

原著論文

豚テシオウイルス性脳脊髄炎の宮城県初事例

松 尾 賢 吾 (宮城県仙台家畜保健衛生所)

Matsuo, K. (2021). First case of porcine teschovirus encephalomyelitis in Miyagi Prefecture, Japan
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 78, 37-42.

キーワード：豚テシオウイルス性脳脊髄炎、血清型11、
宮城県、初事例

2018年に県内養豚場で離乳豚（58日齢、去勢）1頭に起立不能が認められ、病性鑑定の結果、脳幹部、小脳及び脊髄の灰白質に非化膿性脳脊髄炎を認め、大脳及び脊髄から豚テシオウイルス（PTV）が分離されたことから、宮城県かつ東北北海道地域で初の豚テシオウイルス性脳脊髄炎と診断された。分離株はVP 1遺伝子配列から血清型11（PTV-11）と判定された。農場の保存血清48検体（2013～2016年）の中和試験の結果、抗体保有率は100%となり、PTV-11の2013年以前の農場侵入が示された。また、県内の繁殖豚保存血清43戸430検体（2007、2008、2017、2018年）の中和試験の結果、抗体保有率は100%となり、PTV-11の2007年以前の県内全域への浸潤が示された。既報では主に血清型1のPTVが脳脊髄炎を引き起こすとされるが、PTV-11も脳脊髄炎を引き起こすことが推察されたことから、今後さらなる調査が必要である。

Abstract

Teschovirus encephalomyelitis (TE) is caused by infection of porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV), and enterovirus G (EV-G), all of which are classified into the family *Picornaviridae*. In 2018, a weaned pig (58-day-old, castrated) showed astasia and leg convulsions at a farm in Miyagi prefecture, located in north-east Japan. Non-purulent encephalomyelitis was observed in the gray matter of the brain stem, cerebellum, and spinal cord. PTV was isolated from the cerebrum and spinal cord, and this isolate was classified into PTV-11 by phylogenetic analysis based on the partial VP1 sequences. The virus neutralizing (VN) antibody against the isolate could be detected in all of the 48 tested sera collected from 2013

to 2016 at the affected farm with the titer ranging from 1: 16 to 1: 2048. In addition, all the 430 serum samples collected in 2007, 2008, 2017, and 2018 at 43 farms distributed over Miyagi prefecture were also positive for the VN antibodies, suggesting PTV-11 was prevalent in Miyagi prefecture in 2007 at the earliest. To date, five TE cases have been reported in Japan since 2002. Three of them were caused by PTV-1 and the other two cases were caused by PTV-4, and PSV, respectively. To our knowledge, this is the first description of TE caused by PTV-11 in Japan. Future studies will be needed to elucidate its pathogenesis of the PTV-11 isolate.

1 はじめに

豚テシオウイルス性脳脊髄炎（2020年に「豚エンテロウイルス性脳脊髄炎」より名称変更）は、ピコルナウイルス科に分類される豚テシオウイルス（PTV）、豚サペロウイルス（PSV）及びエンテロウイルスG（EV-G）による豚の伝染性神経疾患で、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。

PTV、PSV 及び EV-G はかつて豚エンテロウイルス（PEV）として1つに分類されており、PEVの13種の血清型（PEV-1からPEV-13）はⅠ、Ⅱ、Ⅲの3グループに分類されていた。PEV-1からPEV-7及びPEV-11からPEV-13はグループⅠとして識別されていたが、現在は遺伝子解析に基づいてPTVに再分類されている。PEV-1からPEV-7はPTV-1からPTV-7に、PEV-11からPEV-13はPTV-8からPTV-10に名前が変更され、新たにPTV-11からPTV-13が追加されている。グループⅡにはPEV-8が含まれており、過去にはPEV-Aとされていたが、現在はPSVとして再分類されている。グループⅢはPEV-9とPEV-10で構成され、過去にはPEV-Bとされていたが、現在はEV-Gに再分類されている^{4,8)}。

