

## 原 著

## 野生イノシシにみられた豚サイトメガロウイルス感染症

入部 忠<sup>1)†</sup> 大谷研文<sup>1)</sup> 宮崎綾子<sup>2)</sup> 芝原友幸<sup>2)</sup> 谷村信彦<sup>2)</sup>

1) 山口県中部家畜保健衛生所 (〒754-0897 山口市嘉川671-5)

2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2012年9月14日受付・2012年12月18日受理)

## 要 約

山口県の山麓で発見された野生雌イノシシ1例が衰弱死したため、病性鑑定を実施した結果、外部及び内部寄生虫性病変に加え、全身の細網内皮系細胞等に大型の好塩基性核内封入体を伴う病変が認められた。本症例は、免疫組織化学的染色、透過型電子顕微鏡、ウイルス学的及び遺伝学的検査とあわせて、イノシシの豚サイトメガロウイルス感染症と診断された。2011年度に山口県で捕獲されたイノシシ血清30例でさらに調査を行った結果、2例で本ウイルス遺伝子が確認された。これら3例(死亡1例と血清材料2例)の遺伝子配列をもとに分子系統樹解析を行った結果、それぞれが遺伝学的に離れており、県内のイノシシにおいて遺伝学的に多様なPCMVが感染している可能性が示唆された。本症例は、イノシシにおいて豚サイトメガロウイルス感染症と病理学的に初めて診断された事例である。

——キーワード：豚サイトメガロウイルス，イノシシ。

----- 日獣会誌 66, 243～247 (2013)

ヘルペスウイルス目ヘルペスウイルス科ベータヘルペスウイルス亜科に分類されている豚サイトメガロウイルス (porcine cytomegalovirus : PCMV) は、国内を含む世界中の豚で高率に感染していることが報告されており、一旦感染すると潜伏化し、生涯持続感染する [1]。鼻汁、尿などを介する水平感染の他に垂直感染も知られており、移行抗体陰性の新生豚が感染するとくしゃみ、鼻汁、呼吸困難などがみられ、死亡することもある。日齢が進むと症状は軽度となり、不顕性化する。抗体陰性の妊娠豚が感染すると、死産のほか新生子豚の死亡や発育不良がみられることがある。病理組織学的には、鼻粘膜の腺上皮や導管上皮細胞、その他肝臓、腎臓等の上皮細胞、細網内皮系細胞において特徴的な大型の核内封入体が形成される [1]。

イノシシは産肉性の高さ等から世界各地で家畜化され、その地方独特の形態を持った在来豚になったとされる [2]。国内では北海道を除く全国各地の山林等に生息しており、本州、四国、九州ではニホンイノシシ、沖縄を含む南西諸島ではリュウキュウイノシシが分布している。イノシシは豚の起源であることから、PCMVの感

受性も豚と類似していると考えられ、実際にPCMVのキャリアとなっているとの報告があるものの [3]、詳細な調査は行われておらず、特に病理学的にPCMV感染症と診断された報告はない。今回、死亡した野生イノシシに免疫組織化学的染色 (IHC)、透過型電子顕微鏡検査 (TEM) を含む病理学的検査及びウイルス学的検査を実施し、PCMV感染症と診断された。また、死亡イノシシに加え、山口県内で捕獲されたイノシシの血清から検出されたPCMV遺伝子について分子系統樹解析を実施したので報告する。

## 材料及び方法

**材料：**2011年3月に山口県山口市の山麓においてニホンイノシシ (*Sus scrofa vittatus*) が、衰弱し流涎を呈した状態で発見された。本症例は約8kgの雌の幼獣(推定4カ月齢以上)で、翌日死亡したため主要臓器、胃及び皮膚が病性鑑定に供された。また、疫学調査のため、2011年度に同県内で捕獲された野生イノシシ30頭分の血清を用いた。

**病理組織学的検査：**剖検後、定法に基づき諸臓器をパ

† 連絡責任者：入部 忠 (山口県中部家畜保健衛生所)

