

原著論文

豚サーコウイルス2型 (PCV2) 各遺伝子型 (PCV2a、PCV2b および PCV2d) を識別する
マルチプレックス PCR 法の開発

平 修、矢野(林)志佳、佐藤哲朗

(一般財団法人日本生物科学研究所)

Taira, O., Yano (Hayashi), S., Sato, T. (2025). Development of differential multiplex PCR
assay for porcine circovirus type 2 (PCV2) genotypes (PCV2a, PCV2b and PCV2d).*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 86, 15-19.

和文要約:

豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) は、ゲノム中の ORF 2 遺伝子配列に基づく遺伝子型分類が病原性やワクチン効果に影響を及ぼすことが知られており、国内には PCV2a、PCV2b、PCV2d などの主要な既存遺伝子型が報告されている。本研究では、PCR 法を用いて PCV2 の遺伝子型を迅速かつ簡便に識別できる手法を開発した。この方法は、増幅産物の分子量差に基づいて視認可能で、国内外の PCV2 流行状況のモニタリングに有用であると考えられる。また、既存の遺伝子型の流行動態を把握することで、これまでに報告されていない遺伝子型の出現や侵入を疑う事例において、重要な補助的手段として期待される。

キーワード：豚サーコウイルス 2 型、マルチプレックス PCR、検出方法

1. 緒言

豚サーコウイルス 2 型 (Porcine circovirus type 2 : PCV2) は、サーコウイルス科サーコウイルス属に属する非エンベロープの小型ウイルスで、直径約 17 nm のカプシドに包まれた約 1.8 kb の一本鎖環状 DNA をゲノムとして有する。PCV2 のゲノムには、2 つの主要なオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、ORF1 は DNA 複製に関与するレプリカーゼタンパク質を、ORF2 はカプシドタンパク質をコードすることが知られている⁷⁾。PCV2 は世界中に広く分布しており、日本においても 1998 年に発生した離乳後多臓器発育不良症候群 (PMWS) との関連が確認され、その後、PCV2 による多様な臨床症状を総称して豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) と呼ばれるようになった⁸⁾。PCVAD には、PMWS のみならず、豚皮膚炎腎症候

群 (PDNS)、呼吸器疾患、腸炎、繁殖障害などが含まれ、その病態は多岐にわたる⁵⁾。

ORF2 がコードするカプシドタンパク質は、ウイルスの免疫原性や宿主細胞への感染において重要な役割を担っているため、この遺伝子領域に基づく遺伝子型の分類は、病原性やワクチン効果に影響を及ぼす可能性があると考えられている¹⁰⁾。PCV2 は ORF2 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統解析により、これまでに 9 つの遺伝子型 (PCV2a、PCV2b、PCV2c、PCV2d、PCV2e、PCV2f、PCV2g、PCV2h、及び PCV2i) が報告されている^{1,2)}。遺伝子型の遷移は年代と地域によって異なり、2000 年代初頭までは PCV2a が主流であったが、北米やカナダにおいては 2004 年以降に PCV2b に置き換わった¹¹⁾。さらに、米国で 2012 年に PCV2d が報告されて以降、欧州やアジア諸国においても同一の遺伝子型への転換が報告されている⁴⁾。日本では各国の動きと同様に PCV2a が流行株として定着していたが、2006 年以降 PCV2b の流行が確認されており、近年では PCV2d の存在が報告されている^{2,8)}。さらに PCV2d は、PCV2d-1 および PCV2d-2 の 2 つのサブグループに分かれるという報告もあり、米国においては 2014 年以降に PCV2d-2 が主要な遺伝子型となり、南米やヨーロッパ、アジアでも同様の事例が報告されている^{9,13)}。

上述のように、PCV2 の型別には ORF2 の塩基配列解析を基にした分子系統解析が主に用いられてきたが、この方法にはバイオインフォマティクス技術を必要とし、分析に用いるデータセット選択や系統樹アルゴリズム選択等の課題が残されている。一方で、リアルタイム PCR を用いたマルチプレックス qPCR 法が開発されており、PCV2 の遺伝子型を迅速かつ効率的に識別することが可能となったが、この方法もコストや設