本病は、主に30日～70日齢の離乳豚で運動失調や四肢麻痺などの神経症状として認められ、脳幹部及び脊髓を中心に非化膿性脳脊髄炎が観察される。原因となるウイルス3種は国内外の農場に広く浸潤しており、健康な豚の扁桃や糞便から高率に検出されるが、大半の豚は不顕性感染に終わる。そのため、本症の確定診断には①神経症状、②非化膿性脳脊髄炎の組織学的所見及び③脳脊髄材料からのウイルス分離の3点が揃うことが必要とされている⁸⁾。しかし、採材時期によってはウイルスが分離されないことも多く、国内で確定診断に到り届出された事例は5例のみである(2019年3月末時点)。

2 発生概要

発生農場は、母豚380頭飼養の繁殖経営農場であり、母豚は自家育成である。子豚は20日齢で離乳し、分娩舎には60日齢まで、その後60日齢～90日齢の豚舎、90日齢～出荷の豚舎へ移動し、およそ120日齢で場外の肥育農場に出荷される。子豚にはマイコプラズマ及び豚サーコウイルス2型のワクチンを接種していた。2018年3月から豚舎を移動させるたびに、移動後の子豚に下痢が観察され、糞便を用いた遺伝子検査で *Lawsonia intracellularis*、*Brachyspira hyodysenteriae*、ロタウイルスB及びロタウイルスCが検出された。そのため、管轄の家畜保健衛生所が抗生物質の投与等を指導した結果、下痢の発生は鎮静化した。その後、4月に臨床症状を示さない子豚(35日齢)2頭で突然死が発生し、5月に58日齢の去勢離乳豚1頭が起立不能及び四肢痙攣の神経症状を呈したことから、病性鑑定を実施した。

3 材料及び方法

1) 病性鑑定

病性鑑定には神経症状発症豚1頭の生体及び同居豚3頭の血清を用いた。神経症状発症豚は鎮静処置及び全身麻酔後、剖検を実施した。採材した各種臓器は10%中性緩衝ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し病理組織学的検査を行った。細菌学的検査は、解剖豚の各種臓器及び血液を5%羊血液寒天培地等に接種し嫌気・好気培養による一般細菌検査を行った。生化学的検査は、血液検査及び血液生化学的検査(18項目)を実施した。ウイルス学的検査は、ウイルス遺伝子検査として臓器乳剤及び血清を材料とし、High Pure Viral RNA Kit 及び High Pure Viral Nucleic Acid Kit (日本ジェネティクス株式会社)

を用いて核酸を抽出後、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 及び PrimeSTAR HS DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社)を用いて豚熱ウイルス(CSFV)、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス、豚サーコウイルス2型、PTV、PSV、EV-GについてRT-PCR法及びPCR法により実施した^{5,6,10)}。抗体検査は、CSFVについては豚コレラエライザキットII(株式会社ニッポンジーン)を使用し、豚オーエスキー病ウイルス(ADV)についてはAD抗原ラテックス「科飼研」(株式会社科学飼料研究所)を用いたラテックス凝集反応により、それぞれ実施した。ウイルス分離は、解剖豚の扁桃、大腦及び脊髓の10%乳剤をCPK細胞に接種後、5%炭酸ガス存在下の37℃インキュベーターで7日間培養した。培養後は細胞及び培養液を凍結融解後、遠心し上清を回収、新たな細胞に接種し3代継代した。細胞変性効果(CPE)が現れた検体は培養上清を回収し、RT-PCR法により分離ウイルスを特定した。得られたウイルスは限界希釈法を用いて3代継代しクローニングした。

