

国内の豚における Porcine circovirus2
および *Lawsonia intracellularis* の疫学的及び
分子生物学的解析による特徴付け

Studies on the characterization of Porcine circovirus 2
and *Lawsonia intracellularis* detected in Japan by
epidemiological and molecular biological analysis

2018

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 分子生物学研究室
DV1403 小池 郁子

目次

緒言	1
第1章 PCV2 の疫学的及び分子生物学的解析	
1) PCV2 発生状況の調査	2
図	7
2) 2015 年の国内の豚の PCV2 遺伝子型	8
図表	15
3) 2009 年から 2016 年の国内の PCV2 の疫学的調査	18
図表	25
第2章 ローソニアの疫学的及び分子生物学的解析	
1) ローソニアの疫学的調査	32
図	36
2) ローソニアの分子生物学的調査	37
図表	45
総括	55
General Overview	58
引用文献	62
謝辞	68

緒言

豚の飼養形態は大規模化しており、特に日齢ごとに大群で飼育する豚舎が増加している。それに伴い農場内に常在化している病原体は、垂直感染から水平感染を繰り返すことで広がり、対策が困難な状況となっている（大兼ら；1999）。

その中でも、Porcine circovirus 2（以降 PCV2）および *Lawsonia intracellularis*（以降ローソニア）の日本国内の抗体陽性率は 100% に近く（川本ら；2006、川嶌ら；2008）、陰性化は困難な状況にある。そして一旦発育不良や下痢が発生すると、抗生物質などによる治療効果も期待できず、複合感染などにより死亡に至った場合、経済的な被害は甚大となる。そのため国内での養豚産業にとって、今後も対策を考えていかなければならない重要な慢性疾病である。

しかし、慢性疾病に対する野外感染の実態を示した疫学的な調査と分子生物学的な調査を合わせた報告は少なく、特に国内では報告がないため、この 2 つの病原体の、野外感染豚を対象とした調査を行うことで対策の一助となるよう、疫学的、分子生物学的解析を行った。PCV2 については第 1 章に、ローソニアについては第 2 章に報告する。

[第1章] PCV2 の疫学的及び分子生物学的解析

1) PCV2 発生状況の調査

1. 序論

豚サーコウイルス (porcine circovirus: PCV) は、サーコウイルス科サーコウイルス属に属するエンベロープを持たない最小のウイルスであり、約 1.77 kb の環状一本鎖 DNA をゲノムとする。PCV は、PCV1 と PCV2 (Allan et al, 1999) および PCV3 (Palinski et al, 2016) があり、PCV1 は非病原性とされている。PCV2 は、離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) や流死産、豚皮膚炎腎症症候群 (PDNS)、肥育豚の呼吸器病など様々な症状を引き起こすことから、豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) と総称され (Opriessnig et al, 2007)、1990 年代後半より世界中の養豚産業に深刻な経済的被害を与えている。

PCV3 は 2016 年にその存在が確認され、PCV2 と同様に豚皮膚炎腎症症候群 (PDNS) に関与している可能性が示唆されている (Palinski et al, 2016)。

PCV2 は、一般的に、カプシドタンパク質をコードする ORF2 遺伝子 (702~705bp) の塩基配列に基づいた分子系統学的解析により、現在 a~e の 5 つの遺伝子型に分類されている (Segales et al; 2008、Guo et al, 2010)。2001 年から 2004 年ころまでに検出された PCV2 の遺伝子型は、PCV2a がほとんどであったが、2005 年頃に、流行株が PCV2a から PCV2b に置き換わるのに合わせて、PCVAD の発生被害が深刻となっている (Gagnon et al, 2007)。2008 年頃からは、PCV2a を抗原としたワクチンが世界的に普及したことで、PCVAD の症例は減少した。しかし、2012 年に、北米のワクチン接種農場で、PCVAD の症例が増加

し、その時検出された株の遺伝子は、それまでアメリカで確認されていなかった PCV2d に属する株で、mPCV2 と呼ばれている。

この mPCV2 は実験感染により、他の遺伝子型と比較して増殖能力が高いことがわかっている (Opriessnig et al, 2013; Opriessnig et al, 2014)。mPCV2 による PCVAD の発生以降、mPCV2 と同じクラスターに入る株が、アメリカだけでなくブラジルや中国などでも流行株となり、PCVAD の被害の増加が報告されている (Salgad et al, 2014)。

国内での PCVAD の発生状況と遺伝子型については、2007 年頃まで PCV2a が優勢であったが、2008 年頃より PCV2b が流行株となり、PCVAD の被害が報告された (Takahagi et al, 2010)。しかし PCV2 ワクチンが普及してからの PCV2 の検出状況の報告はない。そのため、国内の状況について調査することとした。

2. 材料と方法

材料

著者が所属する診断センター（エス・エム・シー株式会社）に、2007年から2015年に、病性鑑定の目的で持ち込まれた死亡豚合計3,393検体（年平均377検体）の肺または肺門リンパ節、鼠経リンパ節を用いた。

方法

DNA抽出とPCR

核酸抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit, 株キアゲン, 東京）を用い、マニュアルに従い肺またはリンパ節からDNA抽出を行った。

PCV2のORF1を増幅する部位のプライマー（Calsamiglia et al, 2002）を用い、PCR試薬（Emerald Amp PCR Master Mix, タカラバイオ株, 滋賀県）、鋳型DNA1.0 μ Lを用いて、最終液量を25 μ LとしてPCRを行った。反応条件は、94°C3分の熱変性後、94°C30秒、60°C30秒、72°C1分30秒間のサイクルを35回繰り返し、最後に72°C10分間の伸長とした。アガロースゲル電気泳動により目的のサイズである約1,013bpの増幅産物の確認をした。

3. 結果

PCV2 のワクチンが発売された 2008 年の PCV2 検出率は 33.0% と最も高く、2010 年は 28.6% となり、2013 年には 7.5% にまで減少していた。しかし、2014 年には 16.7%、2015 年は 22.0% と再び検出率が上昇していた。（図 1）

4. 考察

国内の死亡豚からの PCV2 検出率は、流行株が PCV2a から PCV2b に代わった 2008 年に、前年の 3 倍に増加していた。PCV2 ワクチンが普及した 2010 年以降は減少し、2013 年には PCV2b が流行株となる以前の 2007 年の検出率を下回り、ワクチン接種の普及とその効果と考えられた。しかし、2012 年にアメリカのワクチン接種農場での mPCV2 による PCVAD の被害が報告された後の 2014 年以降、再び上昇に転じ 2009 年のワクチン発売直後の検出率を上回っていた。

今回調査した死亡豚のほとんどが、PCV2 ワクチンを接種している農場であった。そのため、2014 年以降の検出率上昇の要因が、PCV2b によるものか、PCVAD 発症の報告が増加しているアメリカ、ブラジル、中国などで流行株となっている mPCV2 と同じクラスターに入る株によるものなのか確認することとした。

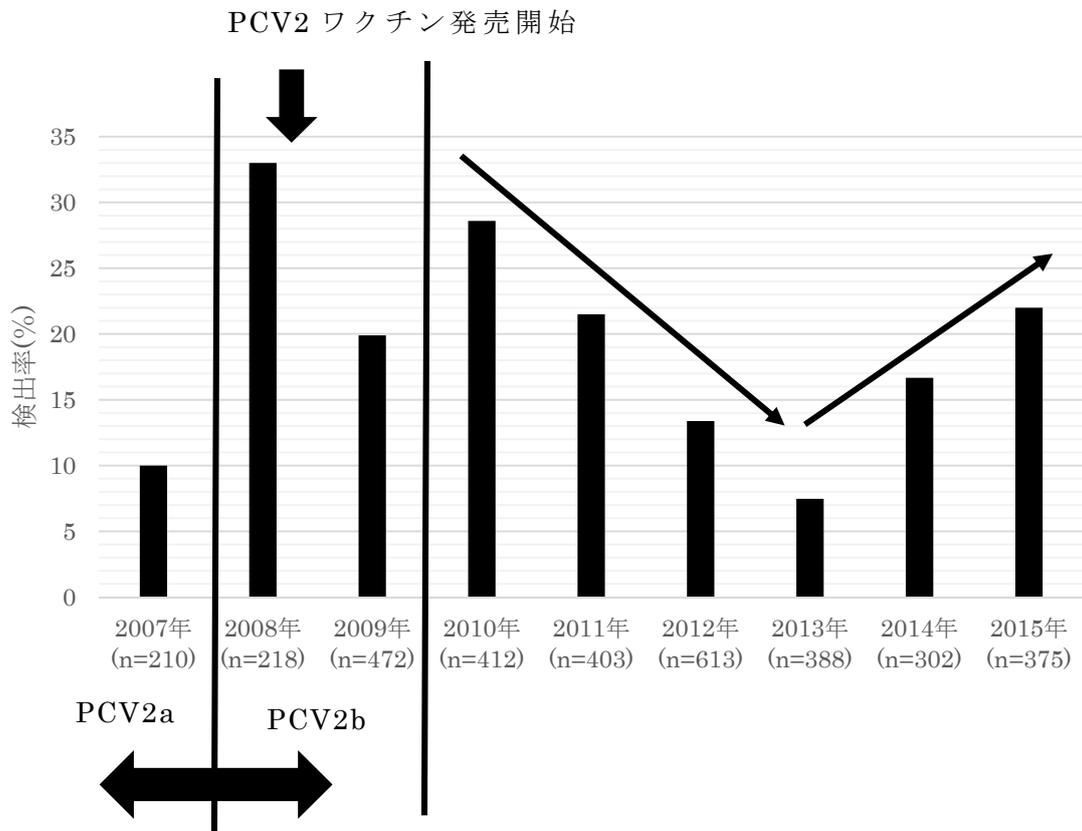


図 1 . 2007 年～2015 年の死亡豚からの PCV2 遺伝子検出率
(n は検体数)

2) 2015 年の国内の豚の PCV2 遺伝子型

1. 序論

国内の死亡豚での PCV2 検出率は、PCV2 ワクチンの普及後減少傾向にあったが、2014 年より再び上昇していることが確認された。そのため、前述の mPCV2 に属するクラスターの株が国内に存在しているか、そして検出率の上昇への関与を調査するため、上昇の認められた 2015 年春のワクチン接種農場の健康豚より検出された PCV2 の株について、遺伝子検査による分子疫学的調査を行った。

2. 材料と方法

(1) PCV2 感染状況の確認

材料

PCV2 ワクチンの接種が開始される前の 2008 年に、24 農場の繁殖用母豚、60 日齢、90 日齢の仔豚から採血した血液を血清分離し、 -80°C フリーザーに保管されていた血清合計 618 検体を使用した。

方法

保存していた血清は、ORF 1 を抗原とした PCV2-ELISA 検査 (SERELISA®PCV2 Ab Mono Blocking、ゾエティス、フランス) のマニュアルに従って PCV2 抗体の検出を行った。ELISA 抗体価が 0.2 以上を移行抗体あるいは感染抗体陽性と判定した。

(2) PCV2 検出状況の確認

材料

(1)の PCV2-ELISA にて PCV2 抗体の陽性が確認された 24 農場の、2009 年から 2015 年までに繁殖用母豚、および 30 日齢、60 日齢、90 日齢、120 日齢、150 日齢の仔豚から採血した血液を血清分離し、 -80°C フリーザーに保管されていた血清合計 6,094 検体を使用した。

血清は使用時に各農場で、日齢ごとに 3~5 個体ずつの血清を 1 グループとして混和したものを 1 検体とし、計 1,992 検体を用いた。

方法

DNA 抽出と SYBR Green リアルタイム PCR

核酸抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit, 株キアゲン, 東京) を用い、マニュアルに従い血清から DNA 抽出を行った。

リアルタイム PCR は PCV2 の ORF2 部位を増幅するプライマー1094F および 1569R (Dezen et al, 2011) 各 5pmol を用い、SYBER Green PCR masuter mix (SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 東洋紡, 大阪) 12.5 μ L、鋳型 DNA 3.0 μ L を用いて、最終液量を 25 μ L としてリアルタイム PCR (7300 Real-time PCR System, Applied Biosystems 社, 東京) を行った。反応条件は、50°C 2 分後 95°C 10 分の熱変性後、95°C 15 秒、62°C 30 秒のサイクルを 40 回繰り返す、その後融解曲線分析を行い、コピー数が既知の検体を用いて検量線を作成し相対定量を求めた。(データは示していない)。

(3) PCV2 遺伝子型の調査

材料

2015 年 5 月～6 月に、PCV2 ワクチン接種を行っている農場で、前述の(1)の PCV2 抗体検査にて PCV2 の浸潤が確認され、(1)の試験により PCV2 の検出率が上昇していた 21 農場 (青森県 1、福島県 1、埼玉県 1、千葉県 5、神奈川県 11、広島県 1、熊本県 1 農場)において、健康な繁殖用母豚及び 30、60、90、120、150 日齢の離乳後子豚を選び、合計 530 個体から血清を採取した。そして各農場で日齢ごとに 3～5 個体ずつの血清を 1 グループとして混和したものを 1 検体とし、30 日齢 20 検体、60 日齢 21 検体、90 日齢 21 検体、120 日齢 21 検体、150 日齢 21 検体、繁殖用母豚 59 検体の計 163 血清を用いた。

方法

DNA 抽出と PCR

核酸抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit, ㈱キアゲン, 東京) を用い、マニュアルに従って、血清検体から DNA 抽出を行った。PCR は、PCV2 の ORF2 を含む領域を増幅するプライマー配列を設計し (5' -CCATGCCCTGAATTTCCATA-3' と 5' -GGGCACCAAATACCACTTC-3')、PCR 試薬 (Emerald Amp PCR Master Mix, タカラバイオ㈱, 滋賀県)、鋳型 DNA 1.0 μ L を用いて、最終液量を 25 μ L として PCR を行った。反応条件は、94°C 3 分の熱変性後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒間のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C 10 分間の伸長とした。アガロースゲル電気泳動により目的のサイズである約 1,080bp の増幅産物の確認をした。

