

資料

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

林 志佳、佐藤哲朗（一般財団法人日本生物科学研究所）

Hayashi, S. and Sato, T. (2018). Molecular epidemiological analysis of porcine circovirus type 2 and type 3 in Japan between 2015 and 2017.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 72, 16-23.

キーワード：豚サーコウイルス 2 型 (PCV2)、豚サーコウイルス 3 型 (PCV3)、分子疫学調査

1. はじめに

豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) とは、豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) が関与することで引き起こされる多様な病態の総称であり、豚のウイルス性感染症の中で世界的に経済的被害の大きな疾病のひとつである⁸⁾。PCVAD の代表的な病態には、離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS)、PCV2 関連呼吸器病 (PCV-LD)、PCV2 関連繁殖障害 (PCV-RD)、PCV2 関連腸炎 (PCV-ED) 及び豚皮膚炎腎症症候群 (PDNS) といった種々の病態が知られている⁸⁾。これまでに豚に感染するサーコウイルスとしては、1 型 (PCV1) 及び 2 型 (PCV2) の 2 種類が知られていたが、2016 年末より、3 型 (PCV3) が世界各地で報告され始めた¹⁶⁾。そこで本稿では、病性鑑定材料を基に実施した分子疫学的調査の結果から、近年の国内における PCV2 及び PCV3 浸潤状況に関して論じることとする。

2. PCV 2 に関する分子疫学的調査

2.1. 背景

PCV2 はサーコウイルス科サーコウイルス属に属し、約 1,770 塩基の 1 本鎖環状 DNA を有する。PCV2 のゲノムには、増殖に必須なレプリカーゼタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) 1 及び構造タンパク質であるカプシドタンパク質をコードする ORF2 の 2 つの遺伝子が存在している¹⁴⁾。ORF2 遺伝子は、PCV2 ゲノム上で最も多様性があることから、遺伝子型の分類に利用され、PCV2 はこれまでに PCV2a から PCV2e の 5 つの遺伝子型に分類されている^{3,23)}。2003 年以前の米国及びカナダでは、PCV2a の発生が多数を占めていたが、2004 年以降は、世界各国で PCV2b が主要な遺伝子型と変化した^{1,17)}。さらに、

米国において主要な遺伝子型が PCV2d に変化していることが報告された 2012 年以降、欧州やアジアなど他の地域でも同様の遺伝子型への転換が報告されている⁹⁾。なお、PCV2c は 2008 年にデンマークで 3 例及び 2015 年にブラジルで 1 例が報告されているのみで、その他の国・地域での報告はない^{6,23)}。また、2016 年に米国より新しい遺伝子型 PCV2e が報告された³⁾。

日本国内に浸潤している PCV2 は、制限酵素断片長多型解析によって、2 つの遺伝子型 (PCV2a 及び 2b) に分けられることが報告されていた²¹⁾。しかし、米国において PCV2d 遺伝子型への転換が報告され始めた 2012 年以降、国内の野外株の遺伝子型を検索した報告はない。そこで我々は、2015 年から 2016 年の国内の養豚農場において PCVAD 症状を呈した豚より検出された PCV2 について、分子疫学的解析を実施した。

2.2. 材料及び方法

PCR 法による PCV2 ゲノム検出には、2015 年から 2016 年に国内 47 農場において、PCVAD 症状を呈した豚 142 頭から採材された臓器の乳剤を用いた。プライマー設定は既報²⁴⁾に従い、PCV2 ORF2 遺伝子の塩基配列はダイレクトシーケンス法により決定し、系統樹解析に供した。分子系統樹は Hasegawa-Kishino-Yano モデルによる最尤法によって作成した。

2.3. 成績及び考察

PCVAD 症状を呈した 47 農場の 142 検体のうち、10 農場の 13 検体で PCV2 ゲノムが検出された。農場及び検体の PCV2 ゲノム陽性率は、それぞれ 21.3% 及び 9.2% であった。地域ごとの農場及び個体の PCV2 ゲノムの陽性率は、関東地方でそれぞれ 30.0% (3/10) 及び 6.8% (3/44)、中・四国地方で 20.0% (1/5) 及び 8.3% (1/12)、九州地方で 16.7% (6/32) 及び 9.7% (9/86) であった (表 1)。ORF2 遺伝子の配列が解析できた 10 農

