

資料

長崎県内における非定型豚ペスチウイルスの浸潤状況調査

秦 祐介、酒井芳子、石丸憲二

(長崎県中央家畜保健衛生所)

Hata, Y., Sakai, Y., Ishimaru, K. (2022). The prevalence of atypical

porcine pestivirus in pigs in Nagasaki prefecture

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 79, 30-34.

キーワード：非定型豚ペスチウイルス (APPV)、先天性痙攣症 (CT)、浸潤状況調査

【はじめに】

非定型豚ペスチウイルス (Atypical porcine pestivirus: APPV) は、ペスチウイルス属 (フラビウイルス科) のペスチウイルス K に分類されている²⁾。ウイルスゲノムは約11,500塩基のプラス1本鎖RNAで、両末端に5'、3'の非翻訳領域、その間に3,635aaのアミノ酸がコードされ、ウイルス蛋白はN^{pro}、C、E^{rns}、E1、E2、p7、NS2-3(NS2、NS3)、NS4A、NS4B、NS5A、NS5Bの順にコードされており⁹⁾、その遺伝子配列によってGenotype I～Ⅲに分類されることが報告されている^{4,7)}。APPVは2015年にアメリカで最初に発見されたウイルスで⁵⁾、先天性痙攣症 (CT) を発症した哺乳豚から検出され、感染試験において病原性が再現されたことから、中枢神経に病変が認められるものの長い間原因の特定できなかったタイプA-ⅡのCTの要因の一つと考えられている^{1,3)}。CTは新生豚の頭部、前駆及び後駆、ときに全身の震えなどの臨床症状を示す疾病で、その症状からダンス病とも呼ばれており、病理学的診断では中枢神経系、とくに脊髄の髄鞘形成不全の検査が重要とされている⁶⁾。APPVは北米、南米、ヨーロッパ及びアジア等世界で広く浸潤が確認され^{1,3,5,7,8,10-14)}、健康な成豚や野生イノシシからも検出されている^{10,13)}。APPV遺伝子検出率は、アメリカやドイツで2.4～22%、英国やイタリアで2.3～17.5%、中国や台湾で5～11%との調査報告がある¹¹⁾。国内でも、九州や本州において、2日齢～12週齢のCTを呈した哺乳豚、発育遅延、発熱、呼吸器症状を呈した豚及び無症状豚からAPPV遺伝子が検出されている⁷⁾。長崎県内では2005年から2008年に4事例のCT発症豚が病性鑑定に供され、うち2例において病理組織学的検査で髄鞘低形成

や小脳・脊髄白質の空胞変性が認められ、ダンス病と診断された。これらの症例において、APPVの検索は実施されておらず、APPVの関与については不明であったが、無症状豚の存在や国内検出事例を踏まえると、APPVが長崎県にも浸潤している可能性が疑われた。そこで今回、県内においてAPPV浸潤状況調査を実施し、さらに過去の病性鑑定事例において、CT発症豚が確認された農場について追加調査を実施したところ、若干の知見が得られたので報告する。

【材料及び方法】

1. 供試材料：APPV浸潤状況調査として、2018年12月から2020年3月の間に病性鑑定を実施した県内28農場の死亡豚等112頭及び野生イノシシ5頭の主要臓器等の10%乳剤並びに27農場の5頭ずつのプール血清123検体を用いてAPPV遺伝子検索を実施した。また、追加調査では、2005年から2008年にCT発症豚が確認された3農場において2008年から2017年に採材した血清、主要臓器及び中枢神経組織の10%乳剤計48検体を用いてAPPV遺伝子検索を実施した。

2. RNA抽出及びRT-PCR：市販キット (High Pure Viral RNA Kit または High Pure Viral Nucleic Acid Kit、Roche、Germany) を用いて計288検体からRNAを抽出した。抽出したRNAはAPPVのNS3領域の583bpを増幅するプライマーセットを使用し⁴⁾、市販のRT-PCRキット (PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2、タカラバイオ社、日本) を用いてRT-PCRを実施した。

3. 塩基配列決定及び系統樹解析：検出されたPCR増幅産物を市販キット (High Pure PCR Cleanup Micro Kit、Roche、Germany) を用いて精製後、シーク

エンス解析を行い、塩基配列を決定した。さらに決定した7株について、genbank に登録されている APPV の NS3 の塩基配列で、既報において遺伝子型が分類されている株を参照配列とし⁴⁾、解析ソフト (MEGA X) を用いて最尤法にて分子系統樹解析を行い、併せて APPV 遺伝子配列の相同性解析を行った。

【成績】

1. 浸潤状況調査：3 農場 (A ～ C) 3 頭の120～167 日齢の病性鑑定豚及び4 農場 (B ～ E) 4 検体の60～150日齢のプール血清から APPV 遺伝子が検出された