塩基配列決定と分子系統樹解析

増幅産物を精製用試薬 (EXO SAP-IT, Affymetrix/USB 社) で処理して精製したのち、シーケンシング試薬 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing キット, Applied Biosystems 社, 東京) 及びシーケンサー (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems 社, 東京) を用いて、PCR で使用したプライマーを用いて、ダイレクトシーケンス法により両鎖から塩基配列を決定した。

得られた ORF2 全領域の塩基配列データと国際 DNA データベースに登録されている PCV2 の遺伝子型 a~e の代表的な 66 株 (国内検出株 15 株を含む) (Segales et al, 2008 ; Takahagi et al, 2010 ; Opriessnig et al, 2013 ; Opriessnig, 2014) の ORF2 配列データを基にして、MEGA version 6.0 ソフトを用いて ClustalW 法 (Thompson et al ; 1994) と近隣結合法 (2000 ブートストラップ) (Felsenstein et al, 1985) により分子系統解析を行った。得られた塩基配列をもとに配列間の距離が $p < 0.035$ を同一の遺伝子型として、各遺伝子型を

決定した (Segales et al ; 2008、Guo et al, 2010)。遺伝子型名は、Davies らの表記に従った (Davies et al, 2016)。

3. 結果

調べた血清 163 検体中 10 検体が、PCR により PCV2 陽性であった。内訳は 30 日齢が 1 検体、60 日齢が 4 検体、90 日齢が 1 検体、120 日齢が 2 検体、150 日齢が 2 検体であった。繁殖用母豚からは PCV2 陽性検体は確認されなかった。陽性検体は、7 農場（神奈川県 3 農場、広島県 1 農場、青森県 1 農場、千葉県 2 農場）からの検体であった。これら 10 検体の ORF2 全領域（702 または 705bp）の塩基配列を決定したところ、7 農場から各々異なる 7 株の配列情報が得られ、2 つの遺伝子型に分類された（表 1）。

7 株は、ヌクレオチド配列レベル（図 1）及び推定アミノ酸配列レベルの何れの系統樹においても、4 株（神奈川県 3 農場由来、広島県 1 農場由来）は遺伝子型 PCV2a、3 株（青森県 1 農場由来、千葉県 2 農場由来）は遺伝子型 PCV2d に型別された。また、PCV2d に型別された 3 株は、2012 年に北米で報告された mPCV2（AccessionNo. JX535296）と同じクラスター（図 1 のクラスター d-1）に区分され、2008 年に国内で検出された株（AccessionNo. AB462384）とは異なっていた。

4. 考察

今回の PCV2 遺伝子調査において、2008 年以前に国内で優位に認められていた PCV2a と、2012 年以降世界的に増加傾向にある PCV2d の 2 つの遺伝子型が確認された。

分子系統解析により、今回検出された PCV2d の 3 株はいずれも 2008 年に日本で確認された PCV2d 株とは異なり、2012 年に北米で検出された mPCV2 と同じクラスター d-1 に属していた。

mPCV2 が検出された北米の農場では、PCVAD の顕著な増加が報告されているが (Opriessnig et al, 2013) 、今回の調査で検出された PCV2d の株は全て健康豚由来で、これらの株が検出された農場で、PCV2 ワクチン接種以降 PCVAD は認められていなかった。

また、疫学的に PCV2d-1 の株が検出された青森県 1 農場と千葉県 2 農場間につながりはなく、農場間はそれぞれ 80Km 以上離れていた。よって PCV2d の株が人、餌、糞便などを介して各農場間を伝播した可能性は低いと考えられた。一方、各農場の繁殖候補豚はいずれも外部から導入されており、導入豚が PCV2d 株の侵入に関与した疑いがあり (Franzo et al, 2015) 、今回の調査により PCV2d-1 がすでに国内で広く浸潤している可能性が考えられた。

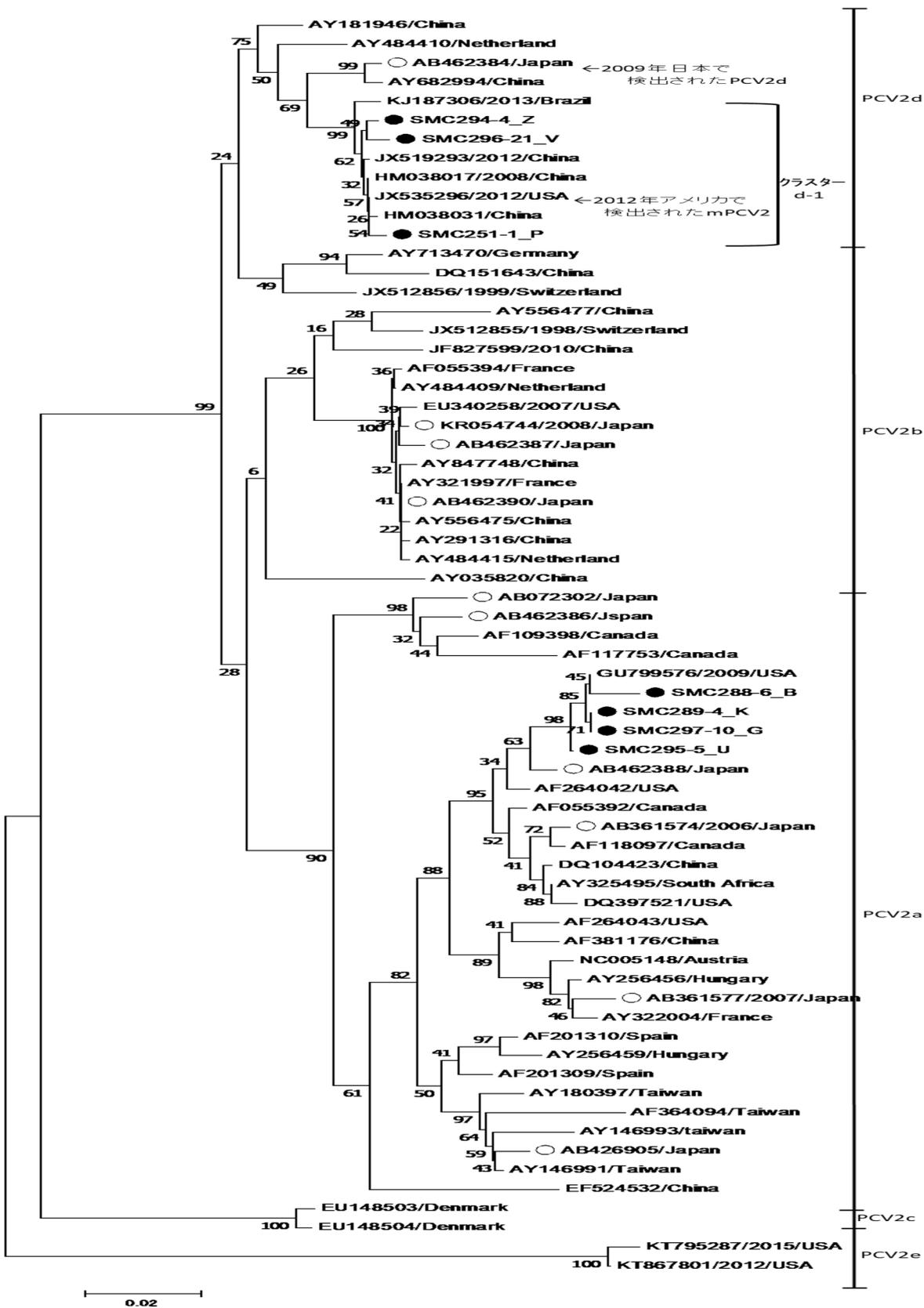


図 1 . PCV2-ORF2 領域のヌクレオチド配列に基づく ClustalW による近隣結合法を用いた分子系統樹

国際 DNA データベースに登録されている代表的な PCV2 株をアクセッション番号で示した。本研究で得られた 7 種類の配列に●を記した。○は 2001 年～2009 年に国内で検出された株であることを示す。アクセッション番号 JX535296 は、2012 年に北米で検出された mPCV2 株を、アクセッション番号 AB462384 は、2008 年に国内で検出された PCV2d 株を示す。系統樹中に示した数字はブートストラップ値を示す。

表 1. 本調査で検出された PCV2 の採材場所と遺伝子型

採材県	農場名	株名	採材時期	遺伝子型	ORF2塩基数
神奈川県	B農場	SMC288-6	2015年5月	a	702
神奈川県	K農場	SMC289-4	2015年5月	a	702
神奈川県	G農場	SMC297-10	2015年6月	a	702
広島県	U農場	SMC295-5	2015年5月	a	702
千葉県	Z農場	SMC294-4	2015年5月	d	705
千葉県	V農場	SMC296-21	2015年5月	d	705
青森県	P農場	SMC251-1	2015年6月	d	705

3) 2009年から2016年の国内のPCV2の疫学的調査

1. 序論

PCV2dは、ORF2のストップコドンの前にCTTの挿入により、702bpが705bpとなった遺伝子型（Opriessnig et al, 2013）で、mPCV2は感染実験において、病原性の強さに違いはないが、他の遺伝子型と比較してその増殖力の強さが示唆され、mPCV2と同じクラスターに属するPCV2d-1は、ワクチン接種農場のPCVAD発症豚から検出されている（Opriessnig et al, 2014）。

前述の2015年春の国内のPCV2の遺伝子型の調査で、2012年に北米で検出されたmPCV2株と同じクラスターに属するPCV2d-1の株が国内に存在することが初めて明らかとなったため、PCV2d-1の浸潤状況を調査するため、過去にさかのぼり、保存していた血清を用いて先の調査でPCV2d-1が検出された農場を含む、2009年から2016年に範囲を広げて、PCV2の塩基配列を調査し遺伝子型の検出地域と継時的変化を調査した。

2. 材料と方法

材料

前述の PCV2 の浸潤調査と同様の PCV2-ELISA 検査において、PCV2 の抗体陽性が確認されている農場を対象とした。

国内 19 農場（青森県 1、千葉県 7、神奈川県 8、栃木県 1、広島県 1、熊本県 1 農場）（表 1）において、30 日、60 日、90 日、120 日、150 日齢の健康な肥育豚および母豚を 2009 年～2016 年の各年の春と秋の 2 回採血して血清分離を行った。合計 4,156 検体は、検査に使用するまでは -80°C フリーザーに保存した。保存した血清は、各農場で繁殖用種豚および日齢ごとに混和して、国内での口蹄疫や PED 発生の影響などにより検体数が少ない年もあったが、計 1,120 検体を用いた。

方法

DNA 抽出と PCR

核酸抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit, (株)キアゲン, 東京）を用い、マニュアルに従って、血清検体から DNA 抽出を行った。PCR は、2015 年春の調査で使用したプライマーを用い、PCR 試薬（Emerald Amp PCR Master Mix, タカラバイオ(株), 滋賀県）、鋳型 DNA $1.0\ \mu\text{L}$ を用いて、最終液量を $25\ \mu\text{L}$ として PCR を行った。反応条件は、 94°C 3 分の熱変性後、 94°C 30 秒、 60°C 30 秒、 72°C 1 分 30 秒間のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C 10 分間の伸長とした。アガロースゲル電気泳動により目的のサイズである約 1,080bp の増幅産物の確認をした。

塩基配列決定と分子系統樹解析

増幅産物を精製用試薬 (EXO SAP-IT, Affymetrix/USB 社) で処理して精製したのち、シーケンシング試薬 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing キット, Applied Biosystems 社, 東京) 及びシークエンサー (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems 社, 東京) を用いて、PCR で使用したプライマーを用いて、ダイレクトシークエンス法により両鎖から塩基配列を決定した。

得られた ORF2 全領域の塩基配列データおよび 2015 年春の調査で得られた 7 株と国際 DNA データベースに登録されている PCV2 の遺伝子型 a～e の代表的な 66 株 (国内検出株 15 株を含む) (Segales et al, 2008; Takahagi et al, 2010; Opriessnig et al, 2013; Opriessnig, 2014) の ORF2 配列データを基にして、MEGA version6.0 ソフトを用いて ClustalW 法 (Thompson et al;1994) と近隣結合法 (2000 ブートストラップ) (Felsenstein et al, 1985) により分子系統解析を行った。遺伝子型名は、Davies らの表記に従った (Davies et al, 2016)。

3. 結果

3-1. PCV2-ORF 2 の塩基配列解析および遺伝子系統樹

本研究で調査した 1,120 検体中 67 検体(6.0%)の塩基配列解析から、2)の 10 検体 7 株を含めた 34 株の PCV2 株が得られ、DDBJ に登録した。(AccessionNos. LC278320~LC278353)。PCV2a は 49.0% (30/77) 12 株(図 1)。PCV2b は 39.0% (30/77) 12 株(図 2) PCV2d は 20.8% (16/77) 2 株(図 3)で、系統樹解析(図 4)によりすべて PCV2d-1 に属していた。PCV2e は 2016 年に 1 株確認され、2013 年にアメリカで検出された株(KT867794)と同一であった。

3-2. ワクチン接種農場での PCV2 遺伝子型の経時的推移

PCV2 遺伝子が検出された 67 検体のうち、ワクチン接種豚は 29 検体(48.1%)であった。PCV2d-1 および PCV2e は全てワクチン接種豚からの検出であった。経時的にみると(図 5)、PCV2d-1 は 2012 年から出現し始め、それ以降コンスタントに検出された。PCV2e は 2016 年に初めて確認された。

アメリカでの Xiao らの疾患豚および正常豚の肺組織の調査結果(Xiao et al, 2016)では、アメリカでも 2012 年から PCV2d-1 (Xiao らの分類表記では PCV2d-2 に相当する)が検出されはじめ、2015 年からは PCV2e が確認されていた(図 6)。

3-3. 国内の地域における遺伝子型の検出状況

PCV2d-1 の検出地域は、表 1 に示したように、千葉県の V 農場と神奈川県 S 農場の 2 農場で PCV2d-1 が 2012 年より検出され、2015 年には青森県の P 農場、栃木県の AA 農場、2016 年には熊本県の N 農場でも PCV2d-1 が検出された。また、PCV2e は 2016 年の神奈川県 CC