2) 分離株を用いた追加検査

① 血清型の決定

分離PTVの血清型を遺伝学的に分類するために、プライマー1298F(5'-CCNGCNGARACAGGHTGTG-3')及び1301R(5'-TTCCANGTRAANGARGG-3')を用いてVP1遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンシングにより得られたPCR産物の塩基配列を決定後、BLAST検索により類似性解析を行った⁷⁾。VP1領域の328塩基長について、フリープログラムMEGA6を用いて、ClustalWによりNCBIに登録されているPTV69株の塩基配列との多重整列を行い、近隣結合法により分子系統樹を作製した。1000回反復のBootstrap解析により各分枝の信頼性を検討した。

② 当該農場の過去血清を用いた遡及調査

当該農場の繁殖豚保存血清48検体(2013年10検体、2014年10検体、2015年14検体、2016年14検体)を用い、分離株を供試ウイルスとした中和試験を実施した。血清を2倍階段希釈した後、200TCID₅₀/0.1mlのウイルスと等量混和し1時間静置した。その後にCPK細胞を接種し、5%炭酸ガス存在下の37℃インキュベーターで7日間培養した後、CPEの有無を確認した。CPEが抑制された血清の最高希釈倍率の逆数を中和抗体価とした。

③ 県内浸潤調査

県内各市町村から1戸を無作為抽出し、1戸あたり10頭の繁殖豚血清を供試した。供試血清は2007年（13戸130検体）、2008年（9戸90検体）、2017年（11戸110検体）及び2018年（10戸100検体）から合計43戸430検体を用いた。血清は分離株を供試ウイルスとした中和試験により中和抗体価を決定した。

4 結果

1) 病性鑑定

神経症状発症豚は搬入時、体重が13kgと発育不良であり、元気消失し被毛は粗剛で起立不能を呈していた。また、全身、特に左前肢の間歇的な痙攣が認められた。剖検では、小脳髄膜及び脳脊髄液の軽度混濁が認められ、そ径リンパ節は萎縮していた。病理組織学的検査では、脳幹部、小脳及び脊髄の実質において非化膿性の炎症像が認められ、脳幹部及び小脳では非化膿性の髄膜炎も呈していた（図1）。病変は、脳幹部では灰白

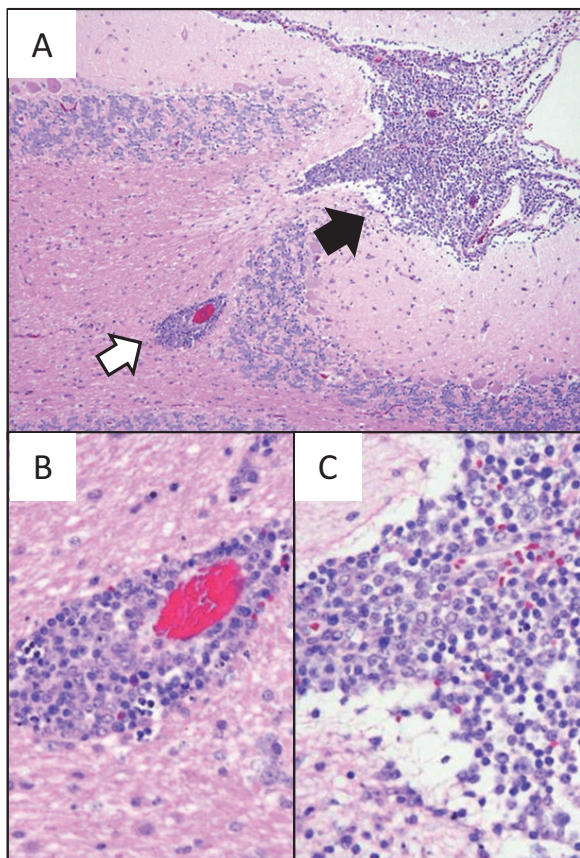


図1 小脳における囲管性細胞浸潤（白抜矢印）及び髄膜炎像（黒矢印）（A, 100倍観察）。囲管性細胞浸潤部（B, 400倍観察）及び髄膜炎部（C, 400倍観察）に浸潤する細胞はリンパ球が主体であった。

