

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) 関連豚サーコウイルス 検出までの病性鑑定経過ならびに浸潤状況調査と疾病発生について

種市 淳、富樫克博

(山形県中央家畜保健衛生所：〒990-2161 山形市漆山736；庄内家畜保健衛生所：〒999-2292 東田川市余目町土堤下35-2)
Taneichi, A. and Togashi, K. (1999): Dignostic Process and Field Survey of Porcine Circovirus Infection in Pigs with
Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Yamagata Prefecture. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 36: 11-14

はじめに

Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) と称される離乳豚の消耗性疾病が欧米を中心に多数報告され、その原因として新型のブタサーコウイルス (pmws PCV) が注目されている。我々は、国内で初めて pmws PCV の分離ならびにゲノムの塩基配列検索による同定を行った¹⁾。今回、病性鑑定経過と共に、山形県庄内地区における病性鑑定成績に基づく浸潤状況調査結果について報告する。

病性鑑定経過

発生農場 (B 養豚場) の概要

飼養頭数約1,000頭、繁殖母豚90頭の一貫経営。

平成10年4月頃より下痢を伴う育成豚の死廃事故が発生しており、病性鑑定ではロタウイルスと病原性大腸菌 (VT 産生) の関与が疑われた。5月に入り下痢症は終息したが今度はヘコヘコ病様の呼吸器症状を呈して死亡するものが散見されるようになり、死亡率が前年同期の2.5倍に増加した。死亡豚の約70%は30kg 未満であった (図1)。そのうちの1頭について病性鑑定を実施した。