農場より検出された。尚、PCV2d-1 と PCV2e が検出された 9 農場は PCV2 が検出される前の 21 日齢で PCV2 ワクチンを接種していた。

4. 考察

本調査で、増殖能力の高い mPCV2 と分子系統学的に同じクラスターである PCV2d-1 に属する株が、2012 年に関東で確認された。2015 年には関東だけでなく東北、2016 年には九州と広範囲に感染していることがわかった。また 2015 年にアメリカで報告のあった PCV2e が国内の豚にも感染していることを初めて確認した。尚、PCV2e については塩基配列が他の遺伝子型と大きく離れているが、病原性や増殖能力についてはまだわかっていない。

日本での PCV2d-1 および PCV2e の検出時期とその割合はアメリカでの状況とほぼ一致していたことを考慮すると、感染経路として 3 つの可能性が考えられた。

1 つ目は、アメリカから定期的に輸入されている繁殖用豚または精液を介して、国内に広がった可能性が推察できる。今回、PCV2d-1 および PCV2e が検出された 9 農場は、海外から直接繁殖用豚や精液を輸入しておらず、生体の導入元も共通していないことから、これらが直接の原因の可能性は低い。

2 つ目の経路として、海外の報告で、豚の血漿蛋白を原料とした飼料から PCV2 遺伝子が検出され、その飼料を使った感染実験において、PCV2 の感染が成立したとの報告 (Patterson et al, 2010) があることから、飼料からの感染が疑われた。飼料中への PCV2 の混入については今回調べていないが、血漿蛋白を配合した飼料をワクチン接種前の仔豚期に給与していたことが確認され、侵入経路としてその可能性が考えられた。

3 つ目の経路として飼料運搬容器や運搬トラックが疑われた。PCV2d-1 および PCV2e が検出された 9 農場のうち 8 農場で PED ウイルスの侵入が確認されており、PCV2d-1、PCV2e が検出されなかった残り

の 10 農場は、調査期間中 PED ウイルスの侵入は認められなかった。国内での PED 侵入のリスクファクターとして飼料トラックの運搬回数が挙げられており (Sasaki et al, 2016)、PCV2 の感染経路としても考えられた。

以上より、ワクチン接種農場において増殖能力の高い PCV2d-1 が 2012 年より国内に広く浸潤していた。さらに 2016 年には新たに PCV2e が国内に存在していることが初めて確認された。

今後も、国内および海外での発生状況を監視し、導入豚や精液だけでなく輸入飼料および運搬経路中の PCV2 の検査と PCV2 遺伝子型のモニタリングを行っていく必要があると考えられた。

```

AB072302.PCV2a 1 ATGACGTATCAAGAGGCGTTACCGCAGACGAAGACACGCCCGCAGCCATCTGGCCAGATCTCCCGCGCCCGCTGGCTGCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCC 150
AB462388.PCV2a 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
89-10(LC278320) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
92-13(LC278321) 1 .....C.....A.....G.....G.....A..... 150
112-17(LC278322) 1 .....C.....A.....C.....T.....T..... 150
126-7(LC278331) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
140-7(LC278332) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
155-25(LC278333) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
252-9(LC278339) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
270-4(LC278340) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
277-8(LC278341) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
288-6(LC278346) 1 .....C.....T.....A.....C.....T..... 150
309-10(LC278350) 1 .....C.....A.....C.....T.....T..... 150
320-4(LC278347) 1 .....C.....A.....C.....T..... 150
*****

AB072302.PCV2a 151 CGCACCTTCGGATATACTGTTAAGGCTACCACAGTAAGAAGCCCTCCCTGGGCGGTGGACATGCTGAGATTTAAATTTGACGACTTGTTCCTCCAGGAGGGGGCAACAATAATCTCTATACCTTTGAACTACAGAAATAGAAG 300
AB462388.PCV2a 151 .....C.....C.....A.....T.....G..... 300
89-10(LC278320) 151 .....C.....CG.....C.....C.....G..... 300
92-13(LC278321) 151 .....C.....C.....G.....G..... 300
112-17(LC278322) 151 .....C.....C.....A.....T.....G.....T..... 300
126-7(LC278331) 151 .....C.....C.....A.....TC.....G.....T.....A 300
140-7(LC278332) 151 .....C.....C.....A.....T.....G..... 300
155-25(LC278333) 151 .....C.....C.....A.....TC.....G..... 300
252-9(LC278339) 151 .....C.....C.....G.....A.....C..... 300
270-4(LC278340) 151 .....C.....C.....G.....A.....TC.....G.....T.....M.....A.....A 300
277-8(LC278341) 151 .....C.....C.....S.....G.....TC.....G.....T.....A.....A 300
288-6(LC278346) 151 .....C.....C.....A.....TC.....G.....T.....A.....A 300
309-10(LC278350) 151 .....C.....C.....A.....TC.....G.....T.....R..... 300
320-4(LC278347) 151 .....C.....C.....A.....TC.....G.....T.....R.....A 300
*****

AB072302.PCV2a 301 GTTAAAGTTGAATCTGGCCCTGCTCCCAATCACCAGGGTGACAGGGAGTTGGATCCAGTCTGTTATTTCTAGATGATACTTTGTAACAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCCTATGTAACACTCTCCCGCATACCATA 450
AB462388.PCV2a 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....A.....AC.....A.....A.....C 450
89-10(LC278320) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....A.....C.....A.....A.....C 450
92-13(LC278321) 301 .A.G.....A..... 450
112-17(LC278322) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....C 450
126-7(LC278331) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....C 450
140-7(LC278332) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....A.....A.....A.....A.....C 450
155-25(LC278333) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....G.....AG.....A.....A.....A.....C 450
252-9(LC278339) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....C.....A.....A.....A.....A.....C 450
270-4(LC278340) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....A.....C 450
277-8(LC278341) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....A.....C 450
288-6(LC278346) 301 .....G.....T.....C.....T.....G.....C.....C.....T.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....A.....C 450
309-10(LC278350) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....A.....C 450
320-4(LC278347) 301 .....G.....C.....T.....G.....C.....C.....C.....T.....AT.....A.....A.....A.....A.....C 450
*****

AB072302.PCV2a 451 ACCGAGCCCTCTTACCACCTCCCGCTATTTCCCCCAAACTGTCTTGTGGGCAATCGATTACTTCCAACCAATAACAAGAAATCAACTCTGGCTGAGACTACAAACTCTGGAATGTAGACCATGTAGCCCTCGGCAT 600
AB462388.PCV2a 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....GA.....CT..A.....C..... 600
89-10(LC278320) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....GA.....CT..A.....G.....C..... 600
92-13(LC278321) 451 ..... 600
112-17(LC278322) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....T.....G.....G.....T.....GA.....CT..A.....G.....C..... 600
126-7(LC278331) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....GA.....CT..A.....G.....C..... 600
140-7(LC278332) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....T.....G.....G.....T.....GA.....CT..AA.....C..... 600
155-25(LC278333) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....GA.....CT..A.....G.....C..... 600
252-9(LC278339) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....G.....A.....G.....T.....G.....CT..A.....G.....C..... 600
270-4(LC278340) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....G.....CT..A.....G.....C..... 600
277-8(LC278341) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....G.....CT..A.....G.....C..... 600
288-6(LC278346) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....G.....CT..A.....G.....C..... 600
309-10(LC278350) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....T.....G.....G.....T.....GA.....CT..A.....G.....C..... 600
320-4(LC278347) 451 C..A.....T.....C.....A.....T.....CTCC..T..T.....A.....G.....G.....T.....G.....CT..A.....G.....C..... 600
*****

AB072302.PCV2a 601 GCGTTGCAAAACAGTAATACGACGAGACTACAATTCGGTGAACCTGATGTACAAATTACAGAAATTAATCTTAAAGACCCCACTTAAACCTAA 702
AB462388.PCV2a 601 .....T.....G..... 702
89-10(LC278320) 601 .....C..... 702
92-13(LC278321) 601 .....T.....A..... 702
112-17(LC278322) 601 .....T..... 702
126-7(LC278331) 601 .....C.T..... 702
140-7(LC278332) 601 .....T..... 702
155-25(LC278333) 601 .....T..... 702
252-9(LC278339) 601 .....T..... 702
270-4(LC278340) 601 .....C.T..... 702
277-8(LC278341) 601 .....C.T..... 702
288-6(LC278346) 601 .....T.....C.T.....G 702
309-10(LC278350) 601 .....T..... 702
320-4(LC278347) 601 .....C.T..... 702
*****

```

図 1. 本調査で検出され DDBJ に登録した PCV2a の塩基配列と 2008 年の日本検出株 (AB072302, AB462388) を比較した。サンプル名の括弧 () 内は登録したアクセッション番号を示す。

```

AB462387.PCV2b 1 ATGACGTATCCAAGGAGCGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCAGCCATCTGGCCAGATCTCCGCCCGCCCTGGCTGTCACCCCGCCACCGTTACCGTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTCAACCCCGCTCTCC 150
7-14(LC278352) 1 .....G.....A..... 150
77-8(LC278327) 1 .....G.....A..... 150
81-8(LC278326) 1 .....G.....A..... 150
108-7(LC278325) 1 .....G.....A..... 150
121-7(LC278329) 1 .....G.....A..... 150
122-10(LC278328) 1 .....T.....A..... 150
126-12(LC278330) 1 .....G.....A..... 150
192-9(LC278337) 1 .....G.....C.....R..... 150
206-9(LC278336) 1 .....G.....A..... 150
210-6(LC278335) 1 .....G.....A..... 150
309-7(LC278345) 1 .....G.....C..... 150
*****

AB462387.PCV2b 151 CGCACCTTGGATATCTGTCAAGCGAACACAGTCAGAACGCCCTCTGGGCGGTGGACATGAGATCAATATTAATGACTTTCTCCCGAGGAGGGGCTCAACCCCGCTCTGTGCCCTTGAATACTACAGAATAAGAAG 300
AY484409.PCV2b 151 .....A.....A..... 300
7-14(LC278352) 151 .....A..... 300
77-8(LC278327) 151 .....A..... 300
81-8(LC278326) 151 .....A...A...S..... 300
108-7(LC278325) 151 .....A.....A..... 300
121-7(LC278329) 151 .....A...A.....A..... 300
122-10(LC278328) 151 .....A.....A.....G..... 300
126-12(LC278330) 151 .....A.....A.....A..... 300
192-9(LC278337) 151 .....A.....A.....K.....A..... 300
206-9(LC278336) 151 .....A.....A..... 300
210-6(LC278335) 151 .....A.....A.....R..... 300
309-7(LC278345) 151 .....A.....A.....R..... 300
*****

AB462387.PCV2b 301 GTTAAGTTGAATCTGGCCCTGCCCGATCACCAAGGTGACAGGGAGTGGGCTCAGTGTCTATTCTAGATGATACTTTGTAACAAGGCCACAGCCCTCACTATGACCCCTATGTAACACTCTCCGCCATACCAT 450
AY484409.PCV2b 301 .....A.....A..... 450
7-14(LC278352) 301 .....C..... 450
77-8(LC278327) 301 .....A..... 450
81-8(LC278326) 301 .....A.....A..... 450
108-7(LC278325) 301 .....R.....A.....A..... 450
121-7(LC278329) 301 .....A.....A.....A..... 450
122-10(LC278328) 301 .....A.....A..... 450
126-12(LC278330) 301 .A.....A.....A..... 450
192-9(LC278337) 301 ..... 450
206-9(LC278336) 301 .....A.....A..... 450
210-6(LC278335) 301 .....A.....R..... 450
309-7(LC278345) 301 ..... 450
*****

AB462387.PCV2b 451 ACCCAGCCCTCTCTACCACCTCCCGCTACTTTACCCCAACCTGCTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCAACCAACAACAAAAGAAATCAGCTGTGGTGGAGACTCAAACTGCTGAAATGTAGACCAGTAGGCTCGGCACT 600
AY484409.PCV2b 451 .....A..... 600
7-14(LC278352) 451 .....C.....C..... 600
77-8(LC278327) 451 .....C..... 600
81-8(LC278326) 451 .....C..... 600
108-7(LC278325) 451 ..... 600
121-7(LC278329) 451 .....C..... 600
122-10(LC278328) 451 .....A..... 600
126-12(LC278330) 451 ..... 600
192-9(LC278337) 451 .....T..... 600
206-9(LC278336) 451 ..... 600
210-6(LC278335) 451 .....C..... 600
309-7(LC278345) 451 ..... 600
*****

AB462387.PCV2b 601 GCGTTCGAAACAGTATATACGACAGGAATACAATATCCGTGAACATGTATGTACAATTGAGAGAAATTAATCTTAAGACCCCACTTAAACCTTAA 702
AY484409.PCV2b 601 .....C..... 702
7-14(LC278352) 601 .....G.A..... 702
77-8(LC278327) 601 .A.....C..... 702
81-8(LC278326) 601 .....Y.....C..... 702
108-7(LC278325) 601 .....C..... 702
121-7(LC278329) 601 .....C..... 702
122-10(LC278328) 601 .C.....C..... 702
126-12(LC278330) 601 .....C..... 702
192-9(LC278337) 601 .....C..... 702
206-9(LC278336) 601 .C.....C..... 702
210-6(LC278335) 601 .A.....C..... 702
309-7(LC278345) 601 .....C..... 702
*****