質領域で強く認められる傾向にあり、また脊髄では灰白質（左腹角）に局限して認められた。細菌学的検査では、解剖豚の各臓器及び血液から有意菌は分離されなかった。生化学的検査では、発症豚及び同居豚に共通してトリグリセリド（TG）の低値及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の高値が認められた。ウイルス学的検査では、遺伝子検査において大腦及び脊髄よりPTV遺伝子が検出され、他のウイルス遺伝子は検出されず、CSFV及びADVに対する抗体も陰性であった。ウイルス分離では、大腦及び脊髄よりCPK細胞にCPEを示すウイルスが分離された。分離ウイルスについて各種ウイルス遺伝子の検出を試みた結果、PTVのみで予測されるサイズの遺伝子増幅が認められ、分離ウイルスがPTVと同定された。

2) 分離株を用いた追加検査

① 血清型の決定

VP1遺伝子領域を用いて作製した系統樹より、分離株は血清型11に分類された（図2）。

② 当該農場の過去血清を用いた遡及調査

当該農場における遡及調査では、2013～2016年に採取された検体全てが16倍以上の抗体価を示し、検体が採取されたいずれの年でも抗体陽性率100%となった（図3）。

③ 県内浸潤調査

県内浸潤調査では、全ての採材年で抗体陽性率100%となり、どの年も同様の抗体分布を示し（図4）、抗体価は128倍を示す豚が最も多かった。さらに、採材年に関係なく県内を4つの家畜保健衛生所が管轄する地域（県南部、県中央部、県北部及び県東部）に分けて集計した場合においても、地域間で大きな差は見られず（図5）、64～128倍の抗体価を示す豚が多かった。次に、農家別での幾何平均中和抗体価を求めたところ、種豚場の1戸を除いた全ての農家で16倍以上の抗体価を示し、産歴が明らかな249検体を用いた産歴別での幾何平均中和抗体価では、産歴ごとに抗体価に差がないことが示された（図6）。

5 まとめ及び考察

今回、神経症状を呈した58日齢の離乳豚について病性鑑定を実施した結果、病理組織学的検査で脳幹部・小脳及び脊髄灰白質に非化膿性脳脊髄炎が認められた。また、ウイルス学的検査において、大腦及び脊髄より