(表1)。APPV 遺伝子検出率については、病性鑑定豚等は2.56% (3/117)、プール血清は3.25% (4/123) であった。

APPV 遺伝子が検出された5 農場は4 市 (O ～ R) に所在しており、病性鑑定豚の症状は、神経症状、急死を呈するものから無症状のものまで様々であり、ダンス病と診断された事例は認められなかった (表2)。また、APPV 遺伝子が検出された5 農場の豚や精液の導入先はそれぞれ異なっていた。なお、哺乳豚や野生イノシシでは APPV 遺伝子は検出されなかった。

表1 APPV浸潤状況調査結果(日齢別)

発育ステージ	病性鑑定豚等頭数 (陽性数/頭数)	プール血清件数 (陽性数/検体数)
流産・死産胎子	0/8	－
1～29日齢	0/7	－
30～59日齢	0/16	0/20
60～89日齢	0/25	1/19
90～119日齢	0/10	0/21
120～149日齢	2/25	2/23
150日齢以降	1/16	1/22
繁殖豚	0/5	0/15
不明(野生イノシシ)	0/5	－
合計	3/117(2.56%)	4/123(3.25%)

表2 APPV遺伝子陽性検体の概要

農場	年月	所在地	日齢	症状	検査材料	豚等の導入と導入元	診断名	株名
A	2018年12月	O市	129日齢	神経症状	全身臓器および 中枢神経組織	豚、県内	豚レンサ球菌症	NS/A-1/2018
B	2019年4月	P市	60日齢	健康豚	血清	自家産	－	NS/B-1/2019
	2019年7月		167日齢	急死	腎臓、脾臓		脾臓破裂	
C	2019年11月	Q市	120日齢	急死	脾臓	精液、県外	気腫疽	NS/C-1/2019
	2019年11月		60日齢	健康豚	血清		－	
D	2019年12月	R市	120、136日齢	健康豚	血清	精液、県外	－	NS/D-1/2019
E	2020年1月	R市	150日齢	健康豚	血清	豚、県外	－	NS/E-1/2019

2. 追加調査：2008年にダンス病が確認されたF農場では、2017年に採材した150日齢血清で APPV 遺伝子が検出された。また、2006年にダンス病が確認されたH農場では、2008年に採材した60日齢血清から APPV 遺伝子が検出された（表3）。一方、2005、2007年にCTの発生したG農場では、APPV 遺伝子は検出されなかった。またF農場のCT発症豚由来検体においても、APPV 遺伝子は検出されなかった。なお、G農場で2005年8月に確認されたCT発症豚、H農場で2006年4月に確認されたCT発症豚については、材料が保存されていなかったため、APPV 遺伝子検査は実施できなかった。

3. 分子系統樹解析：県内で検出された7株のうち、6株はClade I、1株（NS/APPV-1/2017）はClade IIIに分類された（図1）。Clade Iに分類された6株のうち、4株はSubgroup1、1株はSubgroup2、1株はSubgroup4に分類された。Clade IのSubgroup1に分類された4株の相同性は95～99%であり、このうち3株の相同性は98～99%であった。一方、Subgroup1、Subgroup2、Subgroup4間の相同性は86～90%、Clade Iに分類された株とClade IIIに分類された株の相同性は81～87%であった。なお、NS/F-1/2017と国内で検出されたClade IIIの株（Annaka/2020）の相同性は94%、中国で検出されたClade IIIの株との相同性は89～91%であった。

【まとめ及び考察】

APPV 浸潤調査の結果、4市5農場で APPV 遺伝子が検出され、県内の APPV 遺伝子検出率は頭数比で2.56%と、海外の報告と比較すると低いレベルであると推察された¹¹⁾。また、プール血清の APPV 遺伝子検出率は3.25%であり、頭数比の検出率と大きな差異は認められなかった。さらに、APPV 遺伝子検出農場では、母豚や新生豚で APPV 遺伝子が検出されず、CT発症豚や哺乳中の高い事故率も認められなかった。APPV 感染試験において、授精後32日から62日の母豚に APPV を接種した場合、その産子がCTを呈することが報告されている^{1,3)}。今回、母豚の妊娠期間中に APPV が感染しなかったため、CTを発症する個体が認められなかったと推察された。一方、野生イノシシでは APPV は検出されなかったが、検体数が少なかったため、今後更なる調査が必要と思われた。

追加調査では、CT発症個体からは APPV 遺伝子が

検出されず、CT発症と APPV の因果関係については不明であった。今回、CT発症個体において、APPV 遺伝子検査を実施できたのが2症例のみであり、サンプルの長期保存によって遺伝子が劣化していたことが一因となった可能性も考えられるため、今後症例数を蓄積するとともに、同様の症例に遭遇した場合は速やかに APPV 遺伝子検査を実施することが必要と考えられた。また、APPV は下顎リンパ節、小脳への組織向性が高いことも報告されている^{1,10,14)}。CT発症豚の採材においては、これらの部位についても採材することが必要と考えられた。