```

図 2. 本調査で検出され DDBJ に登録した PCV2b の塩基配列と 2008 年の日本検出株 (AB462387) と比較した。サンプル名の括弧 () 内は登録したアクセッション番号を示す。

```

AB462384.PCV2d 1 ATGACGTATCCAAGGAGCGTTACCGAAGACGAAGGACCCGCCCGCAGCCATCTGGCCAGATCTCCGCCGCCCTGGCTGTCCACCCCGCCACCGTTACCGCTGGAGAAGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCGCTCTCC 150
JX535296.PCV2d 1 .....T..C.....A..... 150
33-13 (LC278351) 1 .....T..C.....A..... 150
198-10 (LC278335) 1 .....T..C.....A..... 150
233-12 (LC278338) 1 .....T..C.....A..... 150
274-17 (LC278340) 1 .....A..T..C.....A..... 150
296-21 (LC278344) 1 .....T..C.....A..... 150
*****

AB462384.PCV2d 151 CGCACCATCGGTTATACTGTCAAAGTACCACAGTAAGAACCCTCTCGAATGTGGACATGATGAGATTAATTAATGATTTTCTCCCGGAGGGGGCTCAAACCCCTCACTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGGAAG 300
JX535296.PCV2d 151 .....GAAA.....C...G..... 300
33-13 (LC278351) 151 .....GAAA.....C...G..... 300
198-10 (LC278335) 151 .....GAAA.....C...G..... 300
233-12 (LC278338) 151 .....GAAA.....C...G..... 300
274-17 (LC278340) 151 .....GAAA.....C...G..... 300
296-21 (LC278344) 151 .....GAAA.....C...G..... 300
*****

AB462384.PCV2d 301 GTTAAGGTTGAATTCGGCCCTGCCCAATCACCAGGGTGACAGGGGAGTGGGCTCCACTGCTGTTATTCTAGATGATACTTTGTAACAAAGGCAATGCCCTAACCTATGACCCCTATGTAACACTACTCTCCCGCATACCATA 450
JX535296.PCV2d 301 ..... 450
33-13 (LC278351) 301 A..... 450
198-10 (LC278335) 301 A..... 450
233-12 (LC278338) 301 ..... 450
274-17 (LC278340) 301 ..... 450
296-21 (LC278344) 301 ....A..... 450
****

AB462384.PCV2d 451 CCCCAGCCCTCTCTACCCTCCCGTATTTACCCCAACCTGCTCTTGATAGGACAATCGATTACTCCAACCAATAACAAAGAAATCAACTCTGGCTGAGACTACAACTACTGGAATGTAGACCATGTAGCCCTCGGCACT 600
JX535296.PCV2d 451 A.....G..C..T...G..... 600
33-13 (LC278351) 451 A.....G..C..T...G..... 600
198-10 (LC278335) 451 A.....A..C..T...G.....C..... 600
233-12 (LC278338) 451 A.....G..C..T...G..... 600
274-17 (LC278340) 451 A.....G..C..T...G..... 600
296-21 (LC278344) 451 A.....G..C..T...G.....C..... 600
*****

AB462384.PCV2d 601 GCGTTCGAAAACAGTATATACGACGAGACTACAATATCCGTATAACCATGTATGTAACAATTGAGAGAATTAATCTTAAGACCCCACTTAACCTAAGTGA 705
JX535296.PCV2d 601 ..... 705
33-13 (LC278351) 601 ..... 705
198-10 (LC278335) 601 ..... 705
233-12 (LC278338) 601 .....C..... 705
274-17 (LC278340) 601 ..... 705
296-21 (LC278344) 601 .....C.....T..... 705
*****

```

図 3. 本調査で検出され DDBJ に登録した PCV2d の塩基配列と 2008 年の日本検出株 (AB462384) と 2012 年に北米で検出された mPCV2 (JX535296) と比較した。サンプル名の括弧 () 内は登録したアクセッション番号を示す。

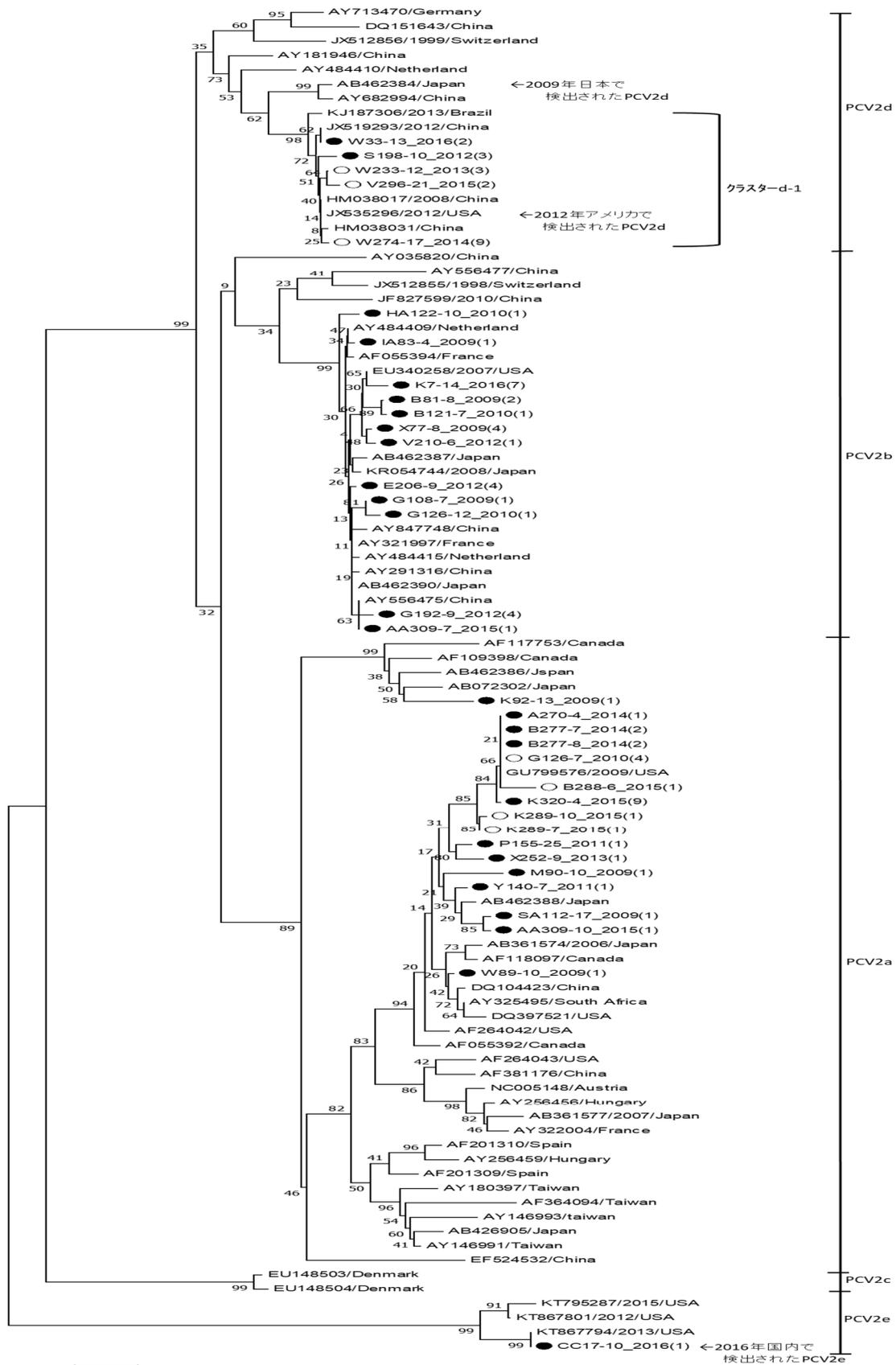


図 4. PCV2-ORF2 領域のヌクレオチド配列に基づく ClustalW による近隣結合法を用いた分子系統樹

国際 DNA データベースに登録されている PCV2 株をアクセッション番号で示した。2) で確認された 10 株を○および 3) で新たに得られた株を●で記した。() 内の数字は検出数を示す。

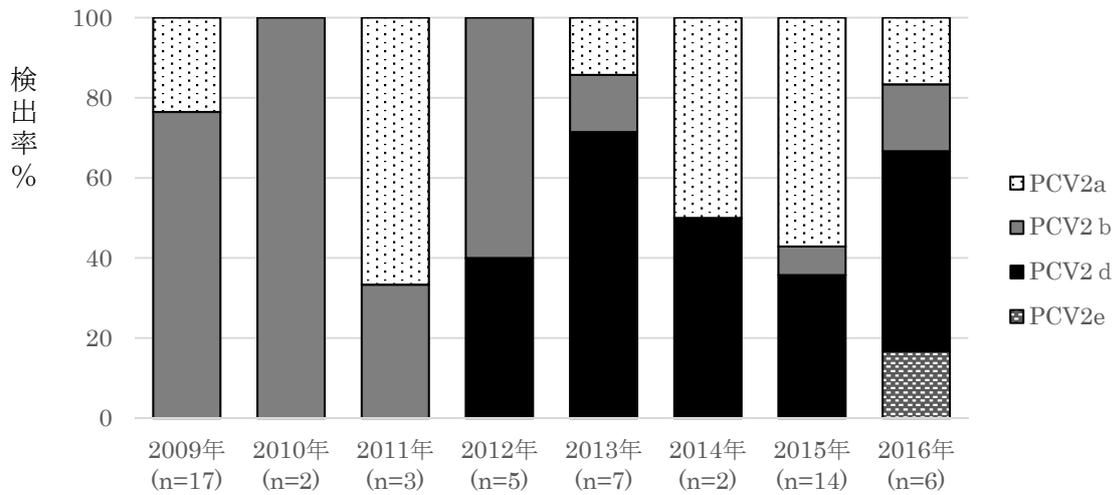


図 5. 日本でのワクチン接種豚から検出された PCV2 遺伝子型の検出率。
2009 年は国内でのワクチン販売前のため、ワクチン未接種豚での割合となる。n は検出数を示す。

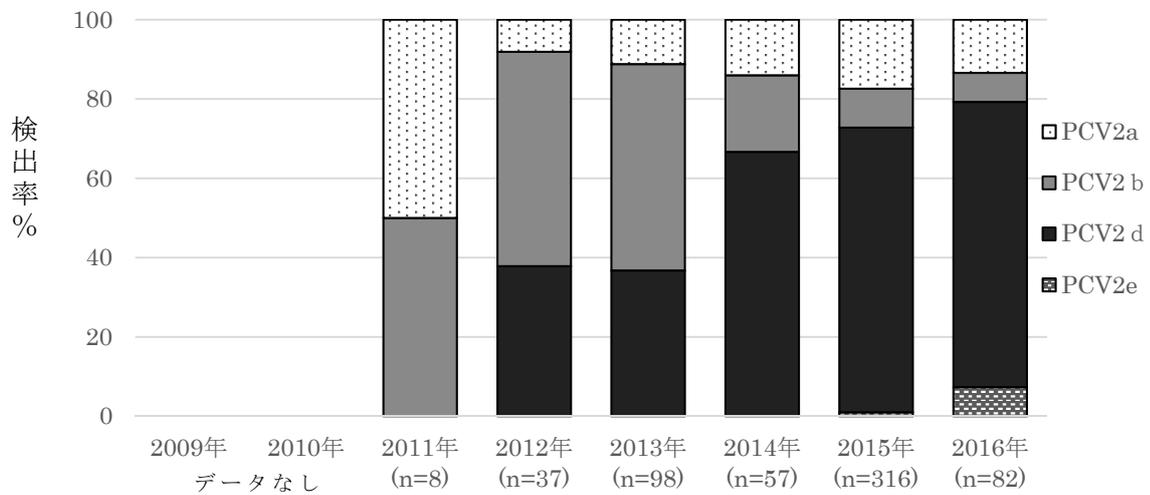


図 6. 2011 年からのアメリカでの PCV2 の遺伝子型の検出率。
Xiao らのデータ (Xiao et al, 2016) に基づいて図示した。

表 1. 2009 年～2016 年に各農場で検出された PCV2 の年毎の
遺伝子型別

	農場		県	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年		2016年
										春	秋	
1	P	東北	青森	—	—	2a	—	—	—	2d	—	—
2	SA	関東	千葉	2a	—	—	—	—	—	—	—	—
3	X		千葉	2b	—	—	—	2a	—	—	—	—
4	V		千葉	—	2b	—	2b	2d	—	2d	2d	—
							2d					
5	W		千葉	2a	—	—	—	2d	2d	—	—	2d
6	L		千葉	2b	—	—	—	—	—	—	—	2d
7	Z		千葉	—	—	—	—	—	—	2d	—	—
8	AA		栃木	—	—	—	—	—	—	—	2a	—
											2b	
											2d	
16	S		神奈川	2b	—	—	2d	2d	—	—	—	—
9	Y		神奈川	—	—	2a	—	—	—	—	—	—
10	A		神奈川	—	—	—	—	—	2a	—	—	—
11	K		神奈川	2a	—	2b	2b	2b	—	2a	2a	2b
				2b								
12	B	神奈川	2b	2b	—	—	2a	2a	2a	2a	2a	
13	G	神奈川	2b	2a	—	2a	2a	—	2a	—	—	
				2b		2b						
14	HA	神奈川	—	2b	—	—	—	—	—	—	—	
15	E	神奈川	—	—	—	2b	2b	—	—	—	—	
17	CC	神奈川	—	—	—	—	—	—	—	—	2e	
18	U	中国	広島	—	—	—	—	—	—	2a	2a	2a
19	N	九州	熊本	—	—	—	—	—	—	—	—	2d

[第2章] ローソニアの疫学的及び分子生物学的解析

1) ローソニアの疫学的調査

1. 序論

Lawsonia intracellularis (ローソニア) は、偏性細胞内寄生性の、グラム陰性のコンマ状の *Campylobacter* 属様の小桿菌で、豚の増殖性腸炎を引き起こす (Gebhart et al, 1991)。ローソニア感染症は、大きく分けて二つのタイプがある。出血性腸炎により黒色タール状便を呈し、時に急性の死亡が認められる急性タイプ、軟便から下痢となり、潜在的に増体率の低下に関与している慢性タイプに分けられ、また、感染しても無症状で経過することもある (McOrist et al, 1999, 2005)。ローソニアの感染は世界的に認められ、特に肥育後半での発育に影響を与えることから、経済的被害は大きい (Lawson et al, 2000)。

国内のローソニアの抗体陽性率は2004年に矢原ら (矢原ら, 2004年)、2006年に川本ら (川本ら, 2006年)の報告があったが、国内での検出状況の詳細な報告はない。そのため、今回著者が所属する診断センターに全国から送られてきた検体を用いて、疫学的な調査を行った。

2. 材料と方法

材料

著者が所属する診断センター（エス・エム・シー株式会社）に、2006年から2016年までに持ち込まれた全国の下痢症状で死亡した豚あるいは下痢便合計3,989検体を用いた。