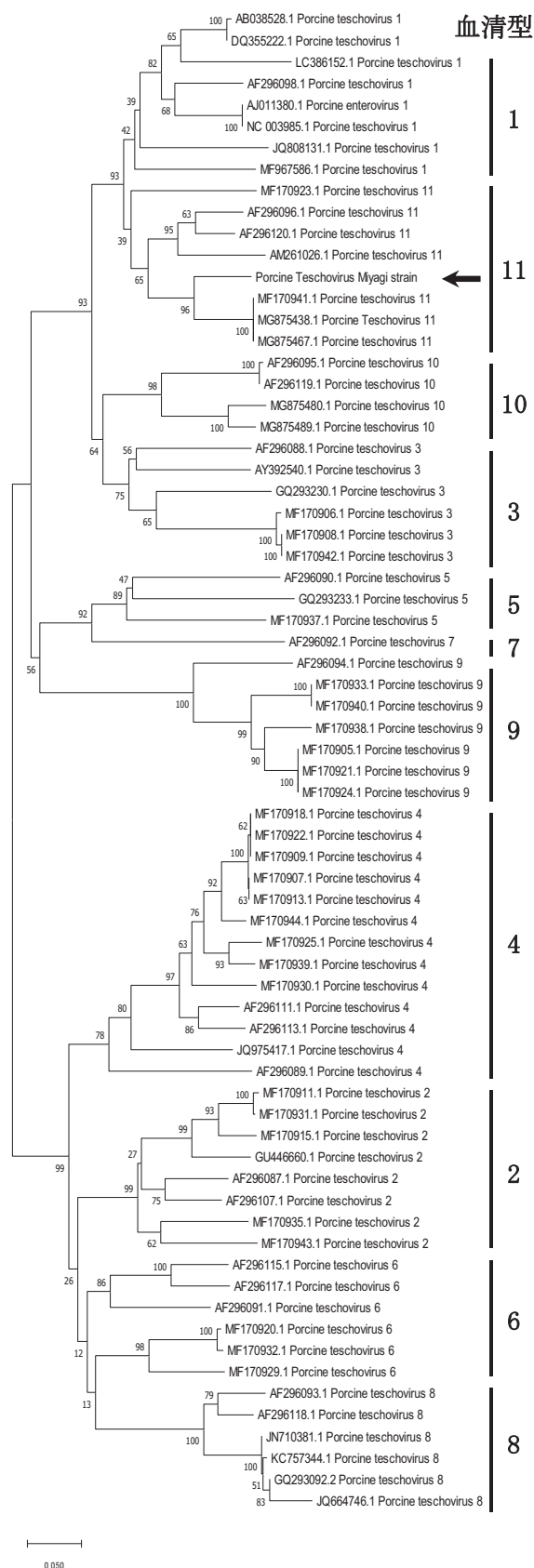


図2 PTV VP1遺伝子領域328塩基長を用いた分子系統樹。矢印が宮城県分離株を示す。各分岐上にBootstrap値(%)を示す。

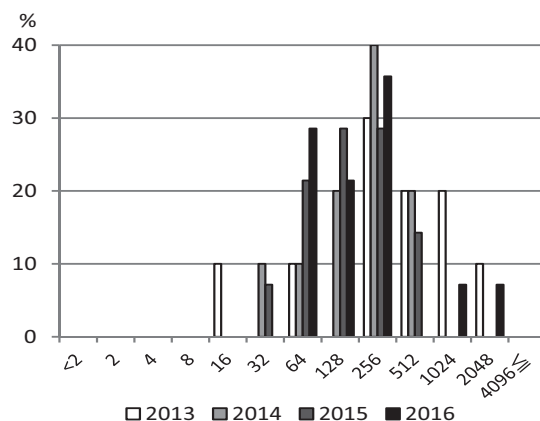


図3 発生農場繁殖豚におけるPTV-11中和抗体保有状況の遡及調査結果。横軸は中和抗体価、縦軸は各年に採集された検体において各抗体価を示した検体の割合を示す。

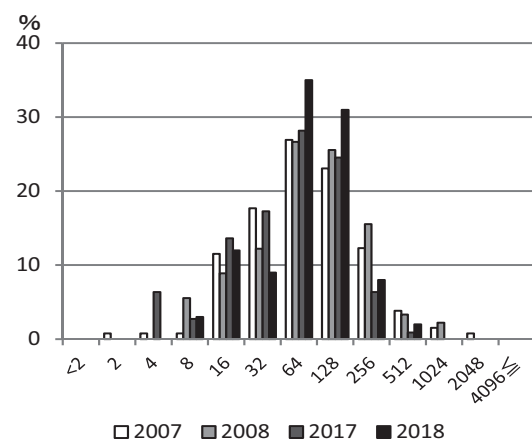


図4 宮城県内におけるPTV-11中和抗体保有状況の遡及調査結果。横軸は中和抗体価、縦軸は各年に採集された検体において各抗体価を示した検体の割合を示す。

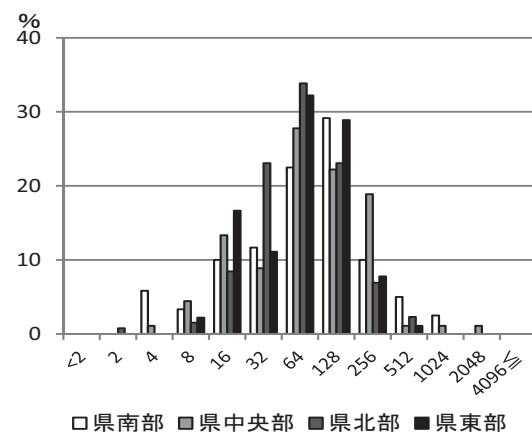


図5 宮城県内4地域におけるPTV-11中和抗体保有状況調査結果。横軸は中和抗体価、縦軸は各地域で採集された検体において各抗体価を示した検体の割合を示す。

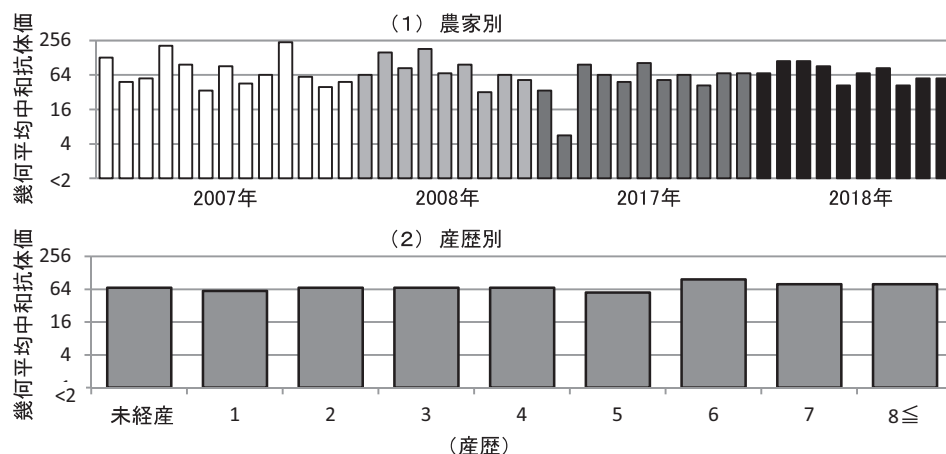


図6 農家別 (1) 及び産歴別 (2) のPTV-11価幾何平均中和抗体価。

PTV が分離され、他の細菌及びウイルスは陰性であった。以上の結果から本症例を豚テシオウイルス性脳脊髄炎と診断した。豚テシオウイルス性脳脊髄炎の診断事例としては、国内で6例目、東北及び北海道地方では1例目となった。

