。PCR産物の検出は、2%アガロースを用いて電気泳動後、エチジウムブロマイドにより染色して行った。

制限酵素解析：Hamelら[10]が報告したPCV-1とPCV-2の塩基配列から、PCV-1のN1fとN2rのプライマー組による遺伝子増幅部位には制限酵素の認識部位がなく、PCV-2のみに存在するAva II、Nsp IおよびSac Iを用い、その切断パターンを比較した。

成 績

パラフィン標本からのPCV遺伝子の検出結果を表2に示した。プライマーの組によって検出率が大きく異なり、N1fとN4rおよび7Fと9Rの組の検出率はいずれも5.7%（2/35）で最も低かった。これに反して、最も高い検出率を示したプライマーの組み合わせは、N1fとN2rの組であり（図1）、全体では85.7%（30/35）の検出率を示した。一方、健康豚のパラフィン標本はPCR陰性であった。養豚場ごとの検出率では、B農場は79.1%（19/24）、CおよびD農場はいずれも100%（7/7, 4/4）を示した。

次に、PCR陽性を示した検体が、PCV-1あるいはPCV-2のどちらに由来するのかを明らかにするために、N1fとN2rのプライマー組によって増幅されたPCR産物の制限酵素切断パターンを比較した（表3、図2）。

表1 豚サーコウイルス遺伝子の検出に用いた病豚のパラフィン標本の由来

検 査 年	供 試 豚 数		
	B養豚場	C養豚場	D養豚場
1993	3	0	0
1994	6	0	0
1995	0	1	0
1996	3	1	0
1997	3	0	0
1998	9	0	0
1999	0	5	4
合 計	24	7	4

表2 7組のプライマー組を用いたPCRによるパラフィン標本からの豚サーコウイルス遺伝子の検出

農場	プ ラ イ マ ー 組						
	N1f—N2r	N1f—N4r	N3f—N4r	N5f—N6r	4F—15R	7F—9R	7F—16R
B	19/24 ¹⁾ (79.1) ²⁾	1/24 (4.1)	8/24 (33.3)	15/24 (62.5)	8/24 (33.3)	1/24 (4.1)	3/24 (12.5)
C	7/7 (100)	0/7 (0)	7/7 (100)	7/7 (100)	5/7 (71.4)	1/7 (14.2)	0/7 (0)
D	4/4 (100)	1/4 (25.0)	1/4 (25.0)	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)	0/4 (0)	1/4 (25.0)
合計	30/35 (85.7)	2/35 (5.7)	16/35 (45.7)	25/35 (71.4)	14/35 (40.0)	2/35 (5.7)	4/35 (11.4)

1) 遺伝子検出検体数/検査検体数。

2) 検出率 (%)。

a) Sigma, U.S.A.

図1 N1fとN2rプライマー組を用いたPCRによるパラフィン標本からの豚サーコウイルス遺伝子の検出。
M：分子量マーカー（上から1Kbp, 750bp, 500bp, 300bp, 150b）；検体Nos. 1～6, 9～19, 25, 28～33はB農場由来材料；検体Nos. 7, 8, 20, 21, 26, 27, 34はC農場由来材料；検体Nos. 22～24, 35はD農場由来材料。

表3 N1fとN2rプライマー組によって増幅されたPCR産物の制限酵素による切断¹⁾

農場	<i>Ava</i> II ²⁾	<i>Nsp</i> I	<i>Sac</i> I
B	19/19 ³⁾	19/19	15/19
C	7/7	7/7	0/7
D	4/4	4/4	4/4
合計	30/30	30/30	19/30

- 1) PCV-1 由来 PCR 産物は、制限酵素により切断されなかった。
- 2) 制限酵素。
- 3) 切断検体数/検査検体数。

PCV-1 由来 PCR 産物は、いずれの制限酵素（*Ava* II, *Nsp* I, *Sac* I）でも切断されなかった。一方、検体由来 PCR 産物（30 検体）では、全例において *Ava* II および *Nsp* I の切断部位が認められた。しかし、*Sac* I は農場ごとに異なる切断パターンを示した。D 農場の 4 検体は *Sac* I によって切断されたが（*Sac* I/+）、C 農場の 7 検体では *Sac* I の認識部位が認められなかった（*Sac* I/-）。B 農場の検体では、1993 年と 1994 年に PCR 陽性を示した 5 検体中 4 検体が *Sac* I/- の PCV であった。しかし、1996 年以降に PCR 陽性を示した 14 検体のすべてが *Sac* I/+ の PCV であった。