また、2013年から2014年に繁殖用種豚1検体を含めた70日齢以上のローソニアの疑いの腸管および軟便～下痢便27検体と、70日齢以上の正常便98検体を用いた。

方法

DNA抽出とPCR

核酸抽出キット（QIAamp DNA Stool Mini Kit, ㈱キアゲン, 東京）を用い、マニュアルに従って、糞便および腸内容物からDNA抽出を行った。PCRは、aspA遺伝子部位を増幅するプライマーA, B, C, D (Jones et al, 1993)を用い nestedPCRを行った。PCR試薬 (Emerald Amp PCR Master Mix, タカラバイオ㈱, 滋賀県)を用い 1stPCRは、鋳型DNA 2.0 μ L、プライマーA, Bを使用し最終液量を25 μ LとしてPCRを行った。2ndPCRは、鋳型DNAを1.0 μ L、プライマーはC, Dを用いた。反応条件は、1stPCRは、94°C 3分の熱変性後、94°C 30秒、57°C 30秒、72°C 1分間のサイクルを30回繰り返し、最後に72°C 10分間の伸長とした。2ndPCRは、94°C 3分の熱変性後、94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 1分間のサイクルを30回繰り返し、最終伸長72°C 10分を行った。アガロースゲル電気泳動により目的のサイズである1stPCRで約319bp、2ndPCRで約260bpの増幅産物の確認をした。

3. 結果

2006年から2016年の腸管疾病の主な病原体12種類（図1）のうちローソニアの検出率は約20%で最も高く、続いて *Clostridium perfringens* が19%であった。各年の検出率では、ローソニアの検出率が50%を超える年も確認された。

症状のタイプごとの検出率は、急性タイプが6検体中83.3%、慢性タイプは21検体57.1%、正常便98検体中16.3%であった。

4. 考察

全国的な下痢症状の豚での腸管疾病のなかで、ローソニアの検出率が最も高いことが確認された。肥育期での下痢や死亡は経済的な被害に直結する疾病となるため、肥育で問題となるサルモネラ症や豚赤痢症、豚鞭虫症などと比較しても、ローソニアは国内の養豚経営において非常に重要な疾病であることが確認された。

また、症状タイプでの検出率は、急性タイプは80%以上、慢性タイプでは50%以上と検出割合は高く、さらに不顕性タイプからも16%検出され、ローソニアが確認されても正常な豚が1割以上であることがわかった。

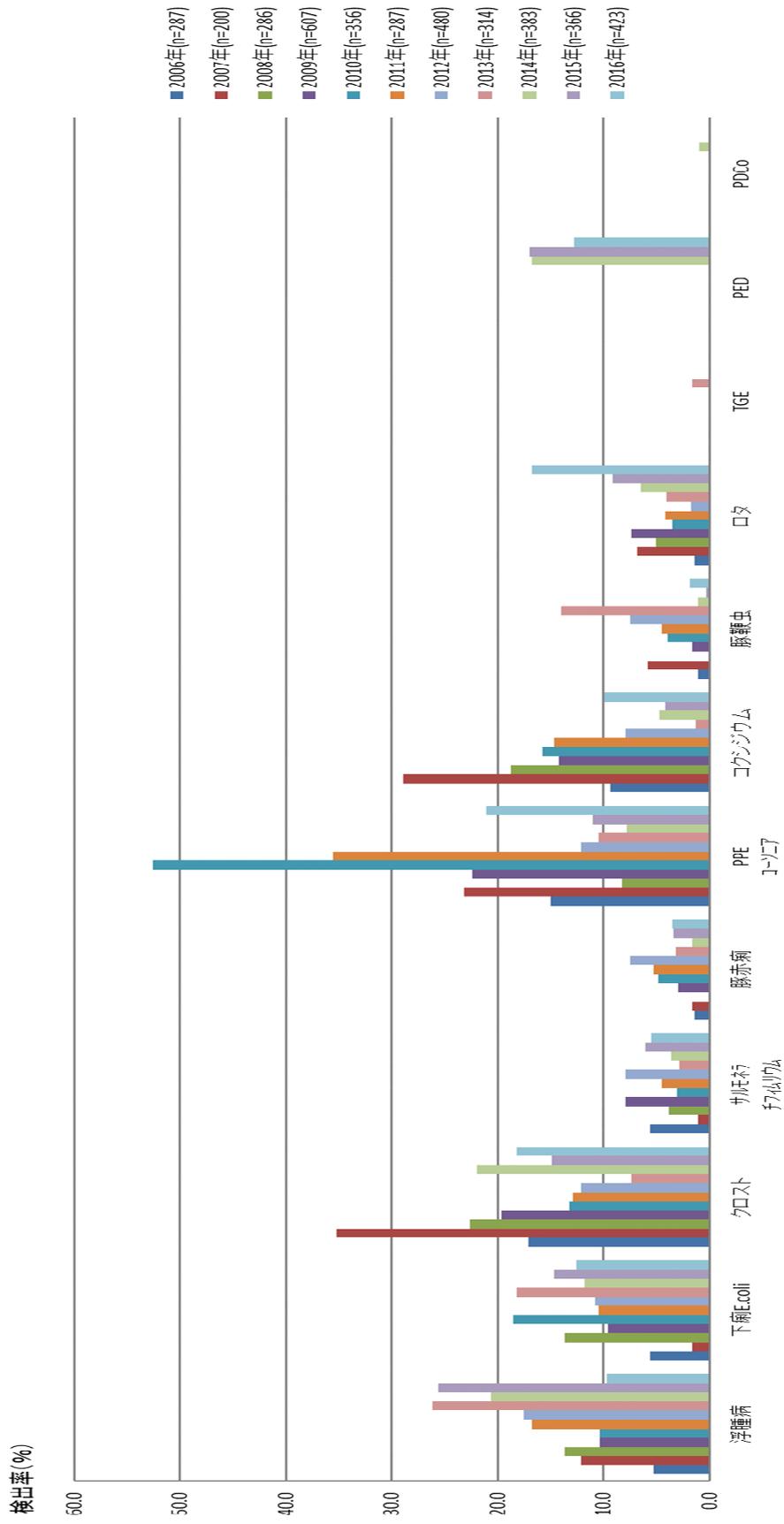


図 1. 下痢症状の豚での各病原体の検出率 (n は検体数)

下痢 *E. coli*: 豚大腸菌性下痢症、クロスト: *Clostridium perfringens*

2) ローソニアの分子生物学的調査

1. 序論

前述の調査で、国内においてローソニア感染症が腸管疾病の中で最も検出率が高いことが確認された。しかし本菌は、人工培地での増殖ができず、分離培養が難しい事からも、その発生機序や症状の違いとの関連性などについては不明な点が多い (Jacobson et al, 2010)。

ローソニアの全ゲノムについては、急性タイプの豚から検出された PHE/MN1-00 株をもとに、約 1.7Mb、1,183 遺伝子と、そのほかに 3 つのプラスミド (27,048bp、29 遺伝子、3,9794bp、24 遺伝子、194,613bp、104 遺伝子) が報告されている (Seit et al, 2013)。いくつかのタンパク遺伝子の報告があるが、病原性遺伝子についてはわかっていない (Vannucci et al, 2013)。

今回の供試材料からはローソニアの細胞培養ができず、長鎖での解析ができないことから、野外感染豚での症状の違いとローソニア遺伝子の関連を調査するため、細胞内の侵入に関与すると考えられるいくつかの候補遺伝子に注目して、急性、慢性、不顕性タイプそれぞれの症状でのローソニアの遺伝子学的な違いを探った。

最初の調査対象として、ローソニアと同じく細胞内寄生菌として知られているリケッチア菌において、細胞内への侵入に関与するとされている HSP60 (groEL) 遺伝子、50 k Da (OmpA family protein) 遺伝子、SodC (Super oxide dismutase) の相同遺伝子 (Dale et al, 1998, Schmitz-Esser et al, 2008) のシーケンス解析を行った。

次に複数の外膜タンパク質の遺伝子部位を確認した。2014年に、ローソニアのプロテオーム解析から、細胞への接着や侵入に係わる外膜タンパク質の遺伝子部位が予想され、このタンパク部位（LAW_00931 および LAW_00871）を抗原に用いたウェスタンブロットで、感染豚と非感染豚の血清でその反応性に違いがあることが報告された（Watoson et al, 2014）。外膜タンパク質は、大腸菌（Parson et al, 2006）や *Legionella pneumophila*（Gholipour et al, 2014）他、多くのグラム陰性菌で病原性に関与していることが報告されている Pal タンパク質と共通のドメインを有することから、外膜タンパク質の遺伝子部位が病原性に関わっていることが予想されたため、外膜タンパク質（LAW_00931）の全長（1,023bp）を含む 4,390bp の配列の増幅及び比較解析を行った。

また、急性タイプのローソニア感染細胞に発現するとされる（Watoson et al, 2014）機能不明のタンパク質（LAW_00877、LAW_00044）、翻訳伸長因子 EF-Tu（LAW_00967）、翻訳伸長因子 EF-G（LAW_00976）、SAM 依存性メチル基転移酵素（LAW_00475）を含めた広範囲のローソニアの遺伝子の差異を検索することとした。

最後に、急性タイプから分離されたローソニアを細胞培養することで得られた非病原性株と、初代培養の株での全配列の比較から、3種類のプラスミド上に発現された遺伝子に多くの相違が認められている。（Vannucci et al, 2012）。そのため、*Lawsonia* 染色体中の遺伝子だけでなくプラスミドについても調査することとし、それぞれの症状で3種類のプラスミドの有無と、細胞侵入に関与している可能性のある遺伝子についてシーケンス解析を行った。

2. 材料と方法

材料

前述の調査で得られた急性タイプ 5 検体、慢性タイプ 21 検体、不顕性タイプ 16 検体を用いた。

症状タイプごとの比較には 2014 年に採材した急性症状 3 頭（埼玉県、群馬県、神奈川県）、2006 年、2014 年に採材した慢性症状 2 頭（宮崎県、群馬県）および 2014 年に採材した無症状 1 頭（群馬県）の糞便を用いた。

方法

DNA 抽出と PCR

採取した豚糞便を、シカジーニクス DNA 抽出試薬（関東化学株式会社）を用い添付のマニュアルに従って totalDNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型として各遺伝子に対する PCR を行った。糞便中のローソニアの有無については、Jones らの報告に基づいた aspA 遺伝子部位を増幅するプライマーにより確認した（Jones et al, 1993）。aspA 遺伝子部位および HSP60 (groEL) 遺伝子、50KDa (OmpA family protein) 遺伝子、SodC (Super oxide dismutase) のプライマーについては表 1 に記した。

外膜タンパク質 (LAW_00871 : 1735bp、LAW_00931 : 1,023bp) および長鎖 PCR による 5 つのタンパク質 (LAW_0087 : 1,735bp) 機能不明のタンパク質 (LAW_00877 : 794bp、LAW_00044 : 2,654bp) 翻訳伸長因子 EF-Tu (LAW_00967 : 1,194bp)、翻訳伸長因子 EF-G (LAW_00976 : 2,076bp)、SAM 依存性メチル基転移酵素 (LAW_00475 : 1,497bp) に使用した各プ

プライマー配列は表 2 に示した。標的遺伝子と用いたプライマーの位置関係については図 4 に示した。

プラスミド中の遺伝子については、PHE/MN1-00 の塩基配 (Accession Nos. NC008011~14) をもとにプライマーを設計した。それぞれのプライマーについては表 3 に示した。

PCR は、Takara PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase 1 μ L、5 \times Prime STAR[®] GXL Buffer 10.0 μ L、dNTP mixture 4.0 μ L、プライマー混合液 (各 10 μ M) 1.0 μ L、滅菌蒸留水 33.0 μ L を混合したものに鋳型 DNA 溶液 1.0 μ L を添加して全量を 50 μ L とした。また反応条件は初期熱変性 98 $^{\circ}$ C 2 分の後、熱変性 98 $^{\circ}$ C 10 秒間、アニーリング反応はプライマーの T_m 値を参考にプライマーごとに設定した温度で 15 秒、伸長反応は 68 $^{\circ}$ C で 4 分を 33 サイクル行い、最終伸長反応 68 $^{\circ}$ C 2 分を行った。

電気泳動による増幅産物の確認は 0.75 \times TAE 緩衝液で 1.5%濃度のアガロースゲルを作成し、0.75 \times TAE にて電気泳動を行った。電気泳動装置は Mupid-exU を使用し DNA サイズマーカーとして 100bp ラダーの GeneRuler[™] 100bp Plus DNA Ladder および OneSTEP Marker 6 (λ / Sty I digest) を用いた。PCR 産物 5.0 μ L と 10 \times Loading Buffer 1.0 μ L を混合し、その混合液 5.0 μ L を DNA サイズマーカーとともに 135V、20 分間の条件で電気泳動を行った。泳動後のゲルは 0.5 μ g/mL の臭化エチジウム溶液に 10 分間浸漬し染色した。その後、Printgraph 2M を用いて電気泳動パターンを撮影した (図 7)。目的のサイズの DNA 断片が増幅されていることを確認し、この PCR 産物を用いてダイレクトシーケンシング法を行った。

シーケンス解析

PCR 産物中のプライマー除去と dNTPs の脱リン酸化を目的として PCR 産物 5.0 μ L に Exonuclease I と Shrimp alkaline phosphatase の混合液 (1:2) 1.0 μ L を加え、サーマルサイクラーを用いて 37 $^{\circ}$ C 30 分間、80 $^{\circ}$ C 15 分間反応させた (Exo-SAP 処理)。

その後 Optical 96-Well Reaction Plate に 1 ウェルあたり Ready Mix (Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) 4.0 μ L、0.25 μ M シーケンス用プライマー 2.0 μ L、Exo-SAP 処理産物 2.0 μ L を加え全量 10 μ M とし、サイクルシーケンス法を行った。シーケンス用プライマーには PCR に用いたものと同じのプライマーを使用した。反応条件は、初期熱変性 96 $^{\circ}$ C 2 分 30 秒の後、熱変性 96 $^{\circ}$ C 30 秒間、アニリング反応 50 $^{\circ}$ C 25 秒、伸長反応 60 $^{\circ}$ C 40 秒を 32 サイクル行った。