備、技術が求められることから、さらなる簡便化が望まれている¹²⁾。

本研究の目的は、塩基配列解析を行うことなく、従来型 PCR 法を用いて PCV2 の遺伝子型を簡便かつ迅速に分類する手法を開発することである。本報告では、PCV2 の主要な遺伝子型に特異的なプライマーを設計し、従来のリアルタイム PCR 法よりも簡便で、増幅産物の分子量差に基づいて視認可能な従来型 PCR 法を確立した。

2. 材料及び方法

DNA 抽出、塩基配列解析、分子系統解析：PCV2 ゲノムの検出は国内の農場において、PCVAD 症状を呈した豚から採材された血清あるいは臓器乳剤を直接用い、林・佐藤の方法に準じて分子系統解析を実施した³⁾。なお、本報告では近接結合法を用いて分子系統樹を作成した (図 1)。

プライマー設計：遺伝子型特異的プライマーは、国際塩基配列データベース (GenBank) に登録されている ORF2 遺伝子 (PCV2a; HM038034, HQ202949, KX828215, PCV2b; EU450638, KP768478, KY806003, PCV2d; KC515014, MF314285, KX960929) を MEGA version 11.0 ソフトウェアを用いてマルチプルアライメント後、遺伝子型配列の特徴に基づいて設計した (表 1)。設計したプライマーの特異性に関しては PCR シミュレーションソフトウェア Amplify version

4.0 を用いて確認した。なお、その他の PCV2 遺伝子型 (PCV2c, PCV2e, PCV2f, PCV2g, PCV2h, 及び PCV2i) 配列には特異的なプライマー結合しないことを確認した。

マルチプレックス PCR：PCR は Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (タカラバイオ (株)、滋賀県) を用いた。PCR 反応液は、2×Multiplex PCR Buffer：25 μ L、Multiplex PCR Enzyme Mix：0.25 μ L、プライマー：各 0.2 μ M、鋳型 DNA：5 μ L を混合し、蒸留水で総量 50 μ L に調整した。PCR 条件は、94℃ 30 秒の初期変性後、94℃ 30 秒、60℃ 10 秒、72℃ 30 秒の 3 ステップを 30 回繰り返した後に、最終伸長反応を 72℃ 5 分とした。PCR 産物の確認は、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実施した。なお、マルチプレックス PCR 確立に供した各遺伝子型の陽性参照株は分子系統解析で遺伝子型が明らかとなっている野外豚血清由来の PCV2a：336 株、PCV2b：1148-2 株、及び PCV2d：2632-1 株を用いた。

分子系統解析とマルチプレックス PCR の比較：分子系統解析によって各遺伝子型に分類された PCV2 より抽出した DNA をマルチプレックス PCR に供した。

特異性確認試験：特異性確認のために当所にて分離・保管された 4 種類の DNA ウイルス (豚サーコウイルス 1 型 (PCV1)、豚サーコウイルス 3 型 (PCV3)、豚ヘルペスウイルス (SuHV-1)、豚パルボウイルス