表 1. 地域ごとの PCV2 ゲノムの陽性率

地域	農場		個体	
	陽性数/検査数	陽性率(%)	陽性数/検査数	陽性率(%)
関東	3/10	30.0	3/44	6.8
中・四国	1/5	20.0	1/12	8.3
九州	6/32	16.7	9/86	9.7
全国	10/47	21.3	13/142	9.2

場由来11検体について系統樹解析を行ったところ、1農場由来1検体がPCV2a、3農場由来3検体がPCV2b及び6農場由来7検体がPCV2dに分類された(図1)。本調査によって、国内においてもPCV2dが存在する事が明らかとなった。本調査で遺伝子型が明らかとなった野外株のうち、MZ1950/2016株(PCV2b)及びMZ2152-3/2016株(PCV2d)は同一農場、GM2124/2016株(PCV2d)及びGM2125/2016株(PCV2a)は関連グループ農場から検出されたことより、複数の遺伝子型の野外株が特定の地域・農場内で蔓延することが示唆された。また、陽性検体数は少ないものの、関東、中・四国、九州地域にまたがってPCV2dが存在し、今回検出された遺伝子型の中で最も多くを占めた。

現在、世界中で利用されているすべてのPCV2不活化ワクチンは、PCV2aを基に作製されていることから、

PCV2aから2bへの遺伝子型の変化は、ワクチン接種による選択圧が原因ではないかとの議論がなされており²³⁾、その後の2dへの転換には、カプシドタンパク質のエピトープ領域に対する宿主免疫反応による選択圧が関与している可能性も示唆されている¹²⁾。一方で、既存のワクチンはPCV2dに対しても、ウイルス血症の抑制及び病変の縮小に寄与することが報告されている¹⁵⁾。しかしながら、PCV2はDNAウイルスの中でも遺伝子の変異率が高いウイルスとされており⁵⁾、今後も種々の要因によって遺伝子型が変化する可能性がある。未知の遺伝子型のウイルスは病原性やワクチン株に対する交差反応性も変化する可能性が考えられるため、今後の遺伝子型の変化に関する動向に注目すべきである。