DNA 精製のため SAM[™] Solution 45 μ L、Xterminator[™] Solution 10 μ L の混合液をサイクルシーケンス産物 10 μ L を含むウェルに加え、マイクロミキサーで 30 分間攪拌した。その後 WELLCENT96 を用いて 2000rpm 以上で 2 分間遠心分離して得た上清をダイレクトシーケンス解析に用いた。

シーケンス解析には 3130 Genetic Analyzer を使用した。96-Well Reaction Plate を Analyzer に設置し、その後はマニュアルに準じ、塩基配列データを得た。得られた配列情報は 4Peaks、GENETIX-MAC version 16.0.4 を用いて配列解析を行い、PHE/MN1-00 の染色体の配列 (Accession No. NC_008011)、プラスミド A (NC_008012)、プラスミド B (NC_008013)、プラスミド C (NC_008014) と比較し、それぞれの相違の有無を確認した。

3. 結果

aspA 遺伝子部位の増幅が認められた 33 検体中、今回注目した遺伝子部位での遺伝子情報が確認できない検体もあった。そのため、確実に塩基配列の確認できた急性 3 株、慢性 2 株、不顕性 1 株の計 6 株で比較した。

SodC 遺伝子は慢性タイプの 1 株で 530 番目の塩基配列が、T から A に (図 1)、50KDa 遺伝子は、慢性型の 1 株で 14 番目の塩基配列が A から G と相違が認められ、同一農場の慢性タイプとは違う配列が認められた (図 2)。HSP60 遺伝子は、同一農場の急性タイプと慢性タイプの 44 番目の塩基配列が A から G に、慢性型の 1 株の 1273 番目の塩基配列が G から T に、無症状タイプの株の 1193 番目が G から A に、1374 番目が T から C に、急性タイプの 1 株の 853 番目の塩基配列が A から G となり相違が認められたが、調査した塩基配列から推測されるアミノ酸配列に違いはなかった (図 3)。

外膜タンパク質 (LAW_00931) の解析では、急性および慢性タイプの各 2 検体、無症状検体 1 検体の増幅が確認できた。また急性検体のうち 1 つは、プライマー LAW_00931 (表 2) を用いたダイレクトシーケンス法による配列解析が出来なかった。そのため、591 番目以降の塩基配列および 180 番目以降のアミノ酸配列は確認できなかった。

これら増幅産物の配列解析の結果、急性検体および慢性検体 1 つずつで、14 番目の塩基配列が A から G となり、5 番目のアミノ酸においてヒスチジンからアルギニンへの置換が見られた。さらに同慢性検体の 628 番目の G が A となっていたことにより、210 番目のアミノ酸がアラニンからチロシンに置換していた (図 5, 6)。

外膜タンパク質 (LAW_871) 含めた広範囲の部位の PCR では、急性タイプおよび慢性タイプの株で部分的に増幅が認められたが (図 7) ダイレクトシーケンス法による解析ができなかった。

症状のタイプごとのプラスミドの有無とその塩基配列を比較した結果、調査に用いたサンプルから、報告されている 3 種類のプラスミドの存在は確認できたが、推測されるアミノ酸配列に違いは確認されなかった (データは示さず)。

4. 考察

急性タイプの豚より検出された株の全塩基配列については2株の報告があるが、野外感染株における慢性タイプ、不顕性タイプの便からのローソニアの配列情報については報告がない。今回国内のローソニア感染豚の便を症状ごとに分けて調査をおこなった。

調査部位としては、細胞内への侵入に関与すると考えられる部位 HSP60、50kDa、SodC について比較を行った。

細胞内侵入に関連する遺伝子では、小山らの報告 (Koyama et al, 2006) では、症状については不明であるが、塩基配列の違いが認められている。しかし本研究に用いた株の症状での差は確認されなかった。

Legionella 他多くのグラム陰性菌で病原性に関与することが知られている Pa1 タンパク質と共通のドメインを有する外膜タンパク質の遺伝子部位についてシーケンス解析をおこなった。部分的な解析ではあったが、今回検出された急性タイプ、慢性タイプ、不顕性タイプの株と、既知の急性タイプの塩基配列で数塩基の違いはあったが、症状と塩基配列の違いに関連性は確認されず、ローソニアの病原性発現の機序は、他のグラム陰性菌とは異なる可能性が示された。

プラスミドについては、急性タイプの豚からの報告のみであったが、今回慢性タイプおよび不顕性タイプの豚からもそれぞれに3種類のプラスミドが存在していることが確認された。

本調査において、無症状タイプの外膜タンパク質のシーケンス解析はできなかったが、慢性、急性タイプの症状による違いは確認されず、調査した遺伝子の違いが症状に関連している可能性は低く、調査した遺伝子以外の関与があるのか、他の感染症の重感染、個体ごとの免疫力の違いや感染時期の違いなどが増殖能力に強く影響している可能性が考えられた。

PHE/MN1-00	1	ATGAAAATAAACTATTTTTGTTACTTCAATAGTAAGTATTTCTCTTAAGTAGTATTACTAGTGTAGTATTAGCATGTTCTGTTACTTCAGAAGTCCATATGATTGACAATGGA	120
B_2	1	11
B_3	1	10
A_22	1	9
A_33	1	8
C_45	1	7
PHE/MN1-00	121	ATAAACAGAGTATAGGCACAGTAACTTTTACTGATACAGATAAAGTCTACAAATAAACTGATCTTAAAGCCCTTCGCAGGAGAACATGGTTTTTCATCCATGAAGGAGGATCA	240
B_2	12	131
B_3	11	130
A_22	10	129
A_33	9	128
C_45	8	127
PHE/MN1-00	241	TGTGGACCTGCTGAGCATGATGGACATCTAACAGCTGGACTCCAAGCTCATGGTCATTATGATCCTGACAAAACAGGAAAACATGAAGGACCTCTTGGTAATGGACACAAGGGAGACTTA	360
B_2	132	251
B_3	131	250
A_22	130	249
A_33	129	248
C_45	128	247
PHE/MN1-00	361	CCTAGACTTGATGTTAAAGCTGATGGAATAGCAAAGAACACTCTTAGCTCCAAGATTAACAGTTAAAGAANTTAAGGGTCGTACAGTTATGATCCATGCTGGTGGTATAACTATTCA	480
B_2	252	371
B_3	251	370
A_22	250	369
A_33	249	368
C_45	248	367
PHE/MN1-00	481	GATAAACCTCTTCTCTTGGCGGTGGTGGTCTCGTATAGCGTGTGGTGTATACCAAAGTAG	543
B_2	372A-----	421
B_3	371	407
A_22	370	405
A_33	369	404
C_45	368	403

図 1. SodC 遺伝子の塩基配列と急性タイプ (PHE/MN1-00) との比較

A : 急性タイプ、B : 慢性タイプ、C : 不顕性タイプを示す

塩基配列の変異が無かった領域をドット (.) で示し、解析が出来なかった領域はハイフン (-) で示した。

PHE/MN1-00	1	ATTGTACCTGAGAAAGGGAGCGGTACATGAAAATTATCCATTCTGCAATTTTGGCTTACATTATTAACAGCATGGTCAACAGTTTGGCTTGCAGAAAGTTACAGCTAGTTGACTA	120
A_22	1	92
A_33	1	63
B_3	1G.....	92
C_45	1	64
PHE/MN1-00	121	AACGTGTTGAAAGCTATAATTATCTTGGATTATTCAGGCCTATGATGATGAACATGTTGCTGTTAGAGAGCCATAAATAGAATTAGCAAAAGAGCTATATAAAATTAATGCCG	240
A_22	93	212
A_33	64	183
B_3	93	212
C_45	65	184
PHE/MN1-00	241	CAATGCCATAAATGTCATATCAAGTGGATTATATACTTTGCACCTTATTCTGTAATTATCCCAAGGTTCTTGAATTCATGTTGCCAATGTGCCGTTAATCAAAATTAAGTCTG	360
A_22	213	332
A_33	184	303
B_3	213	332
C_45	185	304
PHE/MN1-00	361	ATTTAGAAATTTTGGTCGTTACTCTCTATGGAGACGGCATAAAATGCATGAACAGTCATTAATCAAAATGCCCTCAGGCAGCGTTATTCTTCTCACTGATGGTCATAAAT	480
A_22	333	452
A_33	304	423
B_3	333	452
C_45	305	424
PHE/MN1-00	481	TAGGGATGAATCCTGTTGAGGAAGTAAATCTATATCAACAATCCTAATGTTGTTTCATGTAGTTTCATTTGCAGATGATGCTGAAGCAAGCAATAATGATCAAAATGTTG	600
A_22	453	572
A_33	424	543
B_3	453	572
C_45	425	544
PHE/MN1-00	601	CACCTAATAGTGAAGTGTCTTGTGATGGTTACAGCTTCTACAAAATCC	720
A_22	573	624
A_33	544	569
B_3	573	624
C_45	545	596

図 2. 50 k Da 遺伝子の塩基配列と急性タイプ (PHE/MN1-00) との比較

A : 急性タイプ、B : 慢性タイプ、C : 不顕性タイプを示す

塩基配列の変異が無かった領域をドット (.) で示し、解析が出来なかった領域はハイフン (-) で示した。

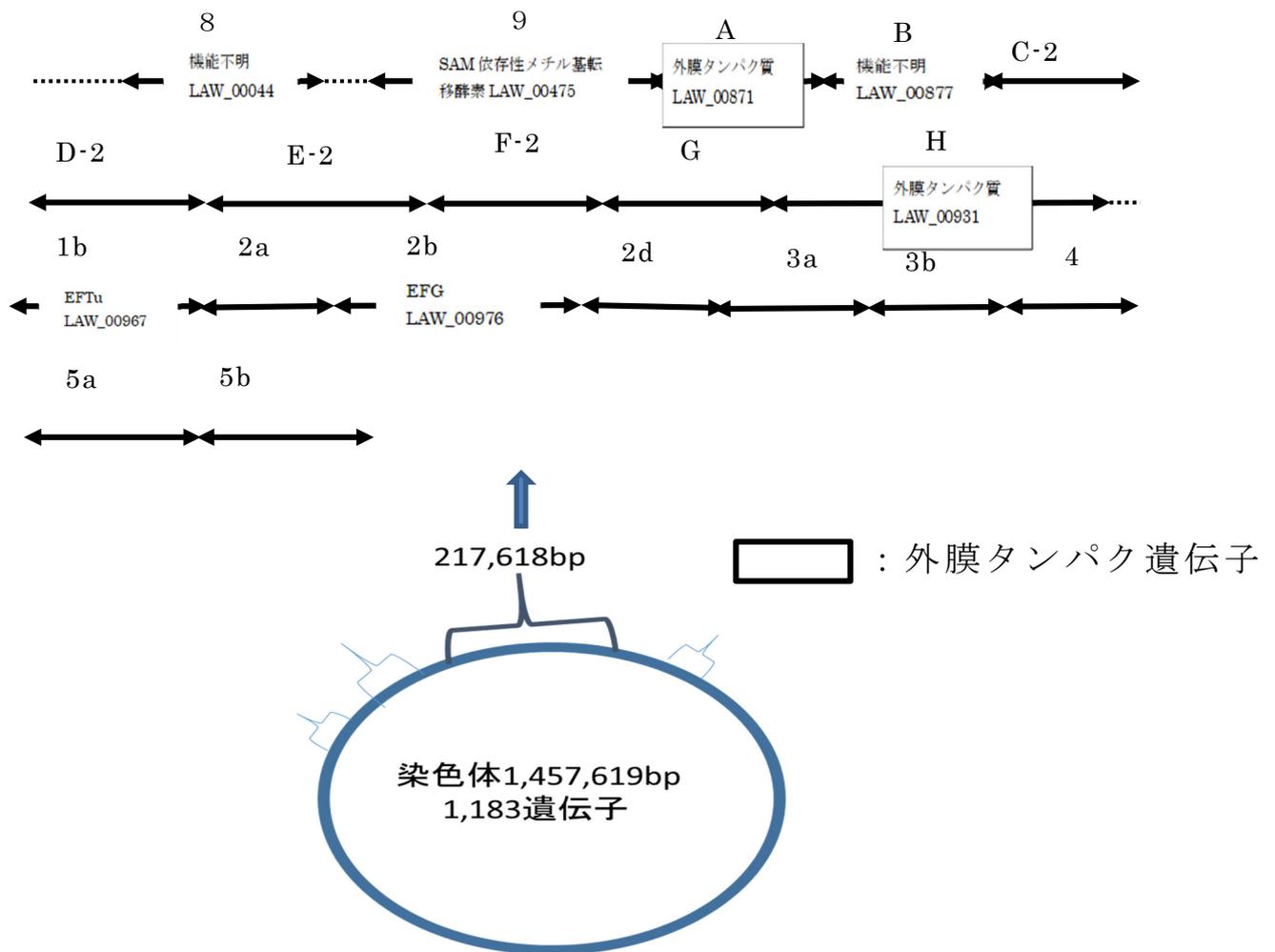


図 4. 外膜タンパク質およびその他 5 つのタンパク質の遺伝子と、
用いたプライマーの位置関係の模式図

外膜タンパク質 : LAW_00871 (735bp)

機能不明のタンパク質 : LAW_00877 (794bp) 、LAW_00044 (2,654bp)

翻訳伸長因子 EF-Tu : LAW_00967 (1,194bp)

翻訳伸長因子 EF-G : LAW_00976 (2,076bp)