本分離株は血清型11であったが、豚テシオウイルス性脳脊髄炎の診断事例において、血清型11の豚テシオウイルス (PTV-11) の分離例はなく、PTV-11による初の診断事例であった。

農場の過去血清を用いた遡及調査では、2013年の時点で PTV-11に対する抗体陽性率が100%となり、PTV-11が2013年よりも以前に農場にまん延していたことが明らかになった。また県内の浸潤調査では、年別で集計したところ、2007年の時点で PTV-11に対する抗体陽性率が100%となり、地域別で集計した場合には、地域毎に差は見られず同様の抗体価の分布を示した。このことから、PTV-11は2007年の時点で県内に広く浸潤していたことが明らかとなった。PTV-11が以前から県内全域に浸潤していたにもかかわらず、豚テシオウイルス性脳脊髄炎の発生が見られなかったことから、PTV-11に感染した豚の多くが不顕性に経過していたことが推察された。ただし、Zell らの報告では PTV-1と PTV-11の血清型間で軽度の交差反応が認められていることから⁹⁾、今回検出された中和抗体が PTV-11特異的か他の PTV 血清型に対する交差反応を含むのかについては今後詳細な検討が必要である。

PTV が豚に感染した場合、ウイルスは扁桃及び腸管で増殖した後、ウイルス血症の状態を経て、血液脳関門を超えて脳実質に入ると考えられている。感染豚の多くは無症状で耐過するが、ウイルスが腸管等に定着している例も多く、細菌の二次感染や豚の免疫低下と