分子系統樹解析では、県内で少なくとも4系統のウイルスが浸潤していることが明らかとなった。Clade Iは、北米、アジア、ヨーロッパ等世界中で検出されている一方、Clade IIは中国のみ、Clade IIIは中国及び日本で検出されている^{4,7)}。今回の調査結果で、Clade IとClade IIIが検出されたことは、これまで国内で実施された APPV 遺伝子解析の報告と一致する結果となった⁷⁾。APPV 遺伝子は血液、脳脊髄液、唾液からも検出されており^{1,3,6,7,11-14)}、精液を介した APPV 感染の可能性も指摘されている⁹⁾。APPV 遺伝子が検出された5農場では、それぞれ導入元が異なり、このことが県内に多様な APPV が浸潤した要因となった可能性が考えられた。一方、Clade I、Subgroup1の4株については遺伝的に近縁であることから、地域間で感染が広がった可能性も考えられた。しかしながら、検出された年代や地域も異なり、農場間における疫学関連もないことから、本県における APPV 感染経路を明らかにすることはできなかった。なお、今回検出された NS/F-1/2017は、国内で検出された Annaka/2020と最も近縁であった。国内で検出されている Clade IIIは、中国で検出されている Clade IIIとは遺伝的に離れていることから、国内で独自に進化を遂げた可能性が指摘されている⁷⁾。また、Clade IIIは2007年には九州に浸潤していたことがわかっており⁷⁾、今回、県内で検出された株も同様の系統に由来すると推察された。

今回の調査において、少なくとも2008年には県内に APPV が侵入しており、現在までに複数の地域で浸潤していることが明らかとなった。国内の APPV 浸潤状況については、これまでにほとんど把握されておらず、今回の調査結果は、これから国内の APPV 浸潤状況を明らかにするための一助になると考えられる。今後、国内の APPV 浸潤率をより広範囲に把握することで、APPV の侵入経路や APPV の病態解明につな

表3 追加調査結果

農場	年月	所在地	齢	症状	組織所見	検査材料	診断名	遺伝子検査結果	株名
F	2008年7月	S市	2日	CT	小脳白質・脊髄腹索空胞形成	大脳	ダンス病	-	
	2017年9月		30～150日	健康豚	-	血清	-	+(150日齢)	NS/F-1/2017
G	2005年3月	P市	2日	CT	著変無し	NT※	不明	NT	
	2007年8月		2日	CT	著変無し	大脳、脳幹、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓	不明	-	
	2007年9月		母豚	健康豚	-	血清	-	-	
	2008年7月		50日～母豚	健康豚	-	血清	-	-	
H	2006年4月	S市	1～15日	CT	小脳白質・脊髄腹索空胞形成 脊髄髄鞘低形成	NT	ダンス病	NT	
	2008年9月		哺乳豚～母豚	健康豚	-	血清	-	+(60日齢)	NS/H-1/2008