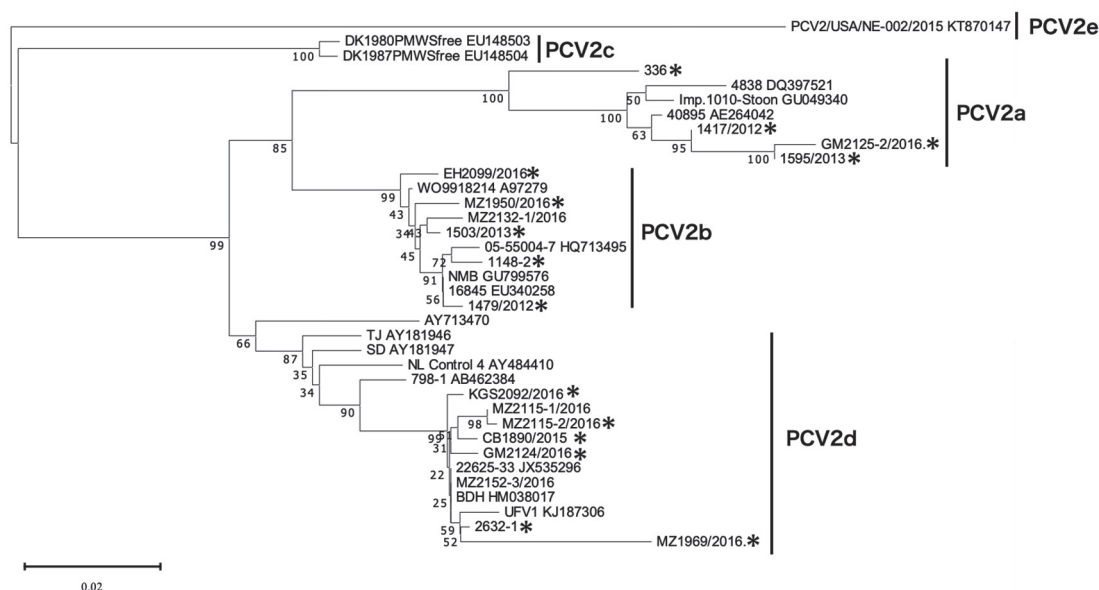


図 1 PCV2 ORF2 遺伝子領域の分子系統樹
本調査で解析・使用した株を*で示す。

表 1 PCV2 遺伝子型別マルチプレックス PCR 用プライマー

プライマー名	配列 (5' → 3')	増幅サイズ	増幅型別
FcPC	ATGACGTATCCAAGGAGGC		共通
RaPC-4	AAAGGGTATAGAGATTTTGTGGTC	279 bp	PCV2a
RbPC	ACGTGGTCTACATTTCCAGC	587 bp	PCV2b
RdPC	GGAGGGGGTTCTGACTGTGGTTT	198 bp	PCV2d

(PPV)) と 6 種類の RNA ウイルス (豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、豚流行性下痢ウイルス (PEDV)、豚伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)、豚 A 型ロタウイルス (PoRV-A)、ゲタウイルス (GETV)) より抽出した DNA および RNA をマルチプレックス PCR に供した。

検出感度確認試験：PCV2a：336株、PCV2b：1148-2株、及び PCV2d：2632-1株をマルチプレックス PCR に供した後、得られた PCR 産物を用いて検出感度確認試験を実施した。各々 10^5 コピー/ $5 \mu\text{L}$ に調整した DNA サンプルを10倍階段希釈 ($10^4 \sim 10^{-1}$ コピー/ 5

μL まで) し、マルチプレックス PCR の鋳型として使用した。

3. 成績及び考察

各遺伝子型の陽性参照株を用いたマルチプレックス PCR の結果を図 2 に示す。単一の検体を用いて増幅サイズを確認したところ、推定増幅分子量である PCV 2a：279 bp (レーン 1)、PCV2b：587 bp (レーン 2)、及び PCV2d：198 bp (レーン 3) 付近に明瞭な増幅バンドが確認された。また、これらの検体を混合した場合においても同位置に増幅バンドが確認でき (レーン 4)、それぞれアガロースゲル電気泳動において十分に識別

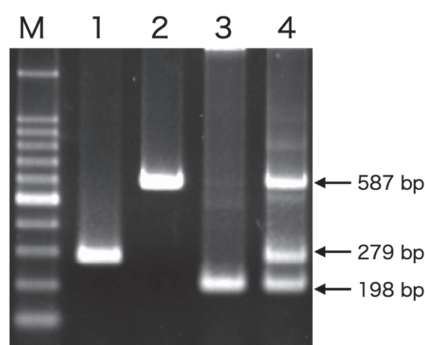


図 2 マルチプレックス PCR による PCV2 遺伝子型別電気泳動像

レーン M：100 bp DNA マーカ、レーン 1：PCV2a (336 株)、レーン 2：PCV2b (1148-2 株)、レーン 3：PCV2d (2632-1 株)、レーン 4：3 遺伝子型の混合検体

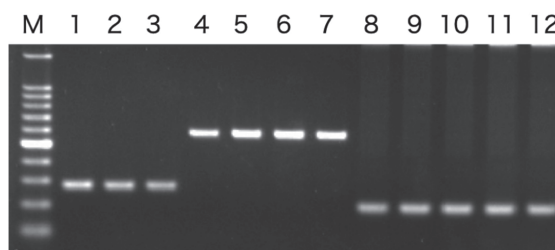


図 3 野外検体を用いたマルチプレックス PCR

レーン M：100 bp DNA マーカ、レーン 1～3：PCV2a (GM2125-2、1417、1595 株)、レーン 4～7：PCV2b (EH2099、MZ1950、MZ2132、1479 株)、レーン 8～12：PCV2d (KGS2092、MZ2115-2、CB1890、GM2124、MZ1969 株)。