いった要因が加わった場合にさらなるウイルスの増殖及び発症が起こると考えられている⁴⁾。本症例では、哺乳期に細菌及びウイルス性の下痢が農場で流行しており、剖検時は発育不良でそ径リンパ節は萎縮していた。よってこれらが要因となり、PTV-11が増殖し、ウイルス血症を経て脳脊髄へ感染することで神経症状を発症したと考えられた。その後、農場は下痢への対策を実施しており、下痢の発生は終息し、子豚の発育は良好、突然死等は見られていない。

既報において、PTV の血清型は病原性と関連しており、脳脊髄炎を起こす血清型は1、2、3及び5とされ、中でも主に PTV-1によるとされている³⁾。国内の診断事例においても5例中3例が PTV-1によるものであった(他2例は PTV-4 及び PSV による)。一方で、海外で豚の脳脊髄炎症例から PTV-11を分離した例において、初乳未摂取豚への実験感染により全頭が臨床症状を発症したと報告されている¹⁾。本症例において、豚の脳脊髄炎症例から PTV-11が分離され、国内の PTV-11も脳脊髄炎を引き起こすことが推察されたが、その病原性を確認するには感染実験によって豚に臨床症状を引き起こすことを確認する必要がある。

PTV は13種類の血清型が存在するが²⁾、既に特定の血清型株の感染を受け、豚が中和抗体を保有している農場であっても、新たに血清型の異なる株が侵入した場合には感染防御できず、次々と新たなウイルスが侵入しやすい環境であれば容易に感染が持続する⁴⁾。PTV は国内外に広く浸潤し、通常的环境下で飼育されている豚の大半は感染を受けている。また、発症豚の他、不顕性感染豚も感染源となり得ることから、農場の清浄化は非常に難しい。そのため、ウイルスと共存することを前提に、細菌感染や豚の免疫状態といっ

た発症要因をコントロールすることが重要であり、飼養衛生管理基準を遵守し、適切な飼育密度、環境温度の調整、換気、オールイン・オールアウトに基づく畜舎の消毒等が有用であると考えられた。

謝辞

本研究にご協力、ご指導をいただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の宮崎綾子主任研究員、宮城県保健環境センターの植木洋総括研究員に深謝します。

本研究における病性鑑定は、著者に加え、板橋知子技術主査（北部家畜保健衛生所）、江頭広之技術主査（東部家畜保健衛生所）及び佐久間晶子技術主査（仙台家畜保健衛生所）により実施されたものである。

利益相反状態

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Ferreyra FM, et al. (2017) Development of polio-encephalomyelitis in cesarean-derived colostrum-deprived pigs following experimental inoculation with either teschovirus A serotype 2 or serotype 11. *Viruses*, 9: 179-190.
- 2) ICTV Report Genus: Teschovirus. *Virus Taxonomy*: 2019 Release.
https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/704/genus-teschovirus (2021年3月17日閲覧)
- 3) Jeffrey J, et al. (2012) *Diseases of Swine*. 10th ed. Wiley-Blackwell, UK.
- 4) 加来義浩 (2003) 豚エンテロウイルス性脳脊髄炎をめぐる近年の状況について. *豚病会報*, 43: 4-6.
- 5) Kono Y, et al. (1996) Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *J Vet Med Sci*, 58: 941-946.
- 6) La Rosa, et al. (2006) Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses. *J Vet Med Sci*, 53: 257-265.
- 7) 西大輔ら (2012) 豚エンテロウイルス性脳脊髄炎の発生と血清学的調査. *日獣会誌*, 65: 31-36.
- 8) OIE *Terrestrial Manual* 2017. Chapter 2.8.9. Teschovirus encephalomyelitis.
- 9) Roland Z, et al. (2001) Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J Virol*, 75: 1620-1631.
- 10) Vilcek S, et al. (1994) Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch Virol*, 136: 309-323.