〒754-0897 山口市嘉川671-5 ☎083-989-2517 FAX 083-989-2518

E-mail : iribe.tadashi@pref.yamaguchi.lg.jp

ラフィン包埋後、薄切切片を作製しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、フォイルゲン反応、ベルリン青染色を実施した。肝臓、腎臓、肺では抗PCMV J1株家兎ポリクローナル抗体 [4] を一次抗体に用いた酵素抗体法によりIHCを実施した。組織切片は0.1%アクチナーゼ処理 (37°C, 20分) により抗原の賦活化を実施した後、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有メタノール (室温, 30分) により内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。一次抗体処理には1,024倍に希釈した前述の抗体を用いた (室温, 30分)。また、肝臓、脾臓、腎臓、肺及び体表リンパ節では抗豚サーコウイルス2型 (PCV2) 家兎ポリクローナル抗体 (獣動物衛生研究所) を一次抗体に用いたIHCを実施した。組織切片は0.1%アクチナーゼ処理実施後 (37°C, 20分)、1,024倍に希釈した一次抗体を用いた (室温, 30分)。これらの一次抗体処理後の組織切片について、二次抗体 (PCMV: シンプルステインMAX-PO (R) PCV2: シンプルステインMAX-PO (MULTI), ㈱ニチレイ, 東京) 及び発色処理 (PCMV: シンプルステインDAB溶液 PCV2: AEC基質キット, ㈱ニチレイ, 東京) を各種キットの使用法に従って実施した。切片はヘマトキシリンで対比染色後、鏡検を実施した [4]。

また、ホルマリン固定済みの肝臓をオスミウム酸固定、エボン樹脂包埋後に超薄切切片を作製し、酢酸ウラン・酢酸鉛染色後、透過型電子顕微鏡 (日立H-7500) を用いて観察した。

**ウイルス学的検査:** 10% (w/v) 肝臓乳剤上清を豚腎由来株化細胞 (CPK細胞) に接種し、ウイルス分離を行った。また、同材料から市販キットを用いてDNA (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス㈱, 東京) 及びRNA (High Pure Viral RNA Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス㈱, 東京) を抽出した。PCMV DNAポリメラーゼ (pol) 遺伝子 [5], 豚パルボウイルスNS-1遺伝子 [6], 豚アデノウイルスヘキソン遺伝子 [7], PCV2カプシド遺伝子について市販のDNAポリメラーゼ (Takara Taq™ Hot Start Version, タカラバイオ㈱, 滋賀) を使用し既報に基づいてPCRを行った。PCV2カプシド遺伝子の増幅は、鈴木ら (獣動物衛生研究所, 未公表) の方法に従って、PCV2 genotype I はプライマー EUJP-FW (5'-agga gaaggctgggttatg-3') 並びにEU-RV (5'-gctcaaac cccgctctgtg-3'), genotype II B-II E はNA-FW (5'-aggagaagggtgggggatt-3') 並びにNAJP-RV (5'-ggggaccaacaaatctctata-3'), genotype II A はEUJP-FW 並びにNAJP-RV を使用し行った。E型肝炎ウイルスについては国立感染症研究所E型肝炎検査マニュアル (平成17年4月) に基づきORF2遺伝子を増幅するRT-PCR (OneStep RT-PCR Kit, ㈱キアゲン, 東

京) を実施した。

PCMV 遺伝子が検出された症例の肝臓及び野外血清2検体についてはさらにglycoprotein B (gB) 遺伝子領域 (PCMV OF-1株 [GenBank accession number AF268041] の683-1048塩基に一致する366塩基長) の増幅を行った。遺伝子増幅にはプライマー gB-685F (5'-ggttatataaaagctcatcttct-3') 並びにgB-1050R (5'-aactatttgcctgtctgct-3') を使用し、アニーリング温度を45°C, サイクル数を40サイクルとしDNA pol 遺伝子 [5] と同様にPCR反応を行った。また、PCR産物1 µlより同じプライマーセットgB-685F/gB-1050Rを使用してPCRを行い、PCR産物の再増幅を行った。Taqポリメラーゼによる変異であることを否定するために同じ検体より独立して3回遺伝子検出を行い解析に供した。