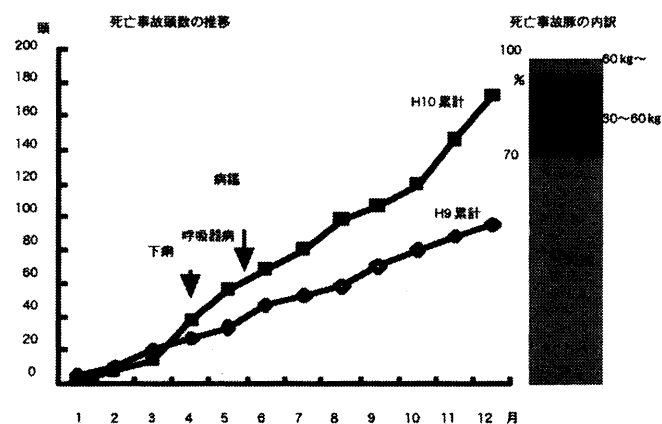


図1 B 養豚場における育成豚の累積死亡

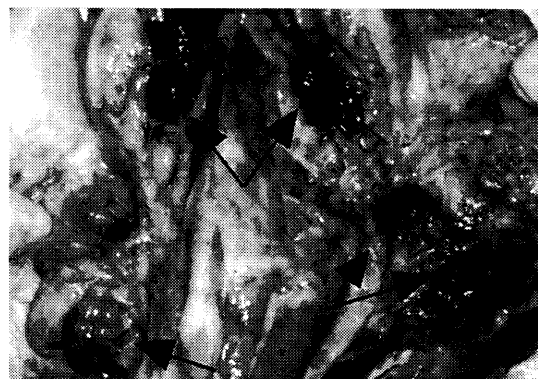


図3 リンパ節の腫大と血液吸収

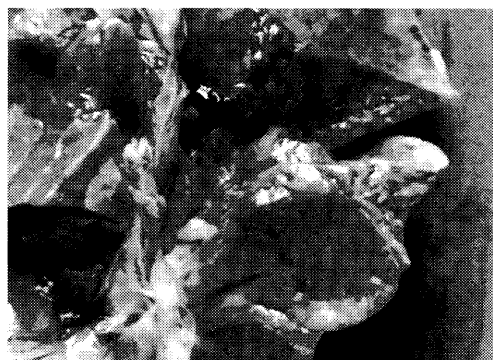


図2 肺：間質水腫と充実感を呈す

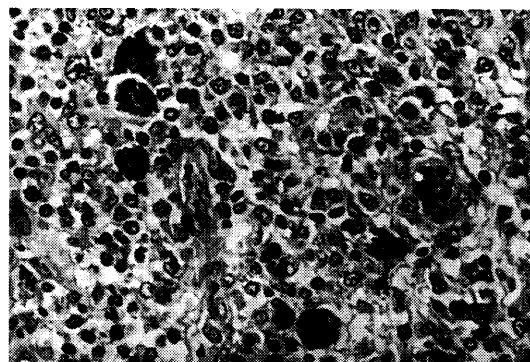


図4 胃付属リンパ節細胞網細胞内における好塩基性細胞質内封入体

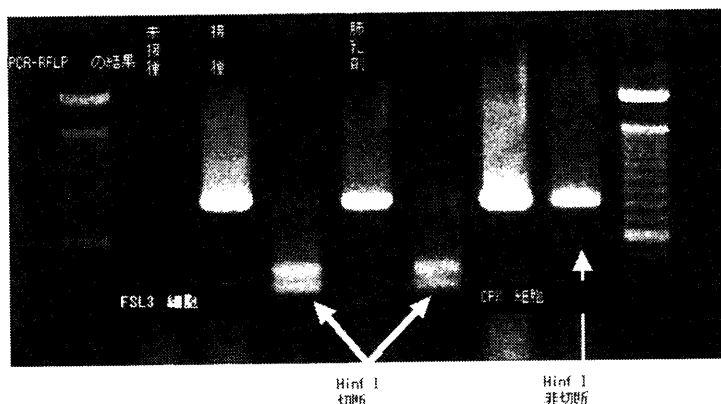


図5 PCVのPCR-RFLP結果

現地家畜保健衛生所への病性鑑定依頼と採材は5月28日に行われた。

剖検では肺炎の他、リンパ節の軽度の腫脹が見られた。

血清ならびに生およびホルマリン固定臓器が当所に送付され、細菌検査、ウイルス分離ならびにルーチン検査としてPRRSウイルスについてはHenningsら²⁾のプライマーによるnested RNA・PCRによる検出とともに病理組織検査を実施。肺より*Streptococcus suis* type Iが分離、扁桃、肺、脳よりPRRSウイルスが分離・検出された。

6月4日に病理組織検査の結果が得られ、リンパ系組織において特徴的な細胞質内封入体が認められた。これらの封入体は、平成9年に発生であった鳩のサーコウイルス感染症に見られたものに類似していた。

豚のサーコウイルスに関する文献検索をMedlineにより実施したところ、PMWSならびにpmws PCVに関する多数の文献情報が得られた。

この中より、核酸検出に関するHamelら³⁾の文献をFaxにより取り寄せ、PCRプライマーを直ちに発注した。

PCR検査が陽性であったので、制限酵素切断長多形による同定を試みた。遺伝子解析ソフトによる切断部位検索を行いRFLPを実施し、予想された制限酵素切断パターンが得られた(図5)。

図5のレーン1、9は100bp分子量マーカー、レーン2、3、5、7はPCR結果を示す。レーン2は陰性、レーン3、5、7は815bpの陽性バンドが認められる。レーン4、6、8は制限酵素Hinf Iによる切断長多形を示す。レーン4、6では、それぞれ437kb、378kbの断片に2分された。

レーン2はPCVフリーのFSL3細胞に処理検体を接種し陽性反応がでている。このことからPCVの分離も確認できた。レーン4、6の処理検体ならびに検体接

種FSL3細胞からの815kbのPCV陽性バンドは、pmws PCVの塩基配列から予想されたとおり制限酵素Hinf Iにより切断された。一方、レーン8のnpPCV感染CPK細胞からのPCV陽性バンドは制限酵素Hinf I切断部位がないため、電気泳動位置に変化はない。これらの結果から、検出されたPCVをpmws PCVと同定した。

畜産局衛生課への報告にあたり、形態的なウイルス粒子の確認を行うため、家畜衛生試験場七戸研究施設に電子顕微鏡観察を依頼した。電子顕微鏡観察の結果、細胞質内封入体に一致して、渦巻き状、波状、円状の不整な結晶構造をとる大きさ約20nmのエンベロープをもたない六角形のウイルス粒子が確認された(図6)。

以上の検査結果をうけて平成10年7月8日衛生課に「離乳後全身性消耗性症候群」と邦訳して新疾病該当の有無について県衛生係より照会したが、すでに国外での既知疾病であるとの理由により該当しない旨連絡があった。