考 察

今回著者らは、Hamel ら [10] が報告した 7 組のプライマーを用いて、PMWS と病理学的に診断された症

図2 PCR産物の制限酵素（*Ava* II, *Sac* I）切断像。

M：分子量マーカー；N：PCV-1, 検体No. 1 および検体No. 16 由来のそれぞれの PCR 産物（制限酵素未処理）；Av：*Ava* II；Sa：*Sac* I。

例のパラフィン標本から PCV-2 遺伝子の検出を試みた。検体の全例から遺伝子が検出されたプライマー組はなかったが、最も高い検出率が得られたのは N1f と N2r の組み合わせであった。陰性材料のほとんどは 6～7 年前に処理された古いものであった。組織の長期間のホルマリン固定は DNA を変性させ、PCR による遺伝子の検出率に影響を与えるので、よい結果を得るにはホルマリンの固定時間は、通常 3 日以内が望ましいといわれている [20]。今回の供試材料の固定にもホルマリンが使用されたが、固定時間は不明であったので、このことが直接の原因であるとは断定できなかった。

今回の成績では、Onuki ら [17] が用いた N1f と N4r のプライマー組による PMWS 症例からの PCV-2 遺伝子の検出率は非常に低かった（5.7%）。この理由は不明であるが、一般的に、新鮮材料と比べるとホルマリン固定組織から抽出される DNA を鋳型にした場合の増幅効率は低いため、増幅サイズを短く設定したほうが良好な結果が得られるといわれている（最大 600bp）[20]。N1f と N4r のプライマー組で増幅される予想サイズが約 800bp であったために、増幅しえなかった可能性が考えられた。また、Engels [9] が開発した遺伝子解析ソフトを用いて調べたところ、N1f と N4r の組み合わせではセルフアニーリングによりプライマー同士が 2 量体を形成する可能性があるために、増幅効率に悪影響を与えたかもしれない。少なくともパラフィン標本からの PCV 遺伝子の検出には、このプライマー組の使用は避けた方がよいと思われた。Hamel ら [10] のプライマーを利用してパラフィン標本から PCV 遺伝子の検出を試みる

場合には、N1rとN2rのプライマー組を使用して遺伝子を増幅し、*Ava* IIもしくは*Nsp* Iの切断パターンでPCV-1と識別する方法が効率的であった。

これまでわが国のPCV-2に関する報告では、諸外国の株との明らかな異同は見いだされていない[17, 24]。今回、*Sac* Iの切断部位のない検体が存在したことから、少なくとも日本においてはHamelら[10]の報告したPCV-2とは異なるウイルス株の存在が明らかにされた。C養豚場では*Sac* I-のPCV、D養豚場では*Sac* I/+のPCVのみが検出されたことから、これらの養豚場内で同じタイプのPCVが感染を繰り返していることが示唆された。一方、B養豚場では1993～1994年には*Sac* I-のPCVが主体であり、1996～1998年には*Sac* I/+のPCVのみが検出された。しかし、この株が*Sac* I-のPCVの変異したものなのか、外部から侵入したものなのかは不明であった。Satoら[18]は保存されていた病理組織標本を調べ、1990年のPMWSを伴う症例にPCVが感染していたことを明らかにした。このことはわが国においても、諸外国とほぼ同時期にPCVが存在していたことを示している。現在、この検体についても解析を試みている。今後、各機関に保存されているパラフィン標本中のPCV遺伝子の回顧的な解析を行うことにより、多くの疫学的知見が得られるかもしれない。