**遺伝子解析:** 増幅遺伝子産物を精製後 (MicroSpin S-400 HR Columns, GE, Sweden), ダイレクトシーケンスにより産物の塩基配列を決定した。遺伝子解析と系統樹作製にはMEGA 5ソフトウェアを使用した。塩基配列決定後、BLAST検索により相同性検索を行った。GenBank登録株との多重配列整列にはClustal Wを用い、Kimura-2 correction parameterにより遺伝学的距離を計算し、近隣結合法により系統樹を作製した。各分岐の信頼性を1,000回反復によるブートストラップ確率により評価した。

## 成 績

**肉眼所見:** イノシシの被毛は粗剛で外貌は削瘦していた。皮膚では多数のタイワンカクマダニの寄生を伴い、頸部から前胸部腹側面に発赤及び痂皮がみられた。剖検の結果、肝臓では、硬結及び胆管の重度拡張がみられた。肺では多発性小葉性に暗赤色を呈していた。胃では胃底部を主体にドロレス顎口虫の寄生を伴う出血、潰瘍がみられた。腹腔にはフィブリンの析出が認められた。

**病理組織学的所見:** 肝臓では、肝細胞の孤在性変性及び壊死がみられ、まれに巣状壊死が認められた。類洞には炎症性細胞の軽度浸潤、血球貪食像を含むクッパー細胞の活性化が認められた。小葉間結合組織では好中球、好酸球に加え、単核細胞の浸潤及びヘモジデリンの沈着が認められ、限界板の破壊及び周囲肝細胞の壊死が散見された。上記病変部において、フクロウの目様の大型の好塩基性核内封入体が形成された肝細胞、クッパー細胞及び血管内皮細胞が認められた (図1)。これらの封入体はフォイルゲン反応陽性であった。同様の封入体は、脾臓の細網内皮系細胞、腎臓髄質及び肺の血管内皮細胞、尿細管上皮細胞及び動脈内の単球にも認められた。その他、腎臓では、被膜とその周囲に豚腎虫様の虫卵及び出血、心臓では、筋線維間に炎症を伴わない旋毛虫様シス

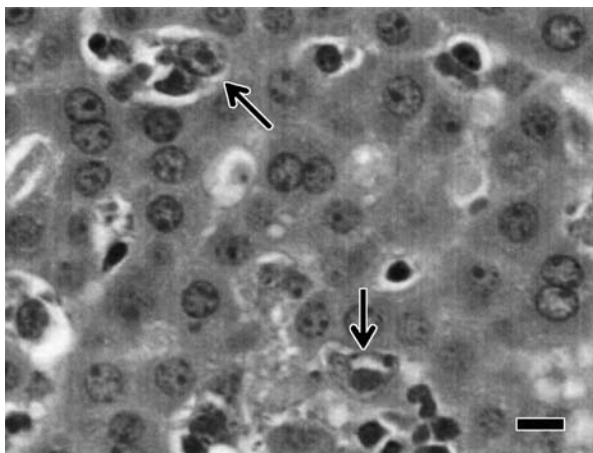


図1 肝臓。変性、壊死した肝細胞の核内において明瞭な好塩基性の核内封入体 (矢印) が形成されている。(HE染色 Bar = 10  $\mu$ m)

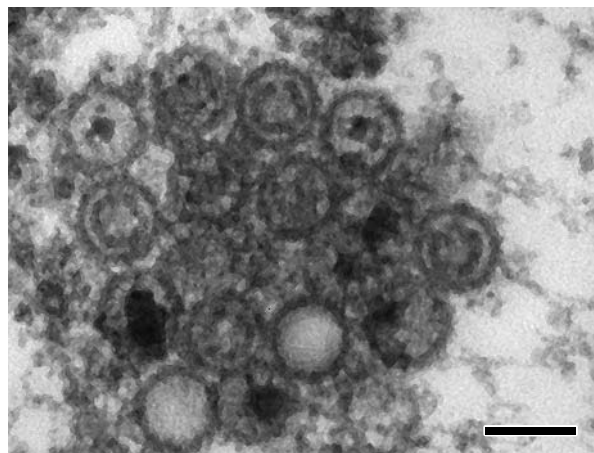


図3 肝臓。巨大化した肝細胞の核内にさまざまなタイプのコアを持つカプシドの集塊が認められる。(透過型電子顕微鏡像 Bar = 100nm)