なお、現在PMWSは離乳後多臓器性発育不良症候群と訳されている。以上述べてきた病性鑑定の経過を表1にまとめた。

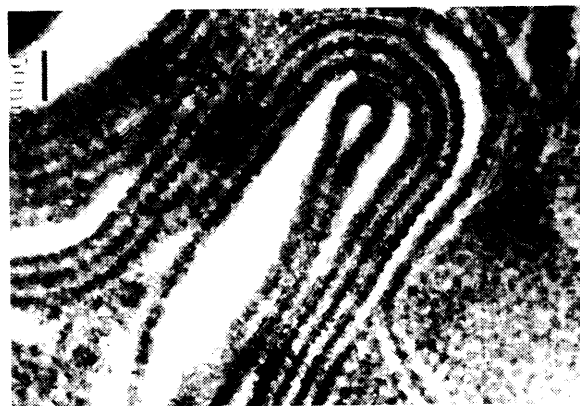


図6 細胞質内にみられた封入体の電子顕微鏡像。

表1 病性鑑定経過

病性鑑定経過	月 日
病性鑑定依頼	5/29
PRRSV 検出	6/3
封入体確認	6/4
文献検索	6/4
文献入手	6/4
プライマー発注	6/4
PCV 検出 PCR	6/9
同定 RFLP	6/12
形態観察依頼	6/16
PCV 粒子確認	7/8
国へ照会	7/8
PRRS 届出	7/17

さらに既知の pmws PCV との遺伝子配列の相同性を照合するため、PCR 増幅部位の核酸配列分析を TAKARA に発注し、得られた配列と既報の npPCV 株、pmws PCV 株との相同性を比較した。その結果を表2に示した。

表2 Genbank data base に登録されているものとの比較 (%)

npPCV		pmwsPCV			
NP1	80.9	TYPE-A	97.5	412	96.1
NP2	80.5	B9	95.8	TYPE-C	97.5
NP3	80.7	9741	95.7	TYPE-E	97.4
		M226	96.9		
		TYPE-B	97.3		
		ISU31	97.4		
		USA	97.7		
		CANADA	97.7		
		FRANCE	96.9		
		FRA2	97.0		

分離株は既知 pmws PCV 株と高い相同性を示し、一方 npPCV 株とは80%程度の相同性であり、山形株が pmws PCV であることが分かる。なお、PMWS との関連が取り沙汰されている豚パルボウイルスについては Rodrigo らのプライマーにより PCR をおこなったが関与していなかった。

次に、pmws PCV の浸潤状況と他の病原体との関わりについて調査した。

平成10年5月から平成11年9月までに管内10農場、48検体に pmws PCV 感染が確認された。pmws PCV 陽性豚は、体重6kgから97kg、発育不良、呼吸器疾病、突然死などにより病性鑑定依頼された。陽性農場は、秋田県境から新潟県境まで調査地域全体に分布しており、地理的にも、流通等においても相互の疫学的関連が認められず。もはや、pmws PCV は調査地域全体に

広く浸透しているものと推察された。表3に pmws PCV が確認された農場の概要を示した。

表3 陽性農場の概要

農場名	母豚頭数	離乳子豚死病数*	離乳舎繁殖豚同居	PRRSV汚染
A	120	4.92	無し	陽性
B	100	2.16	繁殖・雄	陽性
C	30	2.16	雄	陽性
D	60	4.92	繁殖・雄	陽性
E	80	2.52	繁殖・雄	陽性
F	100	2.52	無し	陽性
G	500以上	0.72	無し	陰性
H	60	0.12	無し	陰性
I	60	0.12	無し	陽性
J	30		無し	陽性

*はH11 2月・6月の離乳・30kg まで死亡子豚数を母豚数で割り年換算した。

PRRS ウイルスは2農場のみ汚染していないが、他はすべて陽性農場であった。

次に PCV 陽性豚の病理所見を表4、5に示した。

表4 病理解剖所見

農場	PCV2検査 陽性頭数	病理解剖 検査頭数	肺検査 頭数	リンパ節腫脹		
				頸部	肺門	腸
A	7	6	6	1	4	4
B	5	5	5	4	4	3
C	3	3	1	2	1	2
D	4	4	4	3	3	2
E	10	4	2	3	2	1
F	5	5	4	4	3	3
G	10	7	6	4	3	3
H	1	1	1	1	0	0
I	1	1	0	0	1	0
J	1	1	0	1	0	0