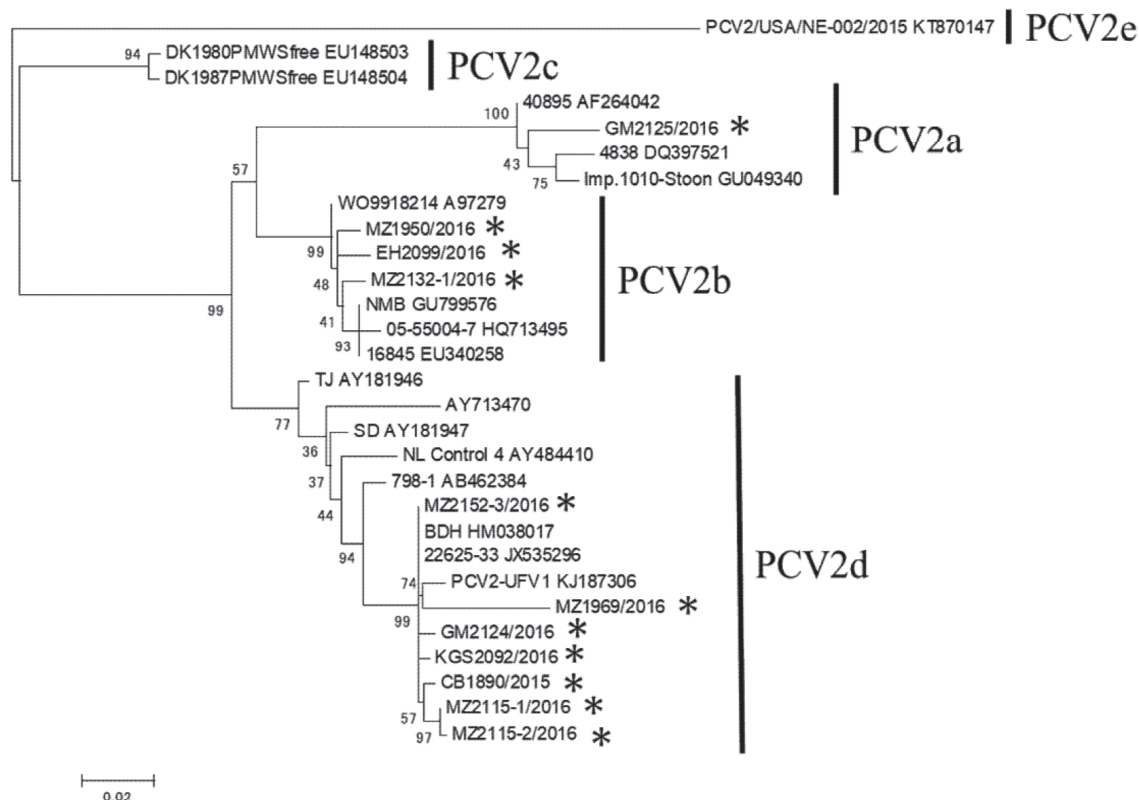


図1. PCV2 ORF2領域の塩基配列に基づく分子系統樹
本調査で得られた株を*で示した。右に各参照配列の属する遺伝子型を記した。

3. PCV3に関する分子疫学的調査

3.1. 背景

PCV3は2,000塩基の1本鎖環状DNAを有し、ゲノム上にはPCV2と同様、主に2つの遺伝子をコードしているとされる。しかし、サーコウイルス属内においてPCV2との近縁度は低く、PCV3とPCV2間のアミノ酸配列における相同率は、レプリカーゼタンパク質(ORF1遺伝子)及びカプシドタンパク質(ORF2遺伝子)でそれぞれ48%及び26%である¹⁸⁾。PCV3を含めたサーコウイルス属の分子系統樹解析の結果からは、PCV3は他の豚サーコウイルスとは異なる起源ウイルスから派生しており、コウモリサーコウイルスと共有の祖先ウイルスから派生したと報告されている。事実、アミノ酸配列における相同率は、両タンパク質でそれぞれ55%及び35%であり、PCV2のそれより近縁である¹⁹⁾。PCV3ゲノムは2016年に米国のPalinskiらによって、PDNS症状を呈して急死した雌豚及び流産胎子から初めて検出された¹⁶⁾。また、Phanらは原因不明の全身性炎症を示した豚をメタゲノム解析し、PCV3ゲノムを検出した¹⁸⁾。PCV3は米国で報告されて以降、世界の多くの国で報告されており^{2,4,6,7,10,11,13,20,22,25)}、2017年に国際ウイルス分類委員会によって新たなサーコウイルス属ウイルスとして分類された。英国における遡及的調査では2002年の検体からもPCV3ゲノムが検出されており、少なくとも15年以上前からPCV3が存在していたことが明らかとなった²⁾。そこで我々は、国内におけるPCV3の存在を把握することを目的として、2016年から2017年の病性鑑定材料を基に分子疫学的調査を実施した。

3.2. 材料及び方法

PCV3の調査には、2016年及び2017年6～12月に、当所に病性鑑定のために送付された国内の39農場102

頭の豚から採材された臓器を用いた。PCV3 ORF2遺伝子を既報のプライマー設定に従い、PCR法によって増幅した¹⁶⁾。本調査に用いた検体は突然死、発育不良、流産、呼吸器症状及び下痢といった症状を呈していた。PCV3ゲノムが検出された検体は、全ゲノム配列を解析するために、相互に重複する4つの領域をPCR法によって増幅した。プライマーは既報¹⁶⁾にある全ゲノム配列解析用プライマーを改変した(表2)。増幅産物の塩基配列は、ダイレクトシーケンス法により決定され、4つの領域の配列をアライメントし、PCV3の全ゲノム配列を解析した。全ゲノムあるいはORF2遺伝子の塩基配列が解析できたものについては系統樹解析に供した。全ゲノムの分子系統樹はKimura 2-parameterモデルによる最尤法、ORF2遺伝子の分子系統樹は近接結合法によって作成した。

