

氏名(本籍)	小池郁子(神奈川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第152号
学位授与年月日	平成30年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	国内の豚における Porcine circovirus 2 および <i>Lawsonia intracellularis</i> の疫学的及び分子生物学的解析による特徴付け
論文審査委員	(主査) 村上 賢 (副査) 田原口 智士 加藤 行 男

## 論文内容の要旨

### [諸言]

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、重篤な経済的被害となっている。

その中でも、Porcine circovirus 2 (以降 PCV2) および *Lawsonia intracellularis* (以降ローソニア) の日本国内の農場での抗体陽性率は 100% に近く、発育不良や下痢を起こし、さらには死亡に至ることもあり、養豚経営に大きな影響を与えている。そこで、この2つの病原体について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 の分子疫学的解析

PCV2 の感染は、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、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。

PCV2 は、カプシドタンパク質をコードする ORF2 遺伝子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。2005 年頃より、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た。2008 年頃からは、世界的に PCV2a を抗原としたワクチンが普及したことで、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 が多発した。発症豚より検出された PCV2 は、それまでアメリカで確認されていなかった mPCV2 と呼ばれる PCV2d に属する株であった。この株は実験的感染により増殖

能力が高いことがわかっている。

mPCV2 による PCVAD の発生以降、mPCV2 と同じクラスターに入る株が流行株となり、アメリカだけでなくブラジルや中国などでも PCVAD の被害が報告されている。

そこで本研究では、日本国内の養豚農場における PCV2 感染の遺伝子検査による分子疫学的調査を行った。

## (結果)

### 1) 2015 年の国内の豚の PCV2 遺伝子型

日本国内でも、2009 年に PCV2 ワクチン接種が開始されてからは、PCVAD の検出は劇的に減少していった。しかし、健康豚の血清および死亡豚の著者らの調査結果から、2014 年頃より PCV2 の検出率の増加や PCVAD の発生が再び見られるようになってきている。そこで 2015 年における国内の 21 農場からの豚について PCV2 遺伝子型を調査した。

2015 年春に国内の健康な豚より採取した血液より、PCR 法を用いて ORF2 全領域を含む PCV2 遺伝子部位の確認を行った。PCR 陽性となった検体は、ORF2 全領域をシーケンス解析により塩基配列を決定し、遺伝子型を決定した。その結果、7 種類の PCV2 が確認され、そのうち 3 種類は、mPCV2 と同じ PCV2d 内のクラスターである PCV2d-1 に属する株であることが分かった。世界的に流行している PCV2d-1 が、国内の千葉県および青森県にも存在していることを示した。

### 2) 2009 年～2016 年の国内の PCV2 の疫学的調査

2015 年の検体より、国内に PCV2d-1 が存在することが確認されたことから、その浸潤状況を調査するため、2009 年から 2016 年に範囲を広げて、国内の各地域の複数の農場における健康豚について、PCV2 の遺伝子型の検出とその遺伝子型の経時的変化を調査した。

1) と同様の方法で遺伝子解析を行った結果、34 種類の異なる配列情報が得られた (AccessionNo.LC278320～LC278353)。

本調査により、PCV2d-1 に属する株は 2012 年に千葉県と神奈川県 の 2 農場から検出され、その後には青森県、熊本県でも検出され、国内の広範囲に存在していることがわかった。また、分子系統学的解析により、国内で初めて PCV2e の存在が確認された。

PCV2d-1 および PCV2e の検出時期は、アメリカでの検出時期とほぼ一致していた。

## (考察)

本調査で、増殖能力の高い mPCV2 と同じクラスターに属する PCV2d-1 が、2012 年より検出され始め、その後全国に広く存在していることがわかった。また 2016 年には、アメリカで報告のあった PCV2e が国内にも存在していることを示した。

侵入経路として、輸入生体および精液が推測されたが、PCV2d-1 および PCV2e が検出された 9 農場では、海外から直接、豚の生体や精液を輸入しておらず、これらが直接の原因とは考えられなかつ

た。

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があることから、感染経路として、アメリカから輸入される飼料が疑われた。