表5 病理組織検査所見

農場名	PCV2検査 陽性頭数	病理組織 検査頭数	間質性 肺炎	封入体	リンパ球減少 細網細胞活性化	
					細網	細胞
A	7	7	5	5		6
B	5	5	4	4		4
C	3	1	1	0		1
D	4	4	4	0		0
E	10	4	4	2		4
F	5	5	4	1		3
G	10	7	1	0		3
H	1	1	0	0		0
I	1					
J	1	1	1	0		1

肉眼的には肺の肝変化病変とリンパ節の軽度の腫脹が共通して認められた。一方組織所見では、間質性肺

表6 細菌検査成績

陽性 農場	検査 頭数	<i>P. mul</i>	<i>App2t</i>	分 離 菌 <i>H. Parasuis</i>	<i>Str. suis</i>	<i>Str. sp</i>	<i>St. aureus</i>	<i>E. coli</i>
A	7	3		3				
B	5	1			1			
C	3	1	1		1			
D	4				2	3		
E	10	2	2					
F	4		1		2		1	
G	10	1	5			2		1
H	1	1						
I	1		1		1			
J	1			1				

炎の出現率はPRRS ウイルス汚染農場では高いものの陰性農場では低く、PRRS ウイルスの関与が重要と推定され、pmws PCV 単独感染による主要病変と言えないかも知れない。

他の病原体との混合感染について、病性鑑定に供した pmws PCV 陽性豚のうち、他の病原体についての検索結果を表6と7にまとめた。

細菌検査成績では、農場ごとに連鎖球菌や App 2 の分離が多く見られた。

PRRS ウイルスは pmws PCV 陽性豚の69%までが陽性であり、感染時期がほぼ同じで、また、中和抗体産生まで約1ヶ月近くを要し、その間ウイルス血症が持続するPRRS ウイルスの混合感染が野外における発病の重篤化に重要な因子と考える。

豚パルボウイルスは感染実験レポートなどから、PMWS の因子として報告されているが、今回、Rodrigo らのプライマー⁴⁾によるPCRを実施したがいずれの野外例からも検出されなかった。

まとめおよび考察

pmws PCV 感染の病理組織所見による推定から、

表7 ウイルス検査成績

農場名	PRV2検査 陽性頭数	PRRSV 検査頭数	PRRSV 陽性頭数	P P V P P V 検査頭数	陽性頭数
A	7	7	7	1	0
B	5	5	5	5	0
C	3	3	3	2	0
D	4	4	4	3	0
E	10	10	9	6	0
F	5	2	1	0	
G	10	10	0	2	0
H	1	1	0	0	
I	1	1	1	0	
J	1	1	1	0	

*豚コレラは全頭陰性、本県はAD 陰性

PCRによる検出ならびにRFLPによる同定までの病性鑑定作業は最近のインターネット等のインフラの整備により、以前に比べれば遙かに迅速な対応が可能になった。野外調査の結果から pmws PCV はすでに広く蔓延しており、本ウイルスの環境抵抗性の強さと増殖・感染力の強さを示唆している。新規感染症の国内侵入については、疾病自体の重要度ならびに防疫処置の必要度に対する評価が確立していない場合、有効な防疫対応ができず、蔓延を防げなかった。病原性の軽重について議論しがちではあるが、国内に pmws PCV という新たな病原体の侵入をうけ、農場内に既存の各種病原体との混合感染によって種々の疾病発生が予測される今、その経済的損失について農場データの積み重ねが必要と考えられる。

謝辞

御協力ご指導いただきました家畜衛生試験場の研究員各位に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Onuki, A. et al. (1999). Detection of Porcine Circovirus from Lesion of a Pig with Wasting Disease in Japan. Jpn. J. Vet. Med. Sci., 61: 1119-1123.
- 2) Hennings, J. C., et al. (1995) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 1730-1734.
- 3) Hamel, A. L., et al. (1998). Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. J. Virol. 72: 5262-5267.
- 4) Rodrigo, M.S., et al. (1999) Detection of porcine parvovirus DNA by polymerase chain reaction assay using primers to highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. J. Virol. Methods 78: 191-198.