3.3. 成績及び考察

39農場から採集された102検体のうち、11農場の14検体でPCV3ゲノムが検出された。農場及び個体のPCV3ゲノム陽性率は、それぞれ28.2%及び13.7%であった。地域ごとの農場及び個体のPCV3ゲノムの陽性率は、関東地方でそれぞれ66.7% (6/9) 及び30.1% (8/26)、中部地方で0% (0/3) 及び0% (0/7)、中・四国地方で0% (0/2) 及び0% (0/7)、九州地方で20.0% (5/25) 及び9.7% (6/62) であった(表3)。本調査と同様に病性鑑定由来の野外材料を用いたPCV3の疫学調査が、米国¹⁶⁾ 及び中国¹¹⁾ から報告されており、PCV3ゲノム陽性率はそれぞれ12.5% 及び34.7%と、本調査の陽性率は、それらの範囲内に含まれていた。また、ポーランドから報告された無作為に抽出された野外農場の陽性率は、0～65.0%と幅広く、農場の生産成績とPCV3陽性率との間に相関性は認められていない²⁰⁾。農場の生産成績とPCV3の関係は、

表2. PCV3 全ゲノム解析に用いたプライマー配列

プライマー名	プライマー配列(5'→3')	Tm 値(°C)	アニーリング温度	増幅サイズ
Full F1	CACCGTGTGAGTGGATATAC	57.8	55	854
Full R1	CAAACCCACCCTTAACAG	57.9		
Full F2	GTCGTCTTGGAGCCAAGTG	63.5	60	825
Full R2	CGACCAAATCCGGGTAAGC	66.4		
Full F3	GAAGTTGCGGAGAAGATG	58.4	55	550
Full R3	CGCAATAATTGTACACAAGTGC	61.9		
Full F4	ATATTCGTGGAAAGTTGGAGG	61.6	60	778
Full R4	CCACTTCATTACCCGCCTA	62.4		

表 3. 地域ごとの PCV3 ゲノムの陽性率

地域	農場		個体	
	陽性数/検査数	陽性率(%)	陽性数/検査数	陽性率(%)
関東	6/9	66.7	8/26	30.1
中部	0/3	0.0	0/7	0.0
中・四国	0/2	0.0	0/7	0.0
九州	5/25	20.0	6/62	9.7
全国	11/39	28.2	14/102	13.7

農場のバイオセキュリティレベルやピッグフローだけでなく、他の病原体の存在なども関与している可能性があり²⁰⁾、今後は PCV3 の病原性に関して明らかにすべきであろう。

週齢別の PCV3 ゲノム陽性率は、胎児期では11.5% (3/26)、3 週齢以下 (哺乳期) では12.5% (2/16)、4～10週齢 (離乳期) では14.2% (3/21)、11～17週齢 (肥育前期) では27.2% (3/11)、18週齢以降 (肥育後期) では11.1% (3/27) であった (表4)。また、PCV3 ゲノムが検出された個体は突然死 (n = 4)、流産 (n = 3)、発育不良 (n = 3)、削瘦 (n = 2)、元氣消失

(n = 1)、歩様異常 (n = 1)、呼吸器症状 (n = 1)、及び神経症状 (n = 1) といった臨床症状 (症状には重複あり) を呈していた (表5)。臓器ごとのゲノム陽性率は、心臓2/35 (5.7%)、肺6/68 (8.8%)、肝臓2/39 (5.1%)、腎臓5/21 (23.8%)、脾臓2/30 (6.7%)、腸管2/18 (11.1%)、脳1/12 (8.3%)、扁桃3/21 (14.3%)、肺リンパ節5/42 (11.9%)、腸間膜リンパ節2/10 (20.0%)、鼠径リンパ節1/7 (14.3%)、下顎リンパ節1/3 (33.3%)、胎子臓器3/91 (3.3%)、及び胎盤0/2 (0%) であった (表6)。

以上のように全ての週齢及び全身の諸臓器から

表 4. 日齢別の PCV3 ゲノム陽性率

ステージ	日齢	陽性頭数/検査頭数	陽性率(%)
胎子期		3/26	11.5
哺乳期	0-21	2/16	12.5
離乳期	22-70	3/21	14.2
肥育前期	71-120	3/11	27.2
肥育後期	121-	3/27	11.1
候補豚	300	0/1	0.0