陽性だった 9 農場では、血漿蛋白の入った飼料を、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た。

アメリカでの PCV2 遺伝子型の検出時期および変動と国内での状況がほぼ一致していたことから、今後、海外での発生状況を監視し、導入豚や精液、豚の移動の他輸入飼料を含めた侵入経路の調査と、PCV2 遺伝子型のモニタリングを行っていく必要がある。

## 〔第 2 章〕 ローソニアの分子生物学的解析

豚のローソニア感染症は大きく分けて、二つの症状がある。一つはタール状～血様便を呈し、場合により死亡に至る急性タイプと、正常～軟便程度で潜在的に発育の低下に関与している慢性タイプである。特に慢性タイプは、肥育後半での発育に影響を与えることから、ローソニアによる経済的損失が報告されている。

ローソニアはグラム陰性桿菌で偏性細胞内寄生菌のため、人工培地での培養ができないことから、不明な点が多く、症状の違いが何に起因するものかわかっていない。ローソニア全ゲノムは、約 1.7Mb で、そのほかに 3 つのプラスミド（それぞれ 27133bp、39878bp、194613bp）が急性タイプの症例から 2 株報告されている。病原性遺伝子についてはわかっていないが、いくつかのタンパク質遺伝子の報告がある。そこで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、慢性と急性タイプの症状および無症状の豚から検出されたローソニアの遺伝子学的な違いを探った。

### （結果）

採取した豚糞便を不顕性、慢性、急性タイプに分類し、糞便中のローソニアの有無を、PCR 法により aspA 遺伝子部位を増幅するプライマーにより確認した。ローソニアの PCR で陽性が確認されたものについて、リケッチア属で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) 遺伝子部位のシーケンス解析を行った。その結果、同一農場の急性タイプと慢性タイプから確認された HSP60 遺伝子で 2 塩基の違いが認められたが、推測されるアミノ酸配列では違いはなく、同義置換であった。

ローソニアの症状が認められた豚と認められなかった豚の血清免疫反応に違いの認められた外膜タンパク質が報告されたことから、この外膜タンパク質の遺伝子部位を含む約 80Kbp のシーケンス解析を行った。複数の遺伝子座位で塩基配列の違いが見られたもののいずれも同義置換であった。

次に、継代により非病原性となった株と元の病原性株との全塩基配列の比較から、プラスミドの配

列に違いがあることが報告されたため、まずは、症状のタイプごとにプラスミドの有無を確認し、細胞の侵入に関与すると考えられる部位を含めた計 11 カ所、総計約 14Kbp の塩基配列を比較した。その結果、調査に用いた急性、慢性、不顕性のそれぞれのサンプルから、報告されている 3 種類のプラスミドの存在を確認できた。調べた配列内で Chromosome-partitioning ATPase (755bp) 部位に 3 塩基の違いがみられたが同義置換であった。

#### (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、アメリカで検出された 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かったため、今回国内のローソニア感染豚の便を症状ごとに分けて感染や症状と関連があると推測される遺伝子に注目して配列解析を行った。

細胞内への侵入に関与すると考えられる HSP60、50kDa、SodC の遺伝子部位、血清免疫反応に違いが認められ細胞への接着や侵入にかかわることが報告された外膜タンパク質の遺伝子部位、さらにプラスミド内の病原性株と非病原性株とで配列の違いが認められた部位についてシーケンス解析をおこなった。

細胞内侵入や接着に関わる多くの遺伝子部位を確認したが、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 HSP60 遺伝子、プラスミドの 1 遺伝子、外膜タンパク質の遺伝子部位の塩基配列で数塩基の違いはあったもののいずれも同義置換で、症状と塩基配列の違いに関連性は確認されなかった。

本調査より、ローソニアの病原性に影響を与える可能性のある遺伝子に特徴的な違いはなく、症状の違いは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示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