が可能であった。

次に、本 PCR の型特異性を検証するために分子系統解析によって型別されている野外検体 (12検体) を用いてマルチプレックス PCR を実施した。その結果、図 3 に示すように PCV2a と分類された GM2125-2、1417、1595株は279 bp の位置に、PCV2b と分類された EH2099、MZ1950、MZ2132、1479株は587 bp の位置に、及び PCV2d と分類された KGS2092、MZ2115-2、CB1890、GM2124、MZ1969株は198 bp の位置に増幅バンドが確認された。また、特異性確認試験に供した全てのウイルスに対して、特異的増幅は認められなかった。さらに図には示さないが本 PCR の検出感度は PCV2a に対しては10コピー/5 μ L、PCV2b、PCV2d に対しては1コピー/5 μ L であった。

以上より、本研究で確立したマルチプレックス PCR 法は既存の分子系統解析と一致した型別が可能であると考えられた。

本マルチプレックス PCR の操作時間は T100サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA) を用いた場合、プログラム開始から終了までに要する時間が65分程度であり、電気泳動を含めても1時間30分以内に検出が可能であった。また、1検体当たりの費用についても340円程度と比較的安価であり、リアルタイム PCR などと比較して高価な機器を導入する必要もない。また、多検体処理の際にはあらかじめ試薬ミックス等を作製・分注しておくことにより迅速、簡便、かつ安価に PCV2遺伝子型のスクリーニングに供する事が出来ると考える。

国内には PCV2遺伝子型が4種類 (PCV2a、PCV2b、PCV2d、及び PCV2e) 存在し、諸外国の状況からも今後新規の遺伝子型が侵入する可能性は高いと予測される^{3,6)}。本研究で確立したマルチプレックス PCR 法は、PCV2の主要な遺伝子型 (PCV2a、PCV2b、PCV2d) を迅速かつ効率的に識別するため、農場での PCV2遺伝子型の動向を追跡するのに有用と考えられる。特に、既存遺伝子型の流行変遷を早期に把握するための効果的な手段として期待される。一方、本法では PCV2a、PCV2b、PCV2d 以外の遺伝子型を直接検出することはできないため、PCV2の存在を網羅的にスクリーニングした後に本法を用いることで、既存遺伝子型の流行状況を把握すると同時に、増幅できない検体については新たな遺伝子型の侵入を疑うケースとして検討する必要がある。PCV2は国際的な流行動向の影響を受けやすく、新たな遺伝子型が国内へ侵入するリスクが

高いため、遺伝子型の分布及び流行状況の長期的な観察は、PCV2関連疾病の制御及び防疫対策において重要である。

利益相反状態の有無

この研究は (一財) 日本生物科学研究所の研究資金により実施した。著者は開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) Franzo G, et al. (2018) Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. PLoS ONE, 13: e0208585.
- 2) Franzo G, et al. (2024) An updated phylogeography and population dynamics of porcine circovirus 2 genotypes: are they reaching an equilibrium? Front Microbiol, 15: 1500498.
- 3) 林志佳ら (2018) 近年の日本国内における豚サーコウイルス 2 型及び 3 型の分子疫学調査. 豚病会報, 72: 16-23.
- 4) Karuppannan AK, et al. (2017) Porcine circovirus type2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. Viruses, 9: 99.
- 5) Kawashima K, et al. (2007) Epidemiological investigation of the prevalence and features of post-weaning multisystemic wasting syndrome in Japan. J Vet Diag Invest, 19: 60-68.
- 6) 小池郁子ら (2019) 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. 日獣会誌, 72: 481-486.
- 7) Olvera A, et al. (2007) Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. Virology, 357: 175-185.
- 8) Onuki A, et al. (1999) Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. J Vet Med Sci, 61: 1119-1123.
- 9) Opriessnig T, et al. (2014) 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.
- 10) Opriessnig T, et al. (2017) A commercial porcine circovirus (PCV) type 2a-based vaccine reduces PCV2d viremia and shedding and prevents PCV2d transmission to naïve pigs under experi-

mental conditions. Vaccine, 35: 248-254.

- 11) Patterson AR, et al. (2010) Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). Anim Heal Res Rev, 11: 217-234.
- 12) Wang Y, et al. (2020) Development of a differential multiplex real-time PCR assay for porcine circovirus type 2 (PCV2) genotypes PCV2a, PCV2b and PCV2d. J Virol Methods, 286: 113971.
- 13) Xiao CT, et al. (2016) 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.