表 5. PCV3 ゲノムが検出された個体の詳細

農場	日齢	稟告	他の病原体
A	胎児	流産	<i>E. coli</i>
B	胎児	流産	PPV, <i>E. coli</i>
C	胎児	流産	not detected
D	20	突然死	PPV
	20	突然死	PPV, <i>S. haemolyticus</i>
E	40	発育不良	<i>E. coli</i>
F	50	神経症状	PRRSV, <i>E. coli</i>
G	70	発育不良	PRRSV, <i>S. aureus</i> , <i>S. suis</i>
	110	削瘦	PCV2, PRRSV, <i>A. pleuropneumoniae</i>
	150	発育不良	PCV2, PRRSV, <i>P. multocida</i> , <i>E. coli</i>
H	72	突然死	<i>S. suis</i>
I	109	削瘦・歩様異常	PRRSV, <i>E. coli</i> , <i>S. suis</i>
J	130	元氣消失、呼吸器症状	PRRSV
K	180	突然死	<i>S. suis</i>

表 6. 臓器ごとの PCV3 ゲノム陽性率

臓器	陽性頭数/検査頭数	陽性率(%)
心臓	2/35	5.7
肺	6/68	8.8
肝臓	2/39	5.1
脾臓	2/30	6.7
腎臓	5/21	23.8
肺リンパ節	5/42	11.9
扁桃	3/21	14.3
脳	1/12	8.3
腸管	2/18	11.1
腸間膜リンパ節	2/10	20.0
鼠径リンパ節	1/7	14.3
胎子臓器	3/91	3.3
胎盤	0/2	0.0

PCV3 ゲノムが検出されたが、陽性率に顕著な差は認められなかった。また、流産胎子の臓器からも PCV3 ゲノムが検出されたことから、PCV3 は母子間で垂直伝播する可能性が示唆された。PCV3 ゲノム陽性検体では、13 検体で PCV2、Porcine parvovirus (PPV)、Porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV)、*Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*)、*Escherichia coli* (*E. coli*)、*Pasteurella multocida* (*P. multocida*)、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)、*Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*) 及び *Streptococcus suis* (*S. suis*) といった他の病原体との重感染を伴っていた。他の病原体が検出されなかった検体は、流産胎子 1 検体のみであった。本調査において、ほとんどの PCV3 検出検体から共感染を疑われる他の病原体も検出されていた。PCV3 が PCVAD のような複合感染症の一因となり得るかどうかが、更なる研究が必要であろう。今後、PCV3 の豚における病原性を明らかにするためには、培養細胞系において PCV3 を分離し、PCV3 単独感染または他の病原体との重感染の両方について、検証する必要があると考えられた。

PCV3 ゲノムが検出された 14 検体のうち、4 検体は全ゲノム配列を、1 検体では ORF2 遺伝子を含む塩基配列を決定した。全ゲノム配列は、いずれの株も 2000 塩基であった。本調査で検出された 4 検体間のゲノム相同率は、全ゲノム配列及び ORF2 遺伝子でそれぞれ 99.2~99.5% 及び 98.2~99.1% であった。また、カプシドタンパク質のアミノ酸相同率は 98.6~100.0% であった。本調査で検出された 4 検体の全ゲノム配列は、他のサーコウイルス属ウイルスならびに既報の PCV3

配列を用いた系統樹解析によって、他国の PCV3 と同じクラスターに分類された (図 2)。Fux らは PCV3 の全ゲノムは 2 つのクラスター (a 及び b) を形成し、ORF2 遺伝子では、それぞれが 2 つのサブクラスター (a1, a2, b1 及び b2) に分類されることを報告している⁷⁾。本調査で得られた 5 検体の ORF2 遺伝子とジーンバンクに登録されている他国の分離株との分子系統樹解析では 4 検体が遺伝子型 a1 に、1 検体が遺伝子型 a2 に分類された (図 3)。これまで報告されている各国の PCV3 遺伝子型は、単一サブクラスターに偏る傾向は認められず、遺伝子型と分離地域の地理的な関連性は確認できなかった。さらに、PCV3 は株間の ORF2 遺伝子が 97.2~100.0% と、PCV2 (最も低いもので、PCV2a と PCV2e の間で 79.5% の相同率³⁾) に比べて高い相同性を示していたが、PCV2 同様に、今後種々の選択圧を受けることによって、同遺伝子内に変異が生じる可能性も考えられた。今回の調査では、ORF2 遺伝子の配列が得られた検体が少なかったため、日本国内の PCV3 の系統樹解析は、さらに検体数を増やして検討する必要があるだろう。