SAM 依存性メチル基転移酵素 : LAW_00475 (1,497bp) を含む

合計 217,618bp

プライマーは表 2 と対応している。これらプライマーで増幅した領域
を矢印で示した。

Law_00931	1	ATGAAATATCCATTCTGCARTTTTGCTGTTACATTATTACAGCATGGTCACAGTTTGGCTTGGCTGCAGAGTTACAGCTAGTTGACTAARCGTG	100
A_33	1G.....	100
A_114	1	100
B_20	1	100
B_116	1G.....	100
C_98	1	100
Law_00931	101	TTGAAAGCTATARTTATCTTGTGGATTATTCAGGCTCTATGATGATGAACATGTTGCTGTAGAGAGCCTAAATAGATTAGCRAAAGAGCTATATT	200
A_33	101	200
A_114	101	200
B_20	101	200
B_116	101	200
C_98	101	200
Law_00931	201	AAAAATTARTGCGGCARTGCCTAAATGTCATATCAGGTGGATTATATACTTTTGCACCTTATCTGTAATTATCCCAAGGTTCTTGGATTTCATGT	300
A_33	201	300
A_114	201	300
B_20	201	300
B_116	201	300
C_98	201	300
Law_00931	301	GTGCCGARTGCGGTTATACARTTAGTCTGATTTAGAAATTTTGGTCGCTTACTCCTATGGAGACGGCATAAATGATGAACAGTCATTA	400
A_33	301	400
A_114	301	400
B_20	301	400
B_116	301	400
C_98	301	400
Law_00931	401	ATCAATGCCCCCTCAGGCAGCCGTTTCTTCTCACTGATGGTCATARTTTAGGGATGARTCCTGTTGAGGAGTAAATCTATATATCAACCAA	500
A_33	401	500
A_114	401	500
B_20	401	500
B_116	401	500
C_98	401	500
Law_00931	501	TCCTARTGTTGTTTTCATGTAGTTTCATTTGCAGATGATGTCGAGGCAAGCARTARTGATCAATGTTGCACCTTARTAGTGGAGTGTCTTGTT	600
A_33	501	539
A_114	501	600
B_20	501	600
B_116	501	600
C_98	501	600
Law_00931	601	GATGTTTACAGCTTCTACAAATCCTGCTGTTGCCAGGATTTGTTAATAGTGTTTTTTGTCAAGACAAATCCTGTTACAGAGAGTGTGTTGTAC	700
A_33	539	539
A_114	601	700
B_20	601	700
B_116	601A.....	700
C_98	601	700
Law_00931	701	TTGTTGGTAAACTTTGCTTTTGTATTTTGCATTAGATGATGCTAAGCTATTTTAGAAGAACAGTTCGTCTTATCAGAGCAATCCAGATTT	800
A_33	539	539
A_114	701	800
B_20	701	800
B_116	701	800
C_98	701	800
Law_00931	801	TARTGTTGCTTGGTGGACAGATAGTACTGGTCTGATGCATARTACTGCGTTTATCACAGACGTGCTGATGCAGTAAARACTTCTTGTT	900
A_33	539	539
A_114	801	900
B_20	801	900
B_116	801	900
C_98	801	900
Law_00931	901	AAATGGGTATACCTTCAATCGTTTTTGTCTAAGGATGGTAAATCCTATCAGTATARTATGCTACAAAGAGGACGATATATGATCGTCGTA	1000
A_33	539	539
A_114	901	1000
B_20	901	1000
B_116	901	1000
C_98	901	1000
Law_00931	1001	CAGACTTGCTTTTTTGATTAG	1023
A_33	539	539
A_114	1001	1023
B_20	1001	1023
B_116	1001	1023
C_98	1001	1023

図 5. 外膜タンパク質 (LAW_00931) の塩基配列の比較

A : 急性タイプ、B : 慢性タイプ、C : 不顕性タイプを示す

塩基配列の変異が無かった領域をドット (.) で示し、解析が出来なかった領域はハイフン (-) で示した。

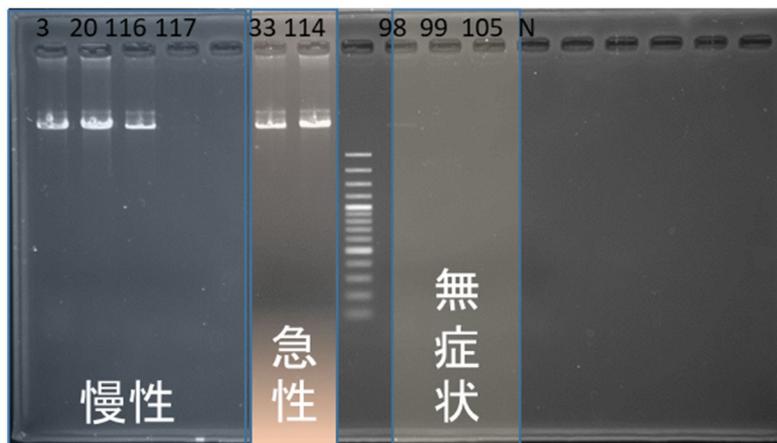
AA_Law_00931	1	*K I I H S A I F A V T L L T A W S T V C F A R E V T A S C T K R V E S Y N V L V D Y S G S M M K H V A V R E P K I E L A K E A I L K I N A A M P K N S V Q G G L Y T F A P V S V I I P Q G S W N S C	100
A_33AA	1R.....	100
A_114AA	1	100
B_20AA	1	100
B_116AA	1R.....	100
C_98AA	1	100
AA_Law_00931	101	V R E C A V N T I K S O L E I F G R L T P M G D G I K N H E T V I N Q M P P Q R A V I L L T D G H N N L G M N P V E E V K S I V Q T N P N V C F H V V S F A D D R E G K A I I D Q I V A L N S G S V L V	200
A_33AA	101	179
A_114AA	101	200
B_20AA	101	200
B_116AA	101	200
C_98AA	101	200
AA_Law_00931	201	Q G L Q L L Q N P A V C Q E F V N S V F C Q E Q I L V T E E V V L R G V N F A F D S F A L D D T A K A I L E E T V A L I R A N P D F N V A L L G W T D S T G P D A Y N L R L S Q E A R A D A V K N F L V	300
A_33AA	179	-----	179
A_114AA	201	300
B_20AA	201	300
B_116AA	201T.....	300
C_98AA	201	300
AA_Law_00931	301	<M G I P S N R L F A K G M G S V Q V N N A T K E G R V M N R A T E L V F F D	340
A_33AA	179	-----	179
A_114AA	301	340
B_20AA	301	340
B_116AA	301	340
C_98AA	301	340

図 6. 外膜タンパク質 (LAW_00931) のアミノ酸配列の比較

A : 急性タイプ、B : 慢性タイプ、C : 不顕性タイプを示す

アミノ酸配列の変異が無かった領域をドット (.) で示し、解析が出来なかった領域はハイフン (-) で示した。5 番目のアミノ酸において、33 (急性検体) と 116 (慢性検体) がヒスチジン (H) からアルギニン (R) に置換していた。また、210 番目のアミノ酸において、116 (慢性検体) がアラニン (A) からチロシン (T) に置換していた。

LAW_0871



LAW_0877

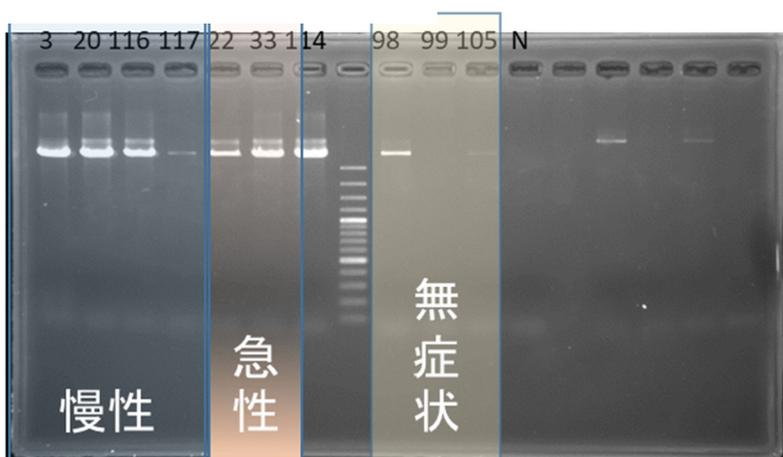


図 7. 症状ごとの PCR 後の電気泳動像

外膜タンパク質遺伝子 (LAW_00871)、機能不明遺伝子 (LAW_00877) 部位の PCR では、慢性タイプ、急性タイプのサンプルからは、バンドが確認されたが、不顕性タイプはバンドが微かで、シーケンス解析ができなかった。(各遺伝子の電気泳動結果の一部)

表 1. ローソニア遺伝子の有無確認および各遺伝子のダイレクトシークエンスに用いたプライマー配列

Gene	プライマー	配列	増幅数(bp)
aspA	A	5'-tatggctgtcaaactccg-3'	319
	B	5'-tgaaggtattggtattctcc-3'	
	C	5'-ttacaggtgaagtattggg-3'	260
	D	5'-ctttctcatgtcccataagc-3'	
sodC	SodC-R	5'-ccatatgattgatgacaatggaa-3'	431
	SodC-F	5'-caccacacgctatacgagca-3'	
50kDa	50kDa-R	5'-tgagaaaggaggcgtacat-3'	664
	50kDa-F	5'-caaattcttgcaaacagca-3'	
HSP60	HSP60-R	5'-gatgctaaagcccgtgaaa-3'	1614
	HSP60-F	5'-accgtccataccaccat-3'	

表 2. ダイレクトシーケンス用に作成したプライマー

PCR用プライマーMix名	プライマー名	配列	増幅数(bp)
A	AR	5'-AGGTGGAGGTGGTTTATTATACAACA-3'	10140
	AF	5'-CAAGAATCCCTGTATGGCTATTAACG-3'	
B	BF	5'-GCCTTAGCTGATATGAATAATGATGGG-3'	10005
	BR	5'-TAAAGAGATTCTTGGACATGCATTCA-3'	
C-2	CF-2	5'-ACATCTGCAGAAGTGTACCGAGCCATC-3'	10515
	CR-2	5'-TCTCTTGCAGGAGAAGGTGCTGTTAGC-3'	
D-2	DF-2	5'-TAGATTGAGCTACGACTCCTACTG-3'	4817
	DR-2	5'-ACTACAGGCTTTACAGAATCTTATGC-3'	
E-2	EF-2	5'-TAGACTCTGTGCAATAACAGCTACATG-3'	11524
	ER	5'-GAGCCAATCAAATAATGCTCCCATTA-3'	
F-2	FF-2	5'-TGGATAAACCATTTGCCAACATTGAC-3'	11922
	FR-2	5'-TACAGAAACATTCTTTGGACTTGGATGC	
G	GF	5'-GCCAGTAGGGATAGGAGGTATATCTA-3'	7854
	GR	5'-GTAAACGCTGAACTGGTGCAATAGTA-3'	
H	HF	5'-GAGGTAATTTTCCCTGAGTTAGCAAG-3'	6780
	HR	5'-TTTAGTATTTTCTCCGCATTGTGTCC-3'	
1b	1143467F	5'-AGGAGCTAGTGATCTAGAGGCTAGTG-3'	20437
	1163903R	5'-ACCCAATAGCTATGGAGCAAGGTTTACG-3'	
2a	1163827F	5'-AGTCACTACACCAGCACCAACAGTTCG-3'	10718
	1174544R	5'-TCAAGCATGTGAGTTTGACTACTCTG-3'	
2b	1174468F	5'-ATAGTTGCTGGATTAGAGTTGAC-3'	10804
	1185271R	5'-ATCCTTATCCTCTGCATACTGGTAGC-3'	
2c	1184952F	5'-ATAGTTCACCAGAGCCTGCAATACGTAC-3'	9107
	1194058R	5'-TACAGGAGTTATTCCAGACACCTTCAG-3'	
2d	1193770F	5'-TATAGTCATAATAGCCGCTAAGACAC-3'	9565
	1203334R	5'-ATGTACAGGATGAGAATAACCTACAGAC-3'	
3a	1202035F	5'-ACTCGCGCTAAGAAGTCAATTGCATC-3'	10390
	1212424R	5'-ACAAATAGCTGGGAGGATAGCGACTG-3'	
3b	1212385F	5'-TCAGCTTTTACGCAACAGTCGCTATC-3'	122208
	1224592R	5'-ATAGATGCATACCTGCAAACGTAC-3'	
4	1224534F	5'-ATACCTTGTTTGGCAGTACCAGTGTC-3'	19725
	1244258R	5'-ACAATTACGCTTACACCTTCACCTCATGC-3'	
5a	1244110F	5'-TTGTAAATAGCTATAGTTGGCTGTAGTG-3'	11483
	1255592R	5'-ATCTAGGATTTCAACTTGGTGCTAG -3'	
5b	1255453F	5'-AGCAAGGTGTTGTTTCAGATTCGCTAC-3'	10021
	1265473R	5'-TTCAGGATTTTCAGCCACGGATACGAC-3'	
8	50874F	5'-TCAAGCAGTGAAGTATATTAGATCAG-3'	10073
	60946R	5'-TAACCTGAAGTTGTCCGTAATATGTC-3'	
9	550842F	5'-TCCAGACTTTCAACTCACAACAGATAC-3'	9530
	560371R	5'-ATTACCTGAACCTAAATCTGAAGTCG-3'	

総括

PCV2 およびローソニアは 1990 年以降に確認された新興疾病である。しかし、世界中の養豚農場に浸潤し、国内での浸潤率は 90%以上となっているウイルスおよび細菌である。感染後徐々に広がり発症が認められるため、その侵入に気が付かず農場内に蔓延しているケースが多く、養豚場の大規模化が進む中で、経済的な被害はより深刻なものとなっている。そのため、国内の農場での実態を詳細に調査するために、疫学および分子生物学的な解析を行うこととした。

PCV2 は、2012 年頃から増殖能力の高い mPCV2 と同じクラスターの PCV2d-1 が世界中で流行し、ワクチン接種農場での PCVAD 発生の報告が増加していた。国内ではワクチンブレイクの報告はないが、2014 年頃から PCV2 ウイルスの血清中からの検出率が増加傾向にあることが確認されたため、PCV2d-1 の侵入を疑い、健康豚の血清を用いて遺伝子型の調査を開始することとした(第 1 章-1)。

著者らは、2015 年の血清中に mPCV2 と同じクラスターの PCV2d-1 を確認した(第 1 章-2)。そのため、過去に遡り、保管していた 2009 年から 2016 年までの血清を用い遺伝子型の推移を調査した。その結果、2012 年を境に PCV2d-1 が検出され始め、その後もコンスタントに検出されていることがわかった。また、2016 年の血清より、アメリカでのみ報告されていた PCV2e が、国内にも存在していることを本調査で初めて確認した。

今回 PCV2d-1 および PCV2e が確認された農場で海外との直接的な取引はなかったが、アメリカでの PCV2d-1 および PCV2e の検出時期とその後の状況が酷似している点から、血漿蛋白を含む飼料あるいは飼料運搬経路から、国内に侵入し広く浸潤している可能性が懸念された(第 1 章-3)。