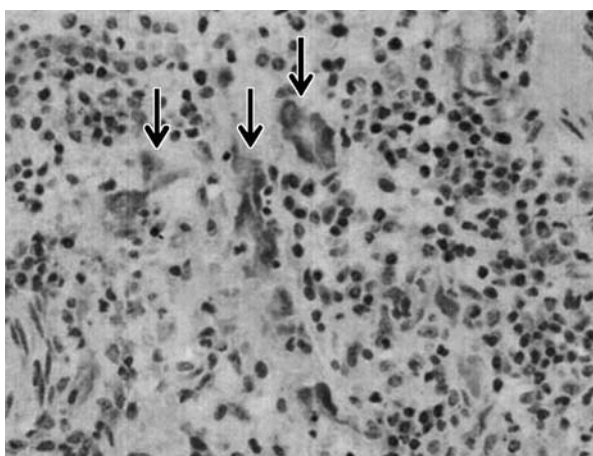


図2 肺。巨大化した肺の血管内皮細胞の細胞質に抗PCMV抗体に対する陽性反応 (矢印) が認められる。(免疫組織化学)

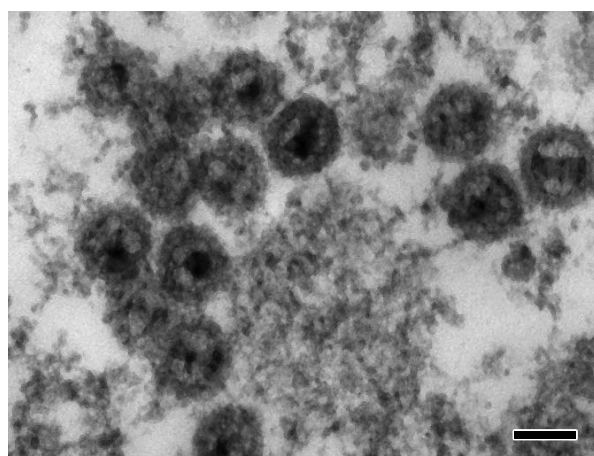


図4 肝臓。肝細胞の細胞質において、ヌクレオカプシドにテグメントが付加されたウイルス粒子の集塊が認められる。(透過型電子顕微鏡像 Bar = 100nm)

トの寄生、豚肺虫の寄生による小葉性の閉塞性細気管支肺炎、胃では、ドロレス顎口虫による潰瘍を伴う壊死性肉芽腫性炎が認められた。

肝臓、腎臓及び肺における抗PCMV J1株家兎ポリクローナル抗体を用いたIHCでは、封入体形成細胞において陽性反応が確認された (図2)。抗PCV2ポリクローナル抗体を用いたIHCでは、脾臓のみに陽性細胞がまれに認められた。

TEMでは、大型化した肝細胞の核内に高電子密度顆粒状物質からなる封入体が認められ、その内部に直径約90nmのカプシドの集塊が認められた。カプシドはコアを持たないもの、中空のコアを持つもの、高電子密度の核酸を持つ3つのタイプで構成されていた (図3)。細胞質にはヌクレオカプシドにテグメントが付加したと考えられる直径約120nmの粒子が認められた (図4)。また、核膜及び細胞膜からのウイルス粒子の出芽を示唆する像

がまれに認められた。これらの粒子はヘルペスウイルスの形態学的特徴を有していた。

**ウイルス学的所見：**肝臓乳剤からウイルスは分離されなかった。PCR並びにRT-PCRによる検査では、肝臓乳剤よりPCMVとPCV2 (genotype I) の遺伝子が検出された。肝臓由来DNAから得られたPCMV DNA pol 遺伝子増幅産物 (Liver) の塩基配列を決定し (478bp)、BLAST検索による相同性解析を実施した結果、イギリスで分離されたPCMV B6株と100%一致した。

また、イノシシ30頭の血清のうち県西部由来の2検体からもPCMV DNA pol 遺伝子が検出された (No. 1並びにNo. 2)。次に、これらPCMV遺伝子陽性となった計3検体 (Liver, No. 1及びNo. 2) について、県内のイノシシに浸潤するPCMVの遺伝学的関連を調査するために、DNA pol 遺伝子よりも遺伝学的多様性に富