4. おわりに

我々は、近年の日本国内における PCV2 及び PCV3 の分子疫学的調査を行った。その結果、世界各地で主に流行している PCV2d が、日本国内においても主たる流行株となっている可能性が示唆された。上述したように PCV2 の遺伝子型転換はワクチン使用などによる種々の選択圧が生じたためとも推測されており、従来のウイルス血症抑制・発症軽減を目的としたワクチン

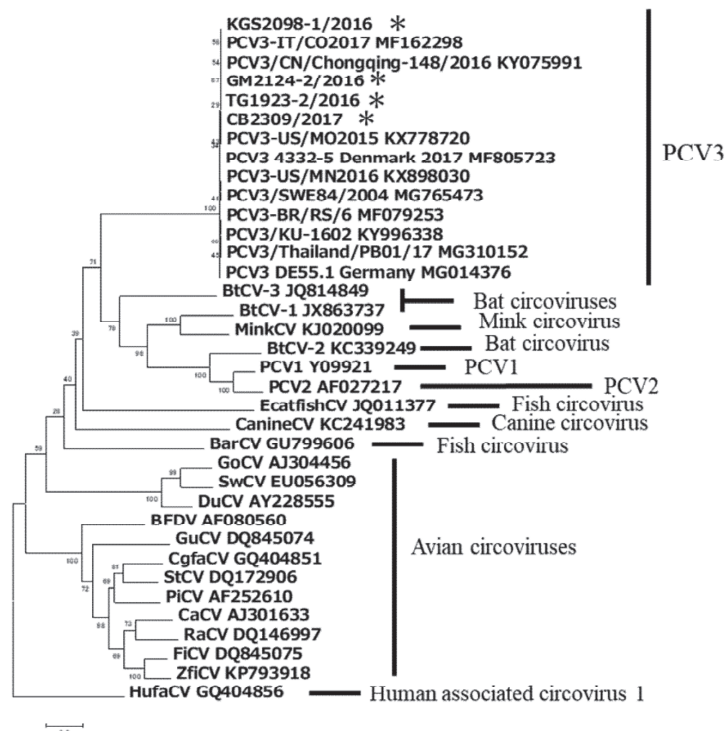


図2. PCV3および他のサーコウイルス属ウイルス全長塩基配列に基づく分子系統樹
本調査で得られた株を*で示した。

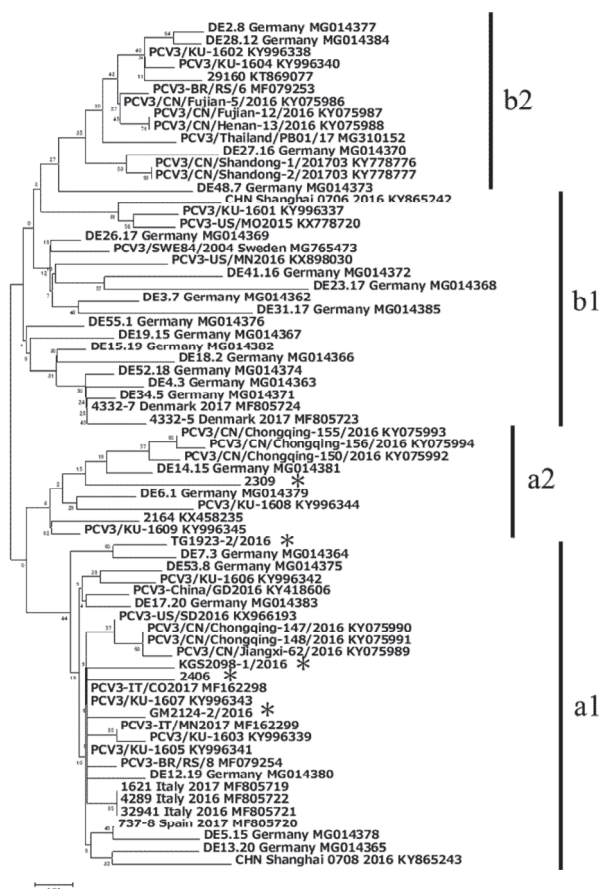


図3. PCV3 ORF2領域の塩基配列に基づく分子系統樹
本調査で得られた株を*で示した。右に各クレードの遺伝子型（Fux らの分類による）を記した。

のみでは疾病制御を成すことが難しい。ウイルス血症抑制・発症軽減のみを目的としたワクチンでも、現状の生産現場では十分な効果を発揮しているが、年々大型化している豚の飼養形態とPCVADのような慢性疾病の生産性阻害対策としては、豚群がPCVフリーとなるような感染防御型のワクチンが究極の理想であろう。また、PCV2はDNAウイルスとしては速い進化速度と高度な多様性を有していることを考慮すると、今後、制御するためには、遺伝子型に依存しないワクチンの開発が求められる。PCV3に関しては、諸外国と同様に国内にも浸潤していることが確認されたが、その病原性も含め未解明な点も多く、今後のさらなる研究の展開が期待される。

利益相反の開示

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。

引用文献

- 1) Beach NM, et al. (2012) Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 33-42.
- 2) Collins PJ, et al. (2017) Porcine circovirus type 3 in the UK. *Vet Rec*, 181: 599.
- 3) Davies B, et al. (2016) Diagnostic phylogenetics reveals a new Porcine circovirus 2 cluster. *Virus Res*, 217: 32-37.
- 4) Faccini S, et al. (2017) Detection and genetic characterization of Porcine circovirus type 3 in Italy. *Transbound Emerg Dis*, 64: 1661-1664.
- 5) Firth C, et al. (2009) Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen. *J Virol*, 83: 12813-12821.
- 6) Franzo G, et al. (2015) Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. *Vet Microbiol*, 178: 158-162.
- 7) Fux R, et al. (2018) Full genome characterization of porcine circovirus type 3 isolates reveals the existence of two distinct groups of virus strains. *Virol J*, 15: 25.
- 8) Gillespie J, et al. (2009) Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *J Vet Intern Med*, 23: 1151-1163.
- 9) Karuppannan AK, et al. (2017) Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in the context of current molecular epidemiology. *Viruses*, 9: 99.
- 10) Kedkovid R, et al. (2018) Porcine circovirus type 3 (PCV3) infection in grower pigs from a Thai farm suffering from porcine respiratory disease complex (PRDC). *Vet Microbiol*, 215: 71-76.