本稿を終えるにあたり、技術的支援をいただいた家畜衛生試験場北海道支場石川義春氏、石原涼子氏に深謝する。

引用文献

- [1] Allan GM, Kennedy S, McNeilly F, Foster JC, Ellis JA, Krakowka SJ, Meehan BM, Adair BM : J Comp Pathol, 121, 1-11 (1999)
- [2] Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Draft B, Clark EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM : J Vet Diagn Invest, 10, 3-10 (1998)
- [3] Allan G, Meehan B, Todd D, Kennedy S, McNeilly F, Ellis J, Clark EG, Harding J, Espuna E, Botner A, Charreyre C : Vet Rec, 142, 467-468 (1998)
- [4] Clark EG : Proc Am Assoc Swine Pract, 28, 499-501 (1997)
- [5] Dulac, GC, Afshar, A : Can J Vet Res, 53, 431-433 (1989)
- [6] Edwards S, Sands JJ : Vet Rec, 134, 680-681 (1994)
- [7] Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D : Can Vet J, 39, 44-51 (1998)
- [8] Ellis J, Krakowka S, Lairmore M, Hines 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)
- [9] Engels WR : Trends Biochem Sci, 18, 448-450 (1993)
- [10] Hamel AL, Lin LL, Nayar GP : J Virol, 72, 5262-5267 (1998)
- [11] Harding JC : Proc Am Assoc Swine Pract, 28, 503 (1997)
- [12] Hines RK, Lukert D : Swine Health Prod, 3, 71-73 (1995)
- [13] Imai K, Mase M, Yamaguchi S, Yuasa N, Nakamura K : Res Vet Sci, 64, 205-208 (1998)
- [14] 久保正法 : 臨床獣医, 17, 28-33 (1999)
- [15] Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, Hassard LE, Clark EG, Haines DM, Allan GM : J Gen Virol, 79, 2171-2179 (1998)
- [16] Morozov I, Sirinarumitr T, Sorden SD, Halbur PG, Morgan MK, Yoon KJ, Paul PS : J Clin Microbiol, 36, 2535-2541 (1998)
- [17] Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H : J Vet Med Sci, 61, 1119-1123 (1999)
- [18] Sato K, Shibahara T, Ishikawa Y, Kondo H, Kubo M, Kadota K : J Vet Med Sci, 62, 627-633 (2000)
- [19] Shibata D, Martin WJ, Arnheim N : Cancer Res, 48, 4564-4566 (1988)
- [20] 進藤正信, 樋田京子, 船岡孝誠, 藤永 薫 : 蛋白質核酸酵素, 41, 463-468 (1996)
- [21] Tischer I, Bode L, Peters D, Pociuli S, Germann B : Arch Virol, 140, 737-743 (1995)
- [22] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W, Koch MA : Nature (Lond.), 295, 64-66 (1982)
- [23] Tischer I, Rasch R, Tochtermann G : Zentral Bakteriologie, I Abt Orig A, 226, 153-167 (1974)
- [24] 坪川 正, 本田秀次 : 日獣会誌, 53, 144-147 (2000)

Detection of Porcine Circovirus Genes in Formalin-fixed, Paraffin-embedded
Tissues of Pigs by Polymerase Chain Reaction

Kunitoshi IMAI^{*†}, Kenshi SATO, Tomoyuki SHIBAHARA and Koichi KADOTA

^{*} Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health,
4 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-0045, Japan

SUMMARY

Porcine circovirus (PCV) genes were detected in formalin-fixed pig-tissue samples embedded in paraffin. The tissues came from pigs affected by the postweaning multisystemic wasting syndrome and demonstrating pathological evidence of PCV infection. The samples were collected between 1993 to 1998 from farms B, C, and D in Hokkaido, Japan, and were examined by polymerase chain reaction (PCR). Among primers, detection rate of the N1f and N2r primer set was highest. Of the 35 (85.7%) samples examined 30 were PCR positive. The cleavage sites recognized by restriction enzymes (*Ava* II and *Nsp* I) in these amplified PCR fragments were missing in the fragment amplified from PCV-1. The *Sac* I site was present in fragments amplified from the 4 samples from farm D but absent in the 7 fragments from farm C. Although 15 of the 19 samples from farm B had the *Sac* I site, the remaining 4 samples lacked it. These results suggest that at least 2 types of genetically different PCV-2 exist in Hokkaido.

— Key words : paraffin-embedded tissue, PCR, porcine circovirus.

[†] Correspondence to : Kunitoshi IMAI (Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health)
4 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo 062-0045, Japan
TEL 011-851-2132 FAX 011-853-0767

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 54, 260 ~ 264 (2001)

高単位総合ビタミン剤

リケビタン

高単位VA特殊調整 1000万IU 100mℓ

エクセレントA-1000 液

投与量 : 200cc

総合強壮・強肝内服液

パラゲンロ-ヤル

投与量 : 〈分娩時〉500cc

高単位ビタミンAD3E内服薬 1ℓ

ビタオイル 2液

投与量 : 〈分娩時〉200cc

マイシリン製剤20g

乾乳用 ホ-ミングDC

〈乾乳時〉1容器全量注入

マイシリン製剤20g

ホ-ミングMC

〈泌乳時の乳房炎治療〉1容器全量注入

ジクロキサシリン製剤20g

ホ-ミングDX

〈泌乳時の乳房炎治療〉1容器全量注入

理研畜産化薬株式会社

本社／東京都杉並区高円寺南2-41-12
工場／埼玉県川口市元郷4-1-8

TEL 048 (224) 8451 (代)

FAX 048 (224) 1079