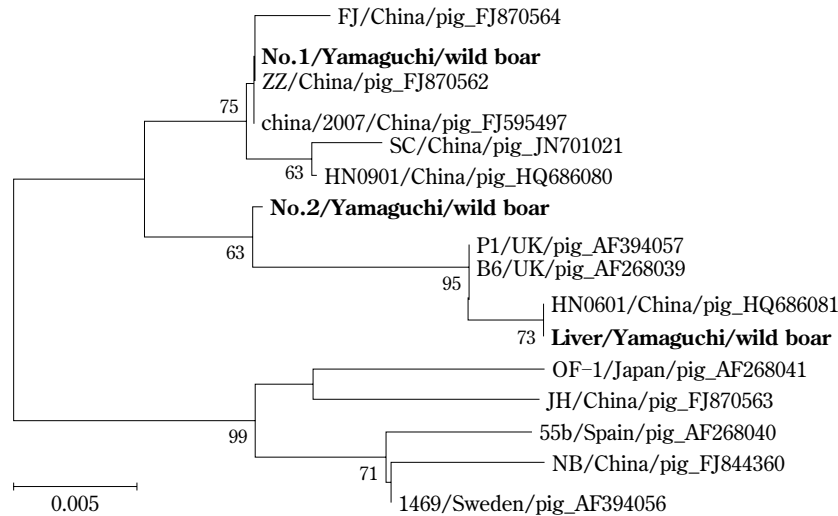


図5 PCMV glycoprotein B (gB) 遺伝子 (323bp) に基づいた分子系統樹

OF-1株 (GenBank登録番号AF268041) のnt706-1028に一致する領域を解析に用いた。系統樹作製には近隣結合法を使用し、50%以上のブーッストラップ値を各枝に示した。山口県イノシシ由来株を太字で示し (肝臓乳剤由来: Liver/Yamaguchi/wild boar, 血清由来: No.1, 2/Yamaguchi/wild boar), GenBank登録株は株名/国/由来動物\_GenBank登録番号で示した。

むgB遺伝子を増幅し、分子系統樹解析を行った。3検体から検出されたgB遺伝子 (323bp) の塩基配列一致率は97.8~99.1%, アミノ酸配列一致率は97.2~99.1%であり、分子系統樹では3検体の遺伝子は同じ遺伝学的な系統に属したものの、それぞれ遺伝学的に異なっていた (図5)。これら3検体について独立して3回遺伝子解析を行った結果、すべて上記と同一の結果が得られた。

### 考 察

本症例では、特徴的な核内封入体が全身の細網内皮系細胞等で認められたこと、IHCで封入体形成細胞にPCMVの特異抗原が検出されたこと、TEMでヘルペスウイルス粒子が確認されたこと、PCRでPCMVの特異遺伝子が検出され既存のPCMV株と高い相同性を示したことから、PCMV感染症と診断された。本症例において初めてイノシシのPCMV感染症が病理学的に確認された。

本症例は外貌より4カ月齢以上と推定され、重篤なPCMVの全身感染を引き起こす月齢ではないと考えられたが、寄生虫の高度寄生及びそれらに伴う病変のため、高度なストレス下にあり、免疫低下が引き起こされたことがPCMVの病変形成の引き金になった可能性が考えられた。また、PCR及びIHCでPCV2の存在が確認されたものの、PCV2感染に由来すると考えられる特徴的な組織病変は認められなかった。これらのことからPCMV感染症へのPCV2の関与は完全には否定できな

いものの主要な要因である可能性は低いと考えられた。

病理組織学的に肝臓では、核内封入体を伴う肝細胞の孤在性壊死や小葉間結合組織における周囲組織破壊性の炎症細胞浸潤が認められた。豚の場合、全身性に封入体を形成する症例では、出血、水腫や中枢神経系におけるグリオーシス、肝臓、腎臓における巣状壊死が認められるとされている [1]。本症例の所見がイノシシにおけるPCMVの通常病変なのか本症例に限定的な病変なのかを明らかにするためには今後の症例の蓄積が望まれる。