- 11) Ku X, et al. (2017) Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound Emerg Dis*, 64: 703-708.
- 12) Kwon T, et al. (2017) Genotypic diversity of porcine circovirus type 2 (PCV2) and genotypeshift to PCV2d in Korean pig population. *Virus Research*, 228: 24-29.
- 13) Kwon T, et al. (2017) Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations. *Vet Microbiol*, 207: 178-180.
- 14) Lv QZ, et al. (2014) Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*, 49: 1-10.
- 15) 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 experimental conditions. *Vaccine*, 35: 248-254.
- 16) Palinski, R., et al. (2016) A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *J Virol*, 91: e01879-16.
- 17) Patterson AR, et al. (2010) Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev*, 11: 217-234.
- 18) Phan TG, et al. (2016) Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J*, 13: 184.
- 19) Saraiva GL, et al. (2018) Evolutionary analysis of Porcine circovirus 3 (PCV3) indicates an ancient origin for its current strains and a worldwide dispersion. *Virus Genes*, 54: 376-384.
- 20) Stadejek T, et al. (2017) First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Po-

- land. *Transbound Emerg Dis*, 64: 1350-1353.
- 21) Takahagi Y, et al. (2008) Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Vet Med Sci*, 70: 603-606.
 - 22) Tochetto C, et al. (2017) Full-Genome Sequence of Porcine Circovirus type 3 recovered from serum of sows with stillbirths in Brazil. *Transbound Emerg Dis*, 65: 5-9.
 - 23) Xiao C, et al. (2015) Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol*, 96: 1830-1841.
 - 24) Yang ZZ, et al. (2008) A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of its ORF2 gene in Hangzhou, Zhejiang Province, China. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9: 148-153.
 - 25) Ye X, et al. (2018) Detection and genetic characterisation of porcine circovirus 3 from pigs in Sweden. *Virus Genes*, 54: 466-469.