国内の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、重篤な経済的被害となっている。その中でも、Porcine circovirus 2 (以降 PCV2) および *Lawsonia intracellularis* (以降ローソニア) の日本国内の農場での抗体陽性率は 100%に近く、発育不良や下痢を起こし、さらには死亡に至ることもあり、養豚経営に大きな影響を与えている。しかし、国内の養豚場でこれら慢性疾病に対する野外感染の実態を示した報告はほとんどない。そこで、著者は PCV2 とローソニアの 2 つの病原体に注目し、疫学的、分子生物学的な調査、解析を行った。本論文は、2

章から構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

## 〔第 1 章〕 PCV2 の分子疫学的解析

PCV2 の感染は、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、世界中の養豚産業に深刻な経済的被害を与えている。PCV2 は、カプシドタンパク質をコードする ORF2 遺伝子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。2005 年頃より、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た。2008 年頃からは、世界的に PCV2a を抗原としたワクチンが普及したことで、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 が多発した。発症豚より検出された PCV2 は、それまでアメリカで確認されていなかった mPCV2 と呼ばれる PCV2d に属する株で、これは実験的感染から増殖能力が高いことが知られている。mPCV2 による PCVAD の発生以降、これと同じクラスターに入る株が流行株となり、アメリカだけでなくブラジルや中国などでも PCVAD の被害が報告されている。

本研究で著者は、まず日本国内の養豚農場から検査施設に持ち込まれた豚における 2007 年~2015 年の PCV2 感染状況 (検出率) を遺伝子検査により調査した。その結果、国内でも 2009 年の PCV2 ワクチン接種開始以降、検出率は一旦低下したものの 2014 年頃から上昇に転じていることを見つけた。これを切っ掛けとして、遺伝子型と検出率増加の関連性を調べた。

### 1) 2015 年の国内の豚の PCV2 遺伝子型

PCV2-ELISA 検査により抗体の陽性が認められ、さらに PCV2 の定量的リアルタイム PCR によりウイルス量または検出率が増加傾向にある国内の 21 農場の 2015 年春の健康な豚の血清を材料として用いた。各農場の母豚および日齢ごとに血清を混和して、計 163 検体について、PCR による PCV2 遺伝子の検出を行ったところ、10 検体が陽性であった。これら陽性検体について ORF2 全領域の塩基配列解析を行い、遺伝子型を決定したところ、7 種類の PCV2 が確認され、そのうち 3 種類は、分子系統学的解析から mPCV2 と同じ PCV2d 内のクラスターである PCV2d-1 に属する株であることが分かった。世界的に流行している PCV2d-1 が、国内の千葉県および青森県にも存在していることを示した。2009 年に日本で分離された d 株とは異なるクラスターであることがわかった。

### 2) 2009 年~2016 年の国内の豚における PCV2 の分子疫学的調査

国内の PCV2d-1 の浸潤状況を調査するため、2009 年から 2016 年に範囲を広げて、国内の各地域の 19 の農場における健康な豚 (166 検体) の保存血清について、PCV2 の検出とその遺伝子型の経時的変化を調査した。その結果、67 検体が陽性であり、27 種類の PCV2 株を検出した〔上述 1〕の結果と合わせると 34 種類の異なる配列情報が得られた ; AccessionNo.LC278320~LC278353〕。PCV2d-1 に属する株は 16 検体 2 種類であり、2012 年に千葉県と神奈川県 の 2 農場から、その後には青森県、栃木県、熊本県でも検出され、国内の広範囲に存在していることがわかった。また、2016 年の検体が

ら国内で初めて PCV2e の存在を確認した。なお、d-1 または e が検出された 9 農場はすべて、PCV2 ワクチンを接種していた。

考察では、アメリカでの PCV2 遺伝子型の検出時期および変動が国内での状況とほぼ一致していたことを示し、PCV2d-1 または e の検出農場の飼育環境状況から、PCV2 の侵入・拡散経路として、血漿蛋白を原料とした輸入飼料からの可能性や飼料運搬容器や運搬トラックからの可能性について言及した。また、感染防御対策についても述べている。