国内の豚はおもに欧米由来の品種が供用されており、ニホンイノシシとは系統的に交差している可能性は低いと考えられたが、今回の症例でニホンイノシシでのPCMVの感受性が証明された。

豚から検出されたPCMVのgB遺伝子にはある程度地理的な多様性があると報告されている [1]。今回解析を行った3検体では、同一県、同一時期に由来しているにも関わらず遺伝学的な多様性が認められた。これが捕獲された地域が異なることによる地理的な要因によるものなのか、県内の豚に浸潤するPCMVの遺伝学的多様性を反映するものなのかを明らかにするためにさらなる症例の蓄積が必要と思われる。

今後、野生イノシシと養豚場におけるPCMV浸潤の実態調査を進めることにより、本ウイルスの伝搬にイノシシがどれだけ関与しているかを明らかにする必要があると考えられる。

引用文献

- [1] 芝原友幸, 関口真樹, 宮崎綾子, 田島朋子, 清水真也, 久保正法: 豚サイトメガロウイルス病の診断, 日獣会誌, 65, 429-435 (2012)
- [2] 猪 貴義: 家畜の品種, 新家畜育種学, 水間 豊編, 第1版, 31-34, 朝倉書店, 東京 (1996)
- [3] Shcherbakov AV, Kukushkin SA, Timina AM, Baïbikov TZ, Kovalishin VF, Kan'shina AV, B'iadovskaia OP, Prokhvatilova LB, Ruchnova OI, Bakunov IN, Babkin MV: Monitoring of infectious diseases among wild boars, *Vopr Virusol*, 52, 29-33 (2007)
- [4] Sekiguchi M, Shibahara T, Miyazaki A, Tajima T, Shimizu S, Kabali E, Takano Y, Sasaki Y, Kubo M: *In situ* hybridization and immunohistochemistry for the detection of porcine cytomegalovirus, *J Virol Methods*, 179, 272-275 (2012)
- [5] Widen BF, Lowings JP, Belak S, Banks M: Development of a PCR system for porcine cytomegalovirus detection and determination of the putative partial sequence of its DNA polymerase gene, *Epidemiol Infect*, 123, 177-180 (1999)
- [6] Soares RM, Durigon EL, Bersano JG, Richtzenhain LJ: Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1, *J Virol Methods*, 78, 191-198 (1999)
- [7] Maluquer de Motes C, Clemente-Casares P, Hundesa A, Martín M, Girones R: Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination, *Appl Environ Microbiol*, 70, 1448-1454 (2004)

---

Porcine Cytomegalovirus Infection in Wild Boars

Tadashi IRIBE<sup>1)\*†</sup>, Akifumi OOTANI<sup>1)</sup>, Ayako MIYAZAKI<sup>2)</sup>, Tomoyuki SHIBAHARA<sup>2)</sup>  
and Nobuhiko TANIMURA<sup>2)</sup>

1) *Yamaguchi Chubu Livestock Health and Hygiene Service Center, 671-5 Kagawa, Yamaguchi, 754-0897, Japan*

2) *National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

A female wild boar that had died of a debilitation was pathologically examined. In addition to an internal and external parasitic lesion, basophilic intranuclear inclusion bodies were observed systemically in reticuloendothelial cells. Immunohistochemical, transmission electron microscopic, virological and genetical investigations were subsequently conducted, and the case was diagnosed as porcine cytomegalovirus (PCMV) infection. PCMV infection among wild boars in Yamaguchi prefecture was further investigated, and the PCMV gene was identified in 2 of 30 serum samples collected in 2011. These three PCMV sequences (one from the deceased case and two from serum samples) were genetically distinct to each other, suggesting genetic diversity among PCMV strains in wild boars. This is the first detailed pathological report on PCMV infection in wild boars.

—Key words: porcine cytomegalovirus, wild boar.

† *Correspondence to: Tadashi IRIBE (Yamaguchi Chubu Livestock Health and Hygiene Service Center)*  
*671-5 Kagawa, Yamaguchi, 754-0897, Japan*

*TEL 083-989-2517 FAX 083-989-2518 E-mail: iribe.tadashi@pref.yamaguchi.lg.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 243 ~ 247 (2013)*