ローソニアは、偏性細胞内寄生性のグラム陰性菌で、豚の増殖性腸炎の原因となる。症状は、急性・慢性・不顕性タイプの3つがある。農場内の抗体陽性率は高いが、培養が困難で疫学のおよび分子生物学的な解析の報告は少ない。

本調査で、過去11年間の腸管疾病の豚より検出された病原体の中で、最も高い検出率となり、50%を超える年もあった。このことから国内の養豚産業にとってローソニアが重要な病原体であると考えられた。また、症状タイプごとの検出率は、急性が80%以上、慢性が50%以上、不顕性タイプが16%であった。(第2章-1)

次に、ローソニアの病原性に関わる遺伝子および慢性タイプと不顕性タイプから検出されたローソニアの塩基配列情報は報告されていない。そのため、症状タイプごとに検出されたローソニアを用いて、症状と塩基配列の比較を行った。比較部位として、細胞の侵入に関わっているとされている遺伝子(HPS60、SodC、50kDa遺伝子)と外膜タンパク質に注目し、シークエンス解析を行った。また、染色体だけでなくプラスミド部位についても解析を行った。急性タイプの株で確認されている3つのプラスミド(プラスミドA, B, C)と近似のプラスミドが慢性タイプおよび不顕性タイプの株にもあることを確認した。しかし今回注目した染色体およびプラスミドの遺伝子部位と症状に差はないことがわかった。(第2章-2)

本調査より、海外から生体、原材料の制限をしても新興の病原体が侵入し、非常に速いスピードで浸潤している可能性があり、今後その可能性を踏まえ、症状の違い、発生状況の違いを把握し、疫学のおよび分子生物学的な調査をしていくことは有効であると考えられた。

本論文の 1 章は以下に公表した

小池 郁子，村田 知，大井 宗孝，村上 賢：2015 年に日本の健康豚から検出された豚サーコウイルス 2 の遺伝子型，日獣会誌，70，650-654（2017）

General Overview

Porcine Circovirus2 (PCV2) and *Lawsonia intracellularis* (Lawsonia) are emerging diseases that have been confirmed since 1990s , but have spreaded pig farms around the world and infiltration rates of more than 90% in Japan.

Those infection are observed gradually and spread in the farm. And economic damage has become more serious especially the large scale farms. Therefore We investigate the realities of PCV2 and Lawsonia detected Japanese pig farm by the epidemiological and molecular biological.

Chapter1

PCV2 has increased the PCVAD outbreak on the vaccination farm due to the prevalence of mPCV2 which had earlier onset of viremia and higher viral shedding compared with pig infected with the other genotypes in the world since 2012. The detection rate of PCV2 by PCR decline from 2010 to 2013 and to increase again from 2014, moreover We confirmed to rise the load of PCV2 in the serum of healthy pigs inoculated PCV2 vaccine in scheduled investigation in Japan by the result of our survey, So we study the incidence of PCV2 by conventional PCR in 163 serum samples which was pooled 530 healthy pigs at each stage from 21 farms in Japan in 2015. Subsequent sequence analysis of the open reading frame 2 region of PCV2 DNA from the PCR products showed that 7 different PCV2 strains were present. Four PCV2 strains (from 3 farms in Kanagawa Prefecture and 1 in Hiroshima Prefecture) belonged to

genotype PCV2a, while 3 (from 1 farm in Aomori Prefecture and 2 in Chiba Prefecture) belonged to group PCV2d-1 to of the same cluster as mPCV2 .

In above survey in 2015, it was the first confirmed of PCV2d-1. So, as to investigate the infiltration situation of PCV2d-1, We study the changing of predominant PCV2 genotypes from 2008 to 2016 by using the healthy pigs on regular monitoring.

To survey the chronological change of PCV2 for 19 farms in Japan from 2009 to 2016, We confirmed to have been infected with PCV2d-1 since 2012 and PCV2e since 2016.

This survey proved to already have spread around Chiba, Kanagawa in 2012, Aomori, Tochigi in 2015 and Kumamoto prefecture Japan in 2016 that was the same time to be confirmed North America. It is very similar to transition of the genotype in the United States.

We guessed sows and semen as invasion route but 9 farms were detected PCV2d-1 and PCV2e have not directly imported pigs and semen.

Next, the plasma protein mixed PCV2 entered Japan and infected pigs.

And those farms have used the feed include plasma protein.

The third was considered to be infection in the feed transport pathway. The risk factor of PED virus was suspected of transporting feed and 8 farms in 9 farms had invasion of PED.

In this study, we suggested that the possibility of invading and spreading our country from the feed included plasma protein or feed transport.

It is necessary to monitor the status of the PCV2 outbreak overseas and not only pigs and semen but also the inspection of PCV2 and the gene type from the import feed and transport route.

Chapter2

Lawsonia is a Gram negative obligately intracellular bacterium that causes proliferative enteropathy. Lawsonia can lead to three different syndromes of disease, acute, chronic or subclinical. That is difficult to culture and We have few reports of epidemiological and molecular biological analysis.

In this study, Lawsonia was the highest detection rate in intestinal pathogens from digestive disease pigs in the last 11 years and there were more than 50% in some year. Therefore Lawsonia is important disease in Japanese swine industry. And the detection rate of each symptom type, acute 80% or more, chronic 50% or more, was 16% in the subclinical type.

Then, It has not been reported that the Lawsonia genes related to virulence and nucleotide sequence of chronic type and subclinical type. So, We compared the nucleotide sequence per each types. We analyzed the nucleotide sequence some genes (HSP60, SodC, 50kDa) and the outer membrane protein which is considered to be involved in the invasion of cells.

In addition, We analyzed the plasmid gene as well as the chromosome. We confirmed that chronic type and subclinical type has also three plasmid (Plasmid A, B and C) identified to acute type. In this study, We confirmed no characteristic differences we focused on some genes per each types.

The present study reveals there is a possibility that an emerging pathogen can invade even if the restriction of the imported pig to Japanese farms and the raw material from foreign country which infiltrates at a very quickly.

We suggest to keeping the monitoring of the difference of the symptom and the occurrence situation in the future and it is important to investigate that details by epidemiological and molecular biology.

引用文献

- 大兼 政雄二, 山口 智治, 前川 孝昭, 姥貝 弘之, 佐々木 靖雄 : 大規模化に対応する養豚生産システムに関する研究(第2報), 農業施設, 30, 3 (1999)
- 川本 千代実, 河村 美登里, 森本 和秀, 久保田 泰徳 : 豚増殖性腸炎の発生と *Lawsonia intracellularis* の浸潤状況, 広島県獣医学会雑誌, 21 (2006)
- 川島 健司, 勝田 賢, 恒光 裕 : 離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)の特徴と診断, 豚病会報, 52 (2008)
- Allan GM, McNeilly F, Meehan BM, Kennedy S, Mackie DP, Ellis JA, Clark EG, Espuna E, Saubi N, Riera P, Bøtner A, Charreyre CE : Isolation and characterization of circovirus from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland, Vet Microbiol, 66, 115-123 (1999)
- Palinski R, Piñeyro P, Shang P, Yuan F, Guo R, Fang Y, Byers E, Hause BM : A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproduction failure, J.Virol, 91(2016)
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG : Porcine circovirus type 2 associated disease : update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies, J Vet Diagn Invest, 19, 591-615 (2007)
- Segales J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, Fossum C, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B,

- Baekbo P, Allan G: PCV-2 genotype definition and nomenclature, *Vet Rec*, 162, 867-868 (2008)
- Guo LJ, Lu YH, Wei YW, Huang LP, Liu CM : Porcine circovirus type 2 (PCV2) : Genetic variation and newly emerging genotypes in China, *Virol J*, 7, 273 (2010)
- Gagnon CA, Tremblay D, Tissen P, Venne MH, Houde A, Elahi SM : The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada, *Can Vet J*, 48, 811-819 (2007)
- Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG: Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2, *Vet Microbiol*, 163, 177-183 (2013)
- Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG, Matzinger SR, Meng XJ: 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 (2014)
- Salgado RL, Vidigal PM, de Souza LF, Onofre TS, Gonzaga NF, Eller MR, Bressan GC, Fietto JL, Almeida MR, Silva Júnior A : Identification of an emergent porcine circovirus-2 in vaccinated pigs from a Brazilian farm during a postweaning multisystemic wasting syndrome outbreak, *Genome Announc*, 2, e00163-00164 (2014)
- Takahagi Y, Toki S, Nishiyama Y, Morimatsu F, Murakami H : Differential effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2 genotypes at Japanese pig farms, *J Vet Med Sci*, 72, 35-41 (2010)

- Calsamiglia M, Segales J, Quintana J, Rosell C, Domingo M :
Detection of porcine circovirus types 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Clin Microbiol*, 40, 1848-1850 (2002)
- Dezen D, Rijsewijk FA, Teixeira TF, Holz CL, Varela AP, Cibulski SP, Gregianini TS, Batista HB, Franco AC, Roehe PM :
Comparative evaluation of a competitive polymerase chain reaction(PCR) and a SYBR Green-based real-time PCR to quantify porcine circovirus 2 DNA in swine tissue samples, *J Vet Diagn Invest*, 23, 1160-1167(2011)
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ : ClustalW : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res*, 11, 22, 4673-4680 (1994)
- Felsenstein J : Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap, *Evolution*, 39, 783-791 (1985)
- Devies B, Wang X, Dvorak M, Marthaler D, Murtaugh MP :
Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster, *Virus Res*, 2, 217, 32-37(2016)
- Franzo G, Tucciarone CM, Dotto G, Gigli A, Ceglie L, Drigo M :
International trades, local spread and viral evolution : the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy, *Infect Genet Evol*, 32, 409-415 (2015)
- Xiao CT, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T: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(2016)

- Patterson AR, Madson DM, Opriessnig T: Efficacy of experimentally produced spray-dried plasma on infectivity of porcine circovirus type 2, *J Anim Sci*, 88, 4078-4085 (2010)
- Sasaki Y, Alvarez J, Sekiguchi S, Sueyoshi M, Otake S, Perez A : Epidemiological factors associated to spread of porcine epidemic diarrhea in Japan, *Prev Vet Med*, 1, 123, 161-167 (2016)
- Gebhart CJ, Lin GF, McOrist SM, Lawson GH, Murtaugh MP : Cloned DNA probes specific for the intracellular Campylobacter-like organism of porcine proliferative enteritis, *J Clin Microbiol*, 29, 1011-1015 (1991)
- McOrist S, Gebhart CJ : Proliferative enteropathies. In *Disease of swine*, ed. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, 8th ed., pp727-738. Blackwell Publishing (1999)
- McOrist S : Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy, *Vet J* 170, 8-9 (2005)
- Lawson GH, Gebhart CJ, Proliferative enteropathy, *J comp pathol*, 122, 77-100 (2000)
- 矢原芳博 : 日本における浸潤状況, *臨床獣医*, 22 (2004)
- Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ : Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction, *J Clin Microbiol*, 31, 2611-2615 (1993)
- Jacobson M, Fellström C, Jensen-Waern M : Porcine proliferative enteropathy : an important disease with questions remaining to be solved, *Vet J*, 184, 264-268 (2010)
- Seit M, Aitchison K, Wheelhouse N, Wilson K, Lainson FA, Longbottom D, Smith DG : Genome Sequence of *Lawsonia*

- intracellularis strain N343, isolated from a sow with hemorrhagic proliferative enteropathy, *Genome Announc*, 1 (2013)
- Vannucci FA, Kelley MR, Gebhart CJ : Comparative genome sequencing identifies a prophage-associated genomic island linked to host adaptation of *Lawsonia intracellularis* infections, *Vet Res*, 4, 44-49 (2013)
- Dale CJ, Moses EK, Ong CC, Morrow CJ, Reed MB, Hasse D, Strugnell RA : Identification and sequencing of the *groE* operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: use in phylogeny, *Micriobiology*, 144, 2073-2084 (1998)
- Schmitz-Esser S, Haferkamp I, Knab S, Penz T, Ast M, Kohl C, Wagner M, Horn M : *Lawsonia intracellularis* contains a gene encoding a functional rickettsia-like ATP/ADP translocase for host exploitation, *J Bacteriol*, 5746-5752 (2008)
- Watson E, Alberdi MP, Ingilis NF, Lainson A, Porter ME, Manson E, Imrie L, Mclean K, Smith DGE: Proteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* reveals expression of outer membrane proteins during infection, *Vet Microbiol*, 174, 448-455 (2014)
- Parsons LM, Lin F, Orban J : Peptidoglycan recognition by Pal, an outer membrane lipoprotein, *Biochemistry*, 45, 2122-2128 (2006)
- Gholipour A, Moosavian M, Makvabdi M, Galehdari H, Alvandi A, Mard SA : Development of an indirect sandwich ELISA for detection of urinary antigen, using *Legionella pneumophila* PAL protein, *World J Microbiol Biotechnol*, 30, 1463-1471 (2014)
- Vannucci FA, Foster DN, Gebhart CJ : Comparative transcriptional analysis of homologous pathogenic and non-pathogenic *Lawsonia*

intracellularis isolates in infected porcine cells, *PLoS One*, 7, 10 (2012)

Koyama T, Hirai T, Nagai S : In vitro cultivation and partial characterization of *Lawsonia intracellularis* from a Japanese field case of porcine proliferative enteropathy, *J Vet Med Sci*, 68, 609-613 (2006)

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切丁寧な御指導、御助言を賜りました麻布大学獣医学部微生物第2研究室 田原口智士教授、麻布大学獣医学部公衆衛生学第2研究室 加藤行男准教授に深甚なる感謝の意を表します。また、試料や情報の提供において協力を賜りましたエス・エム・シー株式会社の同僚に慎んで感謝の意を表します。

本論をまとめるにあたり、及び本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部分子生物学研究室 村上賢教授、に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、細部にわたる御指導、御助言を頂きました麻布大学獣医学部分子生物学研究室の下河史枝さん、内田葉月さん、原田ひかるさんをはじめ、多くの御協力を頂いた研究室生の皆様に心から感謝いたします。