## 〔第 2 章〕 ローソニアの疫学的調査と分子生物学的解析

国内のローソニアの感染状況については 2004 年の抗体陽性率についての報告があったものの、検出状況の詳細な報告はほとんど見られない。そこで著者は、国内の養豚農場から 2006 年～2016 年の 10 年間に検査施設に持ち込まれた腸管疾病（下痢症状）の認められた豚（3989 検体）におけるローソニアの検出率を aspA 遺伝子部位を増幅する遺伝子検査により調査した。同時に、腸管疾病の主な病原体であるサルモネラ、豚赤痢、豚鞭虫なども調べ比較した。その結果、ローソニアの検出率は約 20% で、腸管疾病の主な病原体 12 病原体中で最も高いことを確認した。年によってはローソニアの検出率は 50% を超えた。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、ローソニアが国内の養豚経営において非常に重要な疾病であることを示した。

豚のローソニア感染症は大きく 2 つの症状があり、1 つはタール状～血様便を呈して場合により死亡に至る急性タイプと、正常～軟便程度で潜在的に発育の低下に関与している慢性タイプである。特に慢性タイプは、肥育後半での発育に影響を与えることから、ローソニアによる経済的損失が報告されている。ローソニアはグラム陰性桿菌で偏性細胞内寄生菌のため、人工培地での培養ができないことから、不明な点が多く、症状の違いが何に起因するものかわかっていない。そこで著者は、全国の養豚場からローソニア疑いで提供された腸管、タール状便、軟便および正常便から急性、慢性、不顕性タイプの症状ごとに分類し、PCR 検査でローソニアの検出率を調べた。その結果、急性タイプでは 83.3%、慢性タイプでは 57.1%、不顕性タイプでは 16.3% のローソニア検出率であることを示した。

次にこれらのタイプ別によるローソニアの遺伝子配列に相違がないか検討した。ローソニア全ゲノムは、約 1.7Mb で、そのほかに 3 つのプラスミドが急性タイプの症例から報告されている。病原性遺伝子についてはわかっていない。著者は、リケッチア属で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) 遺伝子部位の配列解析と比較を行った。急性と慢性タイプから確認された HSP60 遺伝子で 2 塩基の違いが認められたが、推測されるアミノ酸配列では違いはなく同義置換であった。

ローソニアの症状の有無で豚の血清免疫反応に違いの認められた外膜タンパク質の遺伝子部位を含む約 80Kbp のシーケンス解析も行った。複数の遺伝子座位で塩基配列の違いが見られたもののいずれも同義置換であった。また、各タイプ由来のローソニアにおけるプラスミドの有無とその約 14Kbp の塩基配列を比較した。その結果、調査に用いた急性、慢性、不顕性のサンプルはいずれも報告され

ている3種類のプラスミドをもっていること、調べた配列内で **Chromosome-partitioning ATPase** 部位に3塩基の違いがみられたが同義置換であることがわかった。

考察では、ローソニアの病原性に影響を与える可能性のある遺伝子に特徴的な違いはなく、症状の違いは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について述べている。

以上、本研究では、国内の養豚経営に大きな被害を与えることが懸念される **PCV2** とローソニアの2つの病原体について分子疫学的調査を行った。

**PCV2** 感染については、2007～2016年の解析を通して、増殖能力の高い **mPCV2** と同じクラスターに属する **PCV2d-1** が、2012年より検出され始め、その後全国に広く存在していることを示した。また2016年には、アメリカで報告のあった **PCV2e** が国内にも存在していることを示した。今後、海外での発生状況を監視し、導入豚や精液、輸入飼料、運搬経路中の **PCV2** の検出とその遺伝子型のモニタリングを行っていく必要性を示した。

ローソニア感染については、2006～2016年の解析を通して、下痢症状を示す腸管感染症のなかで、ローソニア検出率は主な他の病原体に比べて高いことを示し、また症状別分類である急性タイプでは80%以上、慢性タイプでは50%以上であることを示し、経済的な被害に直結する肥育期での下痢や死亡につながる重要な疾病であることを確認した。国内の野外感染株における急性タイプ、慢性タイプ、不顕性タイプの便からのローソニアについて感染や症状と関連すると推測される主要な遺伝子配列について相違がなかったことを示した。

これらの知見は、獣医学上意義ある業績として評価できることから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しい研究と判定した。