※NT:検査未実施

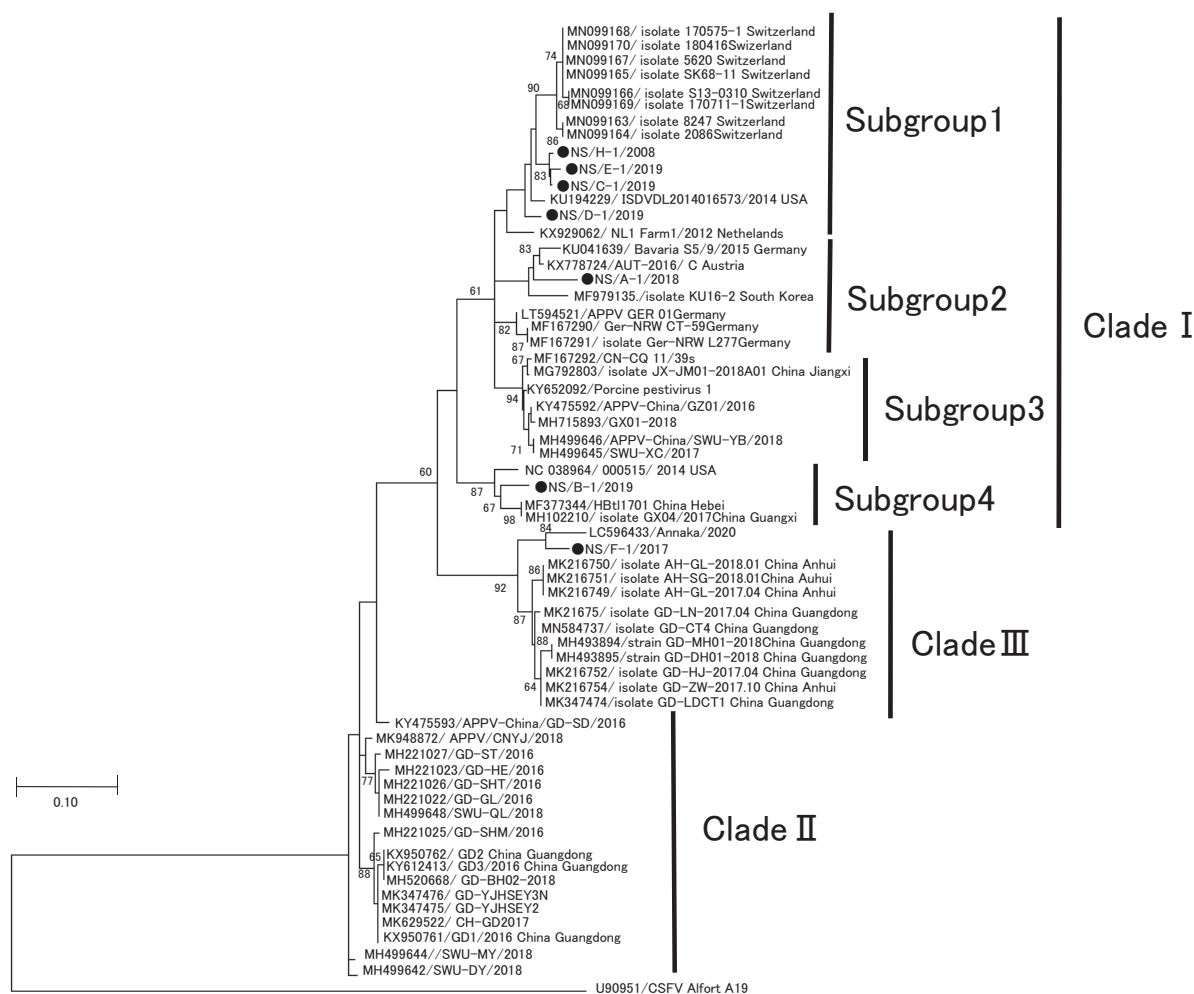


図1 APPVのNS3領域の塩基配列に基づく塩基配列

本調査で得られた株を●で示す。右に各参照配列が属する遺伝子型を記す。

図中の数値はブートストラップ値を示す(1000回演算、百分率)。系統樹上にはブートストラップ値60以上を示す。

がることが期待される。

利益相反状態の有無

すべての著者は開示すべき利益相反はない。

【引用文献】

- 1) Arruda BL, et al. (2016) Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. *PLoS One*, 11(2): e0150104.
- 2) Dall Agnol AM, et al. (2020) Pestivirus K (atypical porcine pestivirus) update on the virus, viral infection, and the association with congenital tremor in newborn piglets. *Viruses*, 12: 903.
- 3) de Groof A, et al. (2016) Atypical porcine pestivirus: a possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. *Viruses*, 8: 271.
- 4) Guo Z, et al. (2020) Genetic characterization and recombination analysis of atypical porcine pestivirus. *Infect Genet Evol*, 81: 104259.
- 5) Hause BM, et al. (2015) Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. *J Gen Virol*, 96: 2994-2998.
- 6) 福所秋雄 (1999) 先天性痙攣症 (ダンス病). 柏崎守ら編 豚病学 近代出版, 第四版, 203-204.
- 7) Kasahara-Kamiie M, et al. (2021) Detection and genetic analysis of a novel atypical porcine pestivirus from piglets with congenital tremor in Japan. *Transbound Emerg Dis*, online ahead of print (<https://doi.org/10.1111/tbed.14149>).
- 8) Mosena ACS, et al. (2018) Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound Emerg Dis*, 65: 22-26.
- 9) Pan S, et al. (2019) An emerging novel virus: Atypical porcine pestivirus (APPV). *Rev Med Virol*, 29: e2018.
- 10) Postel A, et al. (2016) Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci Rep*, 6: 27735.
- 11) Postel A, et al. (2017) High abundance and genetic variability of atypical porcine pestivirus in pigs from Europe and Asia. *Emerg Infect Dis*, 23: 2104-2107.
- 12) Schwarz L, et al. (2017) Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet Res*, 48: 1.
- 13) Sozzi E, et al. (2019) Molecular survey and phylogenetic analysis of atypical porcine pestivirus (APPV) identified in swine and wild boar from northern Italy. *Viruses*, 11: 1142.
- 14) Yuan J, et al. (2017) Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China. *Front Microbiol